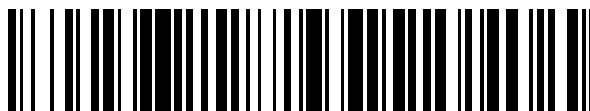


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 950**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.05.2012 PCT/US2012/040183**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012 WO12166899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.05.2012 E 12793322 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2714937**

54 Título: **Biomarcadores para predecir y valorar la capacidad de respuesta de sujetos con cáncer de tiroides y de riñón a compuestos de lenvatinib**

30 Prioridad:

03.06.2011 US 201161493294 P

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

27.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FUNAHASHI, YASUHIRO;
KADOWAKI, TADASHI;
MATSUI, JUNJI;
SIMON, JASON S. y
XU, LUCY**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 705 950 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 predecir y valorar la capacidad de respuesta de sujetos con cáncer de tiroides y de riñón a compuestos de lenvatinib

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a biomarcadores y a tiroides y riñón

Antecedentes de la invención

Se han desarrollado varios inhibidores de quinasa como agentes antitumorales. Por ejemplo, se conoce que un grupo de compuestos que tienen actividad inhibitoria frente a tirosina quinasas receptoras, tal como receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), 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 quinasa oral que selecciona como diana VEGFR1-3, el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR) 1-4, receptor transpuesto durante la transfección (RET), KIT y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). En los estudios clínicos de fase I de mesilato de lenvatinib, se observó una respuesta al tratamiento en cánceres de tiroides, de riñón y endometrial, así como en melanoma.

Desafortunadamente, la mayoría de los tratamientos antitumorales están asociados con efectos secundarios no deseables, tales como náuseas profundas, vómitos o fatiga severa. Además, aunque los tratamientos antitumorales han sido satisfactorios, no producen respuestas clínicas significativas en todos los pacientes que los reciben, dando como resultado efectos secundarios no deseables, retrasos y costes asociados con un tratamiento ineficaz. Por tanto, son de enorme necesidad biomarcadores que puedan usarse para predecir la respuesta de un sujeto a un agente antitumoral antes de la administración del mismo. Además, es útil tener biomarcadores que puedan usarse para evaluar si una terapia que comprende un agente antitumoral es eficaz.

K. YAMADA *ET AL*, 2011 ("Phase I Dose-Escalation Study and Biomarker Analysis of E7080 in Patients with Advanced Solid Tumors", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 17, n.º 8, páginas) dan a conocer un método para determinar la respuesta a lenvatinib (o E7080) en pacientes con tumores sólidos avanzados, incluyendo cáncer de colon, sarcoma y NSCLC. El método comprende determinar el nivel de proteína SDF1 α en una muestra de suero del paciente antes del tratamiento.

Sumario

La presente solicitud se basa, al menos en parte, en la identificación de biomarcadores que puedan predecir la capacidad de respuesta de un sujeto con cáncer de tiroides o de riñón a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). La presencia de una mutación en uno o más de los genes es un factor de pronóstico útil de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, una(s) mutación(es) en uno o más de los genes NRAS, KRAS, VHL, BRAF, ERBB2, PTEN y MET es indicativa de que un sujeto con cáncer de tiroides o riñón dado responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Además, la razón de niveles de tiroglobulina pre- y post-tratamiento con una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede ser útil para determinar la probabilidad de que un sujeto que tiene cáncer de tiroides diferenciado responda a una terapia continuada con el compuesto de lenvatinib. Además, el nivel de expresión de ciertas proteínas (por ejemplo, las enumeradas en la tabla 3) o bien antes de o bien después del tratamiento, o la razón del nivel de expresión post/pretratamiento en comparación con un control, también puede ser un factor de pronóstico útil de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Además, la combinación de estas dos clases de biomarcadores (mutaciones y biomarcadores sanguíneos) o tres clases biomarcadores (mutaciones, tiroglobulina y biomarcadores sanguíneos) puede proporcionar predicciones incluso más fuertes de la probabilidad de que un sujeto que tiene cáncer de tiroides o de riñón responda a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

La solicitud también proporciona métodos para evaluar si continuar con el tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) para un sujeto que tiene cáncer de tiroides o de riñón. Los bajos o altos niveles de ciertas proteínas (por ejemplo, las enumeradas en la tabla 3) antes y/o después del tratamiento con la terapia pueden ser útiles a la hora de evaluar si continuar con el tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, razones inferiores de niveles de tiroglobulina (post/pre-tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib)) en comparación con razones de control de muestras de pacientes de los que se conoce que no responden a tal terapia pueden ser útiles a la hora de valorar/evaluar si el sujeto de prueba se beneficiará de una terapia continuada que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

Por tanto, los biomarcadores y las composiciones descritos en el presente documento son útiles, por ejemplo, a la hora de identificar y/o seleccionar un paciente o un subconjunto de pacientes que tienen cáncer de tiroides o de riñón que puedan beneficiarse del tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Además, los métodos descritos en el presente documento son útiles, por ejemplo, a la hora de seleccionar modalidades de tratamiento apropiadas (por ejemplo, terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib)) para un sujeto que padece, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o de riñón. Además, los métodos permiten a un profesional sanitario determinar si continuar con una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) o cambiar terapias y usar un tratamiento diferente.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El método implica proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto y detectar la presencia de una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en RAS, VHL y BRAF en la muestra biológica. La presencia de una mutación en el al menos un gen es predictivo de que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, RAS es KRAS o NRAS. En una realización, la mutación en al menos un gen es una mutación enumerada en la tabla 1. En otra realización, la mutación en al menos un gen es una mutación enumerada en la tabla 2. En otra realización, la mutación en RAS se selecciona del grupo que consiste en KRAS Q61R, KRAS G12R, NRAS Q61P y NRAS Q61R. En otra realización, el método de este aspecto implica además detectar la presencia de una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en ERBB2, PTEN y MET en la muestra biológica, siendo la presencia de un RAS mutado y una mutación en al menos uno de ERBB2, PTEN y MET incluso más fuertemente predictiva de que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, el método comprende además la etapa de determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en ANGPT2, VEGFA, FLT4, CCL3 y CCL4.

En un segundo aspecto, la solicitud proporciona otro método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides diferenciado, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este método también puede usarse para evaluar/valorar el beneficio de la administración continuada de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El método implica proporcionar una primera muestra de sangre obtenida del sujeto antes de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; proporcionar una segunda muestra de sangre obtenida del sujeto tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; medir la concentración de tiroglobulina en la primera muestra de sangre y la segunda muestra de sangre; y calcular la razón (segunda/primer) de las concentraciones de tiroglobulina. Una razón reducida, en comparación con un control, de la concentración de tiroglobulina en las muestras de sangre es predictiva de que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una razón aumentada, en comparación con un control, de la concentración de tiroglobulina en las muestras de sangre es predictiva de que el sujeto responderá menos eficazmente a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que un sujeto que tiene una razón reducida, en comparación con un control, de la concentración de tiroglobulina en las muestras de sangre. En una realización, la segunda muestra de sangre se obtiene del sujeto de 1 semana a 9 meses tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, la segunda muestra de sangre se obtiene del sujeto de 2 semanas a 9 meses tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, la segunda muestra de sangre se obtiene del sujeto de 4 semanas a 6 meses tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización adicional, la segunda muestra de sangre se obtiene del sujeto de 4 días a 2 semanas tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un tercer aspecto, la divulgación proporciona otro método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este método implica proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto antes de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y medir la concentración de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en ANGPT2, VEGFA, IFNG, KDR (VEGFR2 soluble), FLT4 (VEGFR3 soluble), IL6, PDGFAB, CSF3 (G-CSF), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), FGF2 e IL13 en la muestra biológica. Una concentración reducida, en comparación con un control, de ANGPT2, VEGFA, IFNG o KDR soluble (VEGFR2 soluble), y/o una concentración aumentada, en comparación con un control, de IL-6, IL-13, PDGFAB, CSF3 (G-CSF), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), FLT4 (VEGFR3 soluble) o FGF2 es indicativa de que el sujeto responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, se mide la concentración de al menos dos genes. En una realización, los dos genes se seleccionan del grupo que consiste en VEGFA, ANGPT2 y CSF3; o

IL13, CCL3 y CCL4. En otra realización, se mide la concentración de al menos tres genes. En aún otra realización, se mide la concentración de al menos cuatro genes.

En un cuarto aspecto, la divulgación proporciona otro método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este método también puede usarse para evaluar/valorar el beneficio de la administración continuada de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El método implica proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y medir la concentración de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en ANGPT2, IL13, VEGFA, IL6, PGF, IL10, CXCL12 y CCL5 en la muestra biológica. Una concentración reducida, en comparación con un control, de ANGPT2, IL13, VEGFA, IL6 o PGF, y una concentración aumentada, en comparación con un control, de IL10, CXCL12 o CCL5 es indicativa de que el sujeto responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la muestra se obtiene aproximadamente 15 días tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la muestra se obtiene aproximadamente 29 días o cualquier primer día de cada ciclo de tratamiento (cuatro semanas por ciclo) tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un cuarto aspecto, la divulgación proporciona otro método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Este método también puede usarse para evaluar/valorar el beneficio de la administración continuada de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El método implica proporcionar una primera muestra biológica obtenida del sujeto antes de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; proporcionar una segunda muestra biológica obtenida del sujeto tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; medir la concentración de al menos una proteína seleccionada del grupo que consiste en CCL5, FLT3LG, IL12(p40), EGF, PDGF-BB, PDGF-AA, CSF2, FLT1, TEK, HGF, VEGFA, IL6, CSF3, FIGF, IL1RN, CCL11, IL1A, TGFA, PGF, PDGF-AB, IL10 y FGF2, en la primera y la segunda muestras biológicas; y calcular la razón (segunda/primer) de las concentraciones de la proteína. Una razón reducida, en comparación con un control, de la concentración de CCL5, FLT3LG, IL12(p40), EGF, PDGF-BB, PDGF-AA, CSF3, FLT1, TEK, HGF, VEGFA o IL6, y una razón aumentada, en comparación con un control, de la concentración de CSF2, FIGF, IL1RN, CCL11, IL1A, TGFA, PGF, PDGF AB, IL10 o FGF2 es predictiva de que el sujeto responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la muestra se obtiene aproximadamente 15 días tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, la muestra se obtiene aproximadamente 29 días o cualquier primer día de cada ciclo de tratamiento (cuatro semanas por ciclo) tras el inicio de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un quinto aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento de un cáncer de tiroides o de riñón, incluyendo el método la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el sujeto se ha identificado como que tiene una mutación que está asociada con la capacidad de respuesta a esta terapia, y/o que expresa un nivel o que tiene una razón de expresión de un biomarcador que está asociado con la capacidad de respuesta a esta terapia, y/o, para el caso del cáncer de tiroides, que tiene una razón de expresión de tiroglobulina que está asociada con la capacidad de respuesta a esta terapia.

En un sexto aspecto, la divulgación proporciona un método de predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o de riñón. El método implica valorar el estado mutacional de NRAS y las concentraciones de pretratamiento de ANGPT2 en una(s) muestra(s) biológica(s) obtenida(s) del sujeto. En una realización, la presencia de una mutación en NRAS (por ejemplo, una mutación de NRAS enumerada en la tabla 1 o 2) y concentraciones de ANGPT2 cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción: $(0,000751) \cdot (\text{Ang2}) + (2,69) \cdot D(\text{NRAS, WT}) - (3,92) < 0,716$, en la que la función D se define en la sección Descripción detallada, que satisfacen la fórmula, son incluso más fuertemente predictivas de que el sujeto responda a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que un sujeto que tiene cualquiera de estos biomarcadores individualmente (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

En un séptimo aspecto, la divulgación proporciona un método de predicción de la capacidad de respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o de riñón. El método implica valorar el estado mutacional de NRAS o KRAS y las concentraciones de pretratamiento de ANGPT2 en una(s) muestra(s) biológica(s) obtenida(s) del sujeto. En una realización, la presencia de una mutación en NRAS o KRAS (por ejemplo, una mutación de NRAS o una mutación de KRAS enumerada en la tabla 1 o 2) y concentraciones de ANGPT2 cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción: $(0,000869) \cdot (\text{ANG290}) + (2,16) \cdot D(\text{KRASNRAS, WT}) - (2,24) < 0,508$, que satisfacen la fórmula, son incluso más fuertemente predictivas de que el sujeto responda a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

(por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que un sujeto que tiene cualquiera de estos biomarcadores individualmente (pendientes, inserciones y valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

- 5 Las siguientes realizaciones están previstas para todos los aspectos anteriores. En una realización, el lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es mesilato de lenvatinib. En una realización, el cáncer de tiroides es un cáncer de tiroides diferenciado. En otra realización, el cáncer de tiroides es un cáncer de tiroides medular. En una realización, el cáncer de tiroides es un cáncer de tiroides papilar. En otra realización, el cáncer de tiroides es un cáncer de tiroides folicular. En otra realización, el cáncer de tiroides es un cáncer de tiroides de células de Hürthle.
- 10 En una cierta realización, el cáncer de tiroides es un cáncer de tiroides diferenciado resistente a yodo radiactivo avanzado. En una realización, el cáncer de riñón es carcinoma de células renales. En determinadas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra de sangre, células tumorales en circulación, ADN en circulación, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de tiroides, una muestra de nódulo tiroideo, una muestra de riñón y una muestra de tumor. En algunas realizaciones, el método incluye además comunicar los resultados de prueba al profesional sanitario 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 una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En realizaciones específicas, la historia se crea en un medio legible por ordenador. En determinadas realizaciones, el método incluye además prescribir una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el sujeto si el perfil de expresión del biomarcador es predictivo de que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el método incluye además administrar al sujeto una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el método comprende además seleccionar un sujeto que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer, que se beneficiaría del tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto habitual en la técnica al que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales a modo de ejemplo. En caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo definiciones, prevalecerá. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

30

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

35

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de supervivencia libre de progresión (PFS, *progression free survival*) de pacientes con mutaciones en NRAS solas o con mutaciones en o bien NRAS o bien KRAS. El análisis de pruebas de rango logarítmico demostró que pacientes con mutaciones en NRAS solas, o con mutaciones en o bien NRAS o bien KRAS tenían una mejor PFS que aquellos pacientes que eran del tipo silvestre para NRAS o KRAS.

40

La Fig. 2 es un diagrama esquemático del cambio en los niveles de tiroglobulina tras el tratamiento con E7080. "PR" se refiere a valores medianos entre grupos de pacientes que muestran una respuesta parcial a terapia con E7080. "Otros" se refiere a valores medianos entre grupos de pacientes que tienen enfermedad estable o enfermedad progresiva tras terapia con E7080.

45

Descripción detallada

50

Esta divulgación proporciona métodos y composiciones para predecir la respuesta de un sujeto con cáncer de tiroides o de riñón (tal como un paciente humano) a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). La divulgación proporciona biomarcadores predictivos (por ejemplo, niveles de expresión de proteína y/o mutaciones génicas) para identificar aquellos sujetos que tienen, de los que se sospecha que tienen o que corren el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer de tiroides diferenciado) o de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales), para los que es probable que la administración de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) sea eficaz o ineficaz. Además, la divulgación proporciona biomarcadores que son útiles para evaluar/valorar el tratamiento continuado de sujetos con cáncer de tiroides o de riñón con una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Los biomarcadores, las composiciones y los métodos descritos en el presente documento son útiles a la hora de seleccionar modalidades terapéuticas apropiadas (por ejemplo, una terapia con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib)) para sujetos que padecen cáncer de tiroides o cáncer de riñón. Además, esta solicitud proporciona métodos de selección de pacientes que tienen, de los que se sospecha que tienen o que corren el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides o de riñón, que

65

podrían beneficiarse de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) así como métodos de tratamiento.

Definiciones

5 El término “células tumorales en circulación” (CTC) se refiere a células que se han desprendido de un tumor primario y circulan en el torrente sanguíneo. Las CTC pueden constituir simientes para un crecimiento posterior de tumores adicionales (metástasis) en diferentes tejidos (Kitago *et al.*, Clin. Chem., 55(4):757:764 (2009)).

10 El término “ADN en circulación” se refiere a ADN que está presente en cantidades aumentadas en plasma o suero de pacientes con cáncer. Los pacientes con cáncer tienen niveles mayores de ADN en circulación que los controles sanos (Leon *et al.*, Cancer Res., 37: 646-650 (1977); Chuang *et al.*, Head & Neck, 229-234 (2010)).

15 El término “nivel de expresión disminuido/reducido” significa un nivel de expresión que es menor que el nivel de expresión en un control.

El término “nivel de expresión elevado” significa un nivel de expresión que es mayor que el nivel de expresión en un control.

20 El término “lenvatinib” se refiere a 4-(3-cloro-4(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida. Este compuesto se da a conocer en el ejemplo 368 (véase, columna 270) de la patente estadounidense n.º 7.253.286. El mesilato de lenvatinib también se denomina E7080.

25 Los términos “ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y designan tanto ARN como ADN, incluyendo ADNc, ADN genómico, ADN sintético, y ADN (o ARN) que contiene análogos de ácido nucleico. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional. Un ácido nucleico puede ser bicatenario o monocatenario (es decir, una hebra sentido o una hebra antisentido). Los ejemplos no limitativos de polinucleótidos incluyen genes, fragmentos de genes, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ARNip, micro-ARN, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, 30 polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico, y cebadores, así como análogos de ácido nucleico.

El término “sal farmacéuticamente aceptable” no está restringido particularmente en cuanto al tipo de sal. Los ejemplos de tales sales incluyen, pero no se limitan a, sal de adición de ácido inorgánico, tal como sal de ácido 35 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 orgánico, 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 orgánico, tal como sal de ácido metanosulfónico, sal de ácido hidroximetanosulfónico, sal de ácido hidroxietanosulfónico, sal de ácido bencenosulfónico, sal de ácido toluenosulfónico y sal de taurina; sal de adición de amina, tal como sal de 40 trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de procaína, sal de picolina, sal de dicitclohexilamina, 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 45 metanosulfónico (es decir, el mesilato) de 4-(3-cloro-4-(ciclopropilaminocarbonil)aminofenoxi)-7-metoxi-6-quinolinocarboxamida se da a conocer en la patente estadounidense 7.612.208.

“Polipéptido” y “proteína” se usan de manera intercambiable en el presente documento y significan cualquier cadena de aminoácidos unida a péptido, independientemente de la longitud o la modificación postraducciona. Normalmente, 50 un polipéptido descrito en el presente documento está “aislado” cuando constituye al menos el 60%, en peso, de la proteína total en una preparación, por ejemplo, el 60% de la proteína total en una muestra. En algunas realizaciones, un polipéptido descrito en el presente documento consiste en al menos el 75%, al menos el 90% o al menos el 99%, en peso, de la proteína total en una preparación.

55 El término “responde/que responde a una terapia” significa que el sujeto al que se le administra la terapia muestra una respuesta positiva a la terapia proporcionada. Ejemplos no limitativos de una respuesta positiva de este tipo son: una disminución el tamaño del tumor, una disminución en la metástasis de un tumor o un periodo de supervivencia aumentado tras el tratamiento.

60 El término “sujeto” significa un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, un ser humano, un chimpancé, un orangután, un gorila, un babuino, un mono, un ratón, una rata, un cerdo, un caballo, un perro y una vaca.

Mutaciones asociadas con la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

65

Las mutaciones en ciertos genes, tales como *NRAS*, *KRAS*, *VHL* o *BRAF* son predictivas de la capacidad de respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Ejemplos no limitativos de tales mutaciones se enumeran en las tablas 1 y 2 en el contexto de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por los respectivos genes.

5

Tabla 1: Biomarcadores mutacionales

Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación
<i>BRAF</i>	V600E	<i>NRAS</i>	Q61H	<i>VHL</i>	H115Y	<i>VHL</i>	P40S
<i>BRAF</i>	V600K	<i>NRAS</i>	G12C	<i>VHL</i>	Y175fs*27	<i>VHL</i>	E41V
<i>BRAF</i>	K601E	<i>NRAS</i>	G13R	<i>VHL</i>	R82P	<i>VHL</i>	E51Q
<i>BRAF</i>	V600R	<i>NRAS</i>	G12V	<i>VHL</i>	L158P	<i>VHL</i>	P95R
<i>BRAF</i>	D594G	<i>NRAS</i>	G13V	<i>VHL</i>	N90I	<i>VHL</i>	V62fs*68
<i>BRAF</i>	V600D	<i>NRAS</i>	G12A	<i>VHL</i>	T157fs*2	<i>VHL</i>	N131fs*28
<i>BRAF</i>	V600M	<i>NRAS</i>	G13C	<i>VHL</i>	D126G	<i>VHL</i>	N131fs*27
<i>BRAF</i>	G469A	<i>NRAS</i>	Q61P	<i>VHL</i>	L89R	<i>VHL</i>	V137fs*22
<i>BRAF</i>	V600A	<i>NRAS</i>	G13A	<i>VHL</i>	P86H	<i>VHL</i>	S139S
<i>BRAF</i>	V600G	<i>NRAS</i>	G12R	<i>VHL</i>	L135fs*24	<i>VHL</i>	P146fs*13
<i>BRAF</i>	G466V	<i>NRAS</i>	A18T	<i>VHL</i>	C162Y	<i>VHL</i>	V166G
<i>BRAF</i>	G469V	<i>NRAS</i>	Q61E	<i>VHL</i>	F148fs*11	<i>VHL</i>	D187_L188del
<i>BRAF</i>	V600_K601> E	<i>NRAS</i>	G60E	<i>VHL</i>	G144fs*14	<i>VHL</i>	L188Q
<i>BRAF</i>	L597S	<i>NRAS</i>	G13S	<i>VHL</i>	P61P	<i>VHL</i>	M1fs*20
<i>BRAF</i>	L597V	<i>NRAS</i>	G12G	<i>VHL</i>	F136fs*23	<i>VHL</i>	T157T
<i>BRAF</i>	G464E	<i>NRAS</i>	G13G	<i>VHL</i>	S168fs*2	<i>VHL</i>	S111S
<i>BRAF</i>	G464V	<i>NRAS</i>	Q61Q	<i>VHL</i>	D187fs*27	<i>VHL</i>	W88C
<i>BRAF</i>	D594N	<i>NRAS</i>	S65C	<i>VHL</i>	R107fs*52	<i>VHL</i>	D179fs*23
<i>BRAF</i>	F595L	<i>NRAS</i>	A11T	<i>VHL</i>	T133fs*26	<i>VHL</i>	N150fs*9
<i>BRAF</i>	L597Q	<i>NRAS</i>	T58I	<i>VHL</i>	W117*	<i>VHL</i>	V155fs*4
<i>BRAF</i>	A598_T599in sV	<i>NRAS</i>	R68T	<i>VHL</i>	R177*	<i>VHL</i>	N150fs*9
<i>BRAF</i>	G469R	<i>VHL</i>	P81S	<i>VHL</i>	Q73*	<i>VHL</i>	N78S
<i>BRAF</i>	G469S	<i>VHL</i>	S68*	<i>VHL</i>	W88R	<i>VHL</i>	N174fs*28
<i>BRAF</i>	L597R	<i>VHL</i>	L89H	<i>VHL</i>	N141fs*3	<i>VHL</i>	N90fs*69
<i>BRAF</i>	G466E	<i>VHL</i>	F148fs*11	<i>VHL</i>	R161P	<i>VHL</i>	Y98F
<i>BRAF</i>	G469E	<i>VHL</i>	S65L	<i>VHL</i>	E189K	<i>VHL</i>	T124fs*35
<i>BRAF</i>	Y472S	<i>VHL</i>	R161*	<i>VHL</i>	I151T	<i>VHL</i>	V155fs*4
<i>BRAF</i>	T599I	<i>VHL</i>	S80R	<i>VHL</i>	Y98fs*61	<i>VHL</i>	V166D
<i>BRAF</i>	K601N	<i>VHL</i>	V130L	<i>VHL</i>	V137fs*7	<i>VHL</i>	Y175D
<i>BRAF</i>	K601del	<i>VHL</i>	L158V	<i>VHL</i>	F119L	<i>VHL</i>	N193fs*22
<i>BRAF</i>	A598V	<i>VHL</i>	S72fs*87	<i>VHL</i>	C162R	<i>VHL</i>	W88R
<i>BRAF</i>	T599_R603>I	<i>VHL</i>	S65*	<i>VHL</i>	Q164P	<i>VHL</i>	Y98*
<i>BRAF</i>	T599_V600>I AL	<i>VHL</i>	L158Q	<i>VHL</i>	A149fs*26	<i>VHL</i>	A122E
<i>BRAF</i>	Q612*	<i>VHL</i>	I151S	<i>VHL</i>	G144*	<i>VHL</i>	P146P
<i>KRAS</i>	G12D	<i>VHL</i>	Q96*	<i>VHL</i>	L128P	<i>VHL</i>	G104fs*23
<i>KRAS</i>	G12V	<i>VHL</i>	V62fs*5	<i>VHL</i>	S111N	<i>VHL</i>	D121G
<i>KRAS</i>	G13D	<i>VHL</i>	E70*	<i>VHL</i>	G114R	<i>VHL</i>	C162W
<i>KRAS</i>	G12C	<i>VHL</i>	L85P	<i>VHL</i>	S80N	<i>VHL</i>	R200W

Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación
KRAS	G12A	VHL	S183*	VHL	V155L	VHL	T157I
KRAS	G12S	VHL	G114C	VHL	N131fs*28	VHL	P86L
KRAS	G12R	VHL	H115N	VHL	R58fs*9	VHL	V142fs*17
KRAS	G13C	VHL	L169P	VHL	W117R	VHL	E160*
KRAS	Q61H	VHL	F76del	VHL	N78I	VHL	N78H
KRAS	G13S	VHL	A56fs*11	VHL	R108fs*51	VHL	V155M
KRAS	Q61L	VHL	A149fs*25	VHL	P172fs*30	VHL	V142fs*17
KRAS	G13R	VHL	E160K	VHL	E10G	VHL	L101P
KRAS	Q61R	VHL	Q132*	VHL	E12K	VHL	P154L
KRAS	A146T	VHL	Q195*	VHL	L153fs*6	VHL	I151N
KRAS	G12F	VHL	P172fs*30	VHL	L101L	VHL	F136V
KRAS	G13V	VHL	L153P	VHL	V87_W88d el	VHL	N131fs*2
KRAS	G13A	VHL	Y175fs*27	VHL	L128R	VHL	P86S
KRAS	Q61K	VHL	Q164*	VHL	M1I	VHL	S111G
KRAS	L19F	VHL	G144fs*15	VHL	G39S	VHL	I151M
KRAS	Q61P	VHL	L128fs*31	VHL	E134*	VHL	Y185*
KRAS	G13G	VHL	V74D	VHL	K171N	VHL	R182R
KRAS	Q61E	VHL	Y175*	VHL	P138R	VHL	P59fs*8
KRAS	A146V	VHL	L184P	VHL	G114S	VHL	L169L
KRAS	V14I	VHL	N78K	VHL	G104fs*55	VHL	E186*
KRAS	A59T	VHL	P99fs*60	VHL	G104fs*55	VHL	C162F
KRAS	G12G	VHL	R167Q	VHL	W117*	VHL	L188P
KRAS	G12N	VHL	I180N	VHL	G104fs*55	VHL	K196fs*18
KRAS	K117N	VHL	W88*	VHL	L163fs*7	VHL	N131K
KRAS	G10_A11ins G	VHL	Y156fs*3	VHL	I180fs*22	VHL	S68P
KRAS	G12L	VHL	L135fs*24	VHL	P81fs*78	VHL	I109N
KRAS	Q22K	VHL	Y185fs*17	VHL	D121E	VHL	R113*
NRAS	Q61R	VHL	R167W	VHL	S139fs*20	VHL	S65W
NRAS	Q61K	VHL	L118P	VHL	N141fs*18	VHL	D121Y
NRAS	G12D	VHL	C77*	VHL	R167fs*3	VHL	E160fs*10
NRAS	G13D	VHL	Y98*	VHL	H115fs*44		
NRAS	Q61L	VHL	L89P	VHL	S65fs*2		
NRAS	G12S	VHL	L163P	VHL	S38F		

Leyenda para las mutaciones seleccionadas: V600_K601>E = aminoácidos VK se sustituyen por E; A598_T599insV = inserción de V entre A598 y T599; K601del = delección de K601; Q612* = sustitución de Q612 en el codón de terminación; y F148fs*11 = se produce desplazamiento de marco en F148 y apareció un codón de terminación tras 11 aminoácidos.

5

Tabla 2: Biomarcadores mutacionales adicionales

Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación
BRAF	D594V	BRAF	V600R	KRAS	G12C	NRAS	G12V
BRAF	D594G	BRAF	V600L	KRAS	G12D	NRAS	G12A
BRAF	F468C	BRAF	D587A	KRAS	G12F	NRAS	G12D

Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación	Gen	Mutación
<i>BRAF</i>	F595L	<i>BRAF</i>	D587E	<i>KRAS</i>	G12R	<i>NRAS</i>	G13C
<i>BRAF</i>	G464R	<i>BRAF</i>	D594E	<i>KRAS</i>	G12S	<i>NRAS</i>	G13R
<i>BRAF</i>	G464V	<i>BRAF</i>	E586K	<i>KRAS</i>	G12V	<i>NRAS</i>	G13S
<i>BRAF</i>	G464E	<i>BRAF</i>	F595S	<i>KRAS</i>	G13V	<i>NRAS</i>	G13V
<i>BRAF</i>	G466R	<i>BRAF</i>	G466V	<i>KRAS</i>	G13D	<i>NRAS</i>	G13A
<i>BRAF</i>	G469S	<i>BRAF</i>	G469A	<i>KRAS</i>	Q61E	<i>NRAS</i>	G13D
<i>BRAF</i>	G469E	<i>BRAF</i>	I592M	<i>KRAS</i>	Q61K	<i>NRAS</i>	Q61E
<i>BRAF</i>	G469A	<i>BRAF</i>	I592V	<i>KRAS</i>	Q61H	<i>NRAS</i>	Q61K
<i>BRAF</i>	G469V	<i>BRAF</i>	K601del	<i>KRAS</i>	Q61L	<i>NRAS</i>	Q61H
<i>BRAF</i>	G469R	<i>BRAF</i>	N581S	<i>KRAS</i>	Q61R	<i>NRAS</i>	Q61L
<i>BRAF</i>	G596R	<i>BRAF</i>	R444W	<i>KRAS</i>	Q61P	<i>NRAS</i>	Q61P
<i>BRAF</i>	K601E	<i>BRAF</i>	S605F	<i>KRAS</i>	A146T	<i>NRAS</i>	A18T
<i>BRAF</i>	K601N	<i>BRAF</i>	S605N	<i>KRAS</i>	G13A	<i>VHL</i>	F148fs*11
<i>BRAF</i>	L597Q	<i>BRAF</i>	T599_V600insTT	<i>KRAS</i>	G13R	<i>VHL</i>	L158Q
<i>BRAF</i>	L597V	<i>BRAF</i>	V471F	<i>KRAS</i>	L19F	<i>VHL</i>	L85P
<i>BRAF</i>	L597S	<i>BRAF</i>	V600A	<i>KRAS</i>	Q22K	<i>VHL</i>	L89H
<i>BRAF</i>	L597R	<i>BRAF</i>	V600D	<i>NRAS</i>	A18T	<i>VHL</i>	P81S
<i>BRAF</i>	T599I	<i>BRAF</i>	V600M	<i>NRAS</i>	G12C	<i>VHL</i>	R161*
<i>BRAF</i>	V600E	<i>KRAS</i>	A59T	<i>NRAS</i>	G12R	<i>VHL</i>	R167W
<i>BRAF</i>	V600K	<i>KRAS</i>	G12A	<i>NRAS</i>	G12S		

La presencia en un sujeto de una cualquiera o más de las mutaciones enumeradas en la tabla 1 y/o la tabla 2 es predictiva de que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por motivos de brevedad, cada combinación posible de mutaciones de la tabla 1 y la tabla 2 adecuada para su uso en la presente divulgación no está enumerada expresamente en el presente documento. No obstante, debe entenderse que cada combinación de este tipo está contemplada y está dentro del alcance de la presente divulgación. El sujeto puede tener una única mutación (por ejemplo, *NRAS* Q61P) o múltiples mutaciones en el mismo gen (por ejemplo, *NRAS* G12D y *NRAS* Q61R); o mutaciones individuales en múltiples genes (por ejemplo, *BRAF* V600E, *NRAS* Q61R, *KRAS* G12R y *VHL* P81S); o múltiples mutaciones en múltiples genes (por ejemplo, *NRAS* G12D, *NRAS* Q61P, *KRAS* G12R y *KRAS* Q61R); o una mezcla de mutaciones individuales en ciertos genes y múltiples mutaciones en otros genes (por ejemplo, *BRAF* V600E; *NRAS* Q61P, *NRAS* G13V; *KRAS* G12R, *KRAS* Q61R; y *VHL* P81S). Ya tan solo una mutación enumerada en la tabla 1 o la tabla 2 es útil a la hora de predecir la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). En determinadas realizaciones, la(s) mutación(es) está(n) en *NRAS*. Ejemplos no limitativos de mutaciones de *NRAS* que puedan predecir la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) son *NRAS* Q61P y *NRAS* Q61R. En otras realizaciones, la(s) mutación(es) está(n) en *NRAS* y/o *KRAS*. Ejemplos no limitativos de mutaciones de *KRAS* que puedan predecir la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) son *KRAS* G12R y *KRAS* Q61R. En otras realizaciones, la(s) mutación(es) está(n) en *NRAS* y/o *KRAS* y/o *VHL*. Un ejemplo no limitativo de una mutación de *VHL* que es predictiva de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) es P81S. En aún otras realizaciones, la(s) mutación(es) está(n) en *NRAS* y/o *KRAS* y/o *BRAF*. Un ejemplo no limitativo de una mutación de *BRAF* que es predictiva de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) es *BRAF* V600E. En otra realización, la(s) mutación(es) está(n) en *NRAS* y/o *KRAS* y/o *BRAF* y/o *VHL*.

Una o más mutaciones en genes distintos de, o además de, *NRAS*, *KRAS*, *VHL* y/o *BRAF* también pueden ser predictivas de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Los ejemplos no limitativos de tales genes incluyen *ERBB2*, *PTEN* y *MET*. Los ejemplos no limitativos de mutaciones en estos genes que pueden ser predictivas de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) incluyen *ERBB2* S779_P780insVGS, *PTEN* N323fs*2 y *MET* T1010I.T992I.

En una realización, el sujeto tiene, se sospecha del mismo que tiene o corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides (por ejemplo, cáncer de tiroides diferenciado tal como cáncer de tiroides papilar o folicular). En otra realización, el sujeto tiene, se sospecha del mismo que tiene o corre el riesgo de desarrollar un cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales).

El ácido nucleico aislado de muestras biológicas obtenidas del sujeto puede analizarse para determinar la presencia de una o más de las mutaciones enumeradas en la tabla 1 y/o la tabla 2. Métodos de identificación de mutaciones en un ácido nucleico se conocen ampliamente en la técnica. Un método de valoración de si un sujeto tiene una mutación en cualquiera de los genes de interés es el método descrito en el ejemplo 1, específicamente, el uso de paneles de mutación de OncoCarta™ Sequenom. Otros métodos no limitativos para determinar si un gen o ácido nucleico de interés contiene una mutación incluyen: secuenciación Sanger (método de terminación de cadena), secuencia masiva paralela de la firma (MPSS), secuenciación Polony, pirosecuenciación 454, secuenciación Illumina, secuenciación SOLiD, secuenciación por semiconductores iónicos, secuenciación de nanoesferas de ADN, y el sistema de detección de múltiples mutaciones simultáneas (SMMD) que utiliza un chip de red electroquímica y ferrocenil-naftalenodiimida (FND) (véase, Wakai *et al.*, Nucl. Acids. Res., 32(18):e141 (2004).

Las proteínas de interés también pueden aislarse de las muestras biológicas del sujeto y analizarse para determinar la presencia de mutaciones tales como las dadas a conocer anteriormente. Métodos de secuenciación de proteínas se conocen ampliamente en la técnica. Los ejemplos no limitativos de tales métodos incluyen espectrometría de masas y la reacción de degradación de Edman. La secuenciación de proteínas puede llevarse a cabo en la forma tanto de análisis de proteínas completas como de análisis de péptidos producidos enzimáticamente mediante espectrometría de masas (véase, Chait, Science. 314(5796):65-6 (2006)). La espectrometría de masas en tándem (MS/MS), tal como disociación inducida por colisión (CID) (4), es una técnica clave para la secuenciación de proteínas o péptidos. En este método, iones de péptido/proteína en fase gaseosa que se generan mediante una fuente de iones se calientan internamente mediante múltiples colisiones con átomos de gases raros. Esto conduce a la fragmentación de la estructura principal peptídica del enlace C-N dando como resultado una generación de series de iones fragmentados. La información de secuencia puede leerse a partir de la serie de iones fragmentados.

Las muestras biológicas que se usan para obtener el ácido nucleico o la proteína para su análisis incluyen, pero no se limitan a, una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, células tumorales en circulación, ADN en circulación, una muestra de orina, una muestra de tejido de tiroides, una muestra de nódulo tiroideo, una muestra de tejido renal o una muestra de tumor.

Tioglobulina como biomarcador para la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

Además de los biomarcadores de mutación descritos anteriormente, también puede usarse la tioglobulina como biomarcador eficaz. La tioglobulina es la principal proteína encontrada en el coloide tiroideo y es fundamental para la fisiología de la tiroides, funcionando tanto como prohormona como como sitio de almacenamiento para hormonas tiroideas. El nivel de expresión de tioglobulina puede usarse para determinar si un sujeto (por ejemplo, uno que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides diferenciado) tendrá más probabilidad o menos probabilidad de responder a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Además, el nivel de expresión de tioglobulina también puede usarse para valorar o evaluar si un sujeto al que ya se le está administrando una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) debe continuar con o terminar la terapia.

Para valorar si un sujeto responderá eficazmente a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o para evaluar el tratamiento continuado con esta terapia, puede emplearse el siguiente método. Una muestra biológica (por ejemplo, muestra de sangre, suero o plasma) se obtiene del sujeto tanto antes como después de la administración de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Se calcula la razón del nivel de expresión de tioglobulina en las dos muestras (concentración de tioglobulina tras la administración de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo/concentración de tioglobulina antes de la administración de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo). Si la razón de las muestras del sujeto de prueba es menor que el control, se determina que el sujeto tiene probabilidad de responder al lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), mientras que si la razón de las muestras del sujeto de prueba es mayor que o aproximadamente igual a (al menos el 90% pero menos del 100% de) la del control, se determina que el sujeto tiene menos probabilidad de responder al lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Si se predice que el sujeto responderá al tratamiento, se recomienda continuar con la terapia con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En el contexto del ensayo anterior, el término "control" significa muestras obtenidas pre- y postratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la misma fuente (por ejemplo, muestra de sangre, suero o plasma) que la de las muestras de prueba y que se toman en los mismos, o sustancialmente los mismos, puntos de tiempo de un(os) sujeto(s) control que las muestras de prueba, de un sujeto (o sujetos) que no ha respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). El término "control" incluye muestras

obtenidas en el pasado (pre- y postratamiento con la terapia) y usadas como referencia para comparaciones futuras con muestras de prueba tomadas de sujetos para los que debe predecirse capacidad de respuesta terapéutica. Por ejemplo, el “control” puede establecerse previamente mediante un análisis de la expresión de tiroglobulina pre- y postratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) en uno o más sujetos que no han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Esta razón de referencia preestablecida (que puede ser una razón promedio o mediana tomada de múltiples sujetos que no han respondido a la terapia) puede usarse entonces para la razón de “control” en la comparación con la muestra de prueba.

El “control” puede establecerse previamente de manera alternativa mediante un análisis de la expresión de tiroglobulina en uno o más sujetos que han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Esta razón de referencia preestablecida (que puede ser una razón promedio o mediana tomada de múltiples sujetos que han respondido a la terapia) puede usarse entonces como la razón “control” en la comparación con la muestra de prueba. En una comparación de este tipo, se predice que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) si la razón de niveles de tiroglobulina es comparable a o menor que, por ejemplo, es menor que, igual que o aproximadamente igual que (al menos el 90% pero menos del 100% de), la razón de referencia preestablecida.

En el método anterior, la primera muestra biológica puede tomarse en cualquier punto de tiempo antes del tratamiento con el lenvatinib de terapia o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, la primera muestra biológica puede tomarse minutos, horas, días, semanas o meses antes del inicio de la terapia, o sustancialmente al mismo tiempo que el inicio de la terapia. La segunda muestra biológica también puede tomarse del sujeto en cualquier punto de tiempo tras el inicio del tratamiento con el lenvatinib de terapia o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, la segunda muestra biológica puede tomarse minutos, horas, días, semanas o meses tras el tratamiento con el lenvatinib de terapia o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Los ejemplos no limitativos de los puntos de tiempo en los que se toma la segunda muestra biológica incluyen: de 1 semana a 9 meses, de 2 semanas a 9 meses, de 3 semanas a 9 meses después, de 4 semanas a 9 meses después, de 1 día a 2 semanas después, de 2 días a 2 semanas después, de 3 días a 2 semanas después, de 4 días a 2 semanas después, de 5 días a 2 semanas después, de 6 días a 2 semanas después, de 1 semana a 2 semanas después, de 1 semana a 3 semanas después, de 1 semana a 4 semanas después y de 1 semana a 5 semanas después, del inicio del tratamiento con el lenvatinib de terapia o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los niveles de tiroglobulina pueden determinarse midiendo o bien los niveles de ARNm o bien los niveles de proteína. Métodos de medición de los niveles de ARNm y de proteína se conocen ampliamente en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. (Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Real-time PCR applications guide. Bio-Rad Bulletin 5279 (n.º de catálogo 170-9799)).

En determinadas realizaciones, se determina que un sujeto responde al lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), si el sujeto muestra una respuesta parcial posterior al tratamiento con la terapia. “Respuesta parcial” significa al menos el 30% de disminución en la suma del diámetro más largo (LD, *longest diameter*) de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado de referencia. En algunas realizaciones, se determina que un sujeto responde al lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), si el sujeto muestra un encogimiento del tumor posterior al tratamiento con la terapia. “Encogimiento del tumor” (TS, *tumor shrinkage*) significa el cambio porcentual de la suma de diámetros de lesiones diana, tomando como referencia los diámetros de suma de referencia. En otras realizaciones, se determina que un sujeto responde al lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), si el sujeto muestra supervivencia libre de progresión. La “supervivencia libre de progresión” (PFS) se refiere al periodo desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la última fecha antes de entrar en el estado de enfermedad progresiva (PD, *progressive disease*). PD significa al menos el 20% de aumento en la suma del LD de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde que empezó el tratamiento, o la aparición de una o más nuevas lesiones.

Una mayor disminución en los niveles de tiroglobulina posteriores al tratamiento con respecto a los niveles previos al tratamiento en comparación con un control (por ejemplo, muestras pre- y postratamiento obtenidas de un sujeto que no responde a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) es predictiva de una respuesta parcial a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) en pacientes con cáncer de tiroides diferenciado.

Una disminución en los niveles de tiroglobulina aproximadamente 28 días (por ejemplo, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 días) tras el tratamiento con una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) es predictiva de supervivencia libre de progresión en pacientes con cáncer de tiroides diferenciado.

Una disminución en los niveles de tiroglobulina aproximadamente 56 días después, aproximadamente 84 días después, aproximadamente 112 días después y aproximadamente 140 días después del tratamiento con una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) es predictiva de encogimiento del tumor en pacientes con cáncer de tiroides diferenciado.

5 Citocina, quimiocina y factores angiogénicos como biomarcadores para la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

10 Se han identificado varios genes cuyos niveles de expresión (por ejemplo, niveles de expresión de ARNm o de proteína) son útiles a la hora de predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Estos genes identificados mediante ID de gen, URL relacionada, ID de proteína y n.^{os} de registro UniProtKB se enumeran en la tabla 3.

15 **Tabla 3:** Lista de biomarcadores sanguíneos

Símbolo génico oficial	ID de gen	URL	Símbolo alternativo*	N.º de registro UniProtKB
ANGPT1	284	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/284	Ang-1/Ang1	Q5HYA0
ANGPT2	285	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/285	Ang-2/ANG-2/Ang2/ANG2 (90)/ANG290	O15123
CCL11	6356	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6356	Eotaxina	P51671
FGF2	2247	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2247	FGF-2/FGF2(79)/FGF279	P09038
FGF23	8074	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8074	FGF-23	Q9GZV9
FGF4	2249	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2249	FGF4 (75)/FGF475	P08620
CSF2	1437	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1437	GM-CSF/GMCSF	P04141
IFNG	3458	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3458	IFN-g/IFN-γ	P01579
IL10	3586	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3586	IL-10	P22301
IL12A (p35)	3592	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3592	IL12A	P29459
IL12B (p40)	3593	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3593	IL12B/IL12(p40)/IL-12(p40)	P29460
IL13	3596	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3596	IL-13	P35225
IL17A	3605	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3605	IL-17	Q16552
IL1A	3552	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3552	IL-1a/IL-1α	P01583
IL1B	3553	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553	IL-1b/IL-1β	P01584
IL2	3558	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3558	IL-2	P60568
IL5	3567	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3567	IL-5	P05113
IL6	3569	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569	IL-6	P05231
IL8	3576	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3576	IL-8	P10145
CXCL10	3627	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3627	IP-10	P02778
CCL2	6347	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6347	MCP-1	P13500
CCL3	6348	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6348	MIP-1a/MIP1a/MIP-1α	P10147
CCL4	6351	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6351	MIP-1b/MIP1b/MIP-1β	P13236
CCL5	6352	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6352	RANTES	P13501
CD40LG	959	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/959	sCD40L	P29965
CXCL12	6387	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6387	SDF-1a/SDF1a	P48061
KDR	3791	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3791	sVEGFR2	P35968
TEK	7010	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7010	Tie-2	Q02763
TNF	7124	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7124	TNFα/TNF-α	P01375
FIGF	2277	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2277	VEGFD (78)	043915
EGF	1950	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1950	EGF (80)	P01133

Símbolo génico oficial	ID de gen	URL	Símbolo alternativo*	N.º de registro UniProtKB
FLT3LG	2323	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2323	FLT3 LG (89)	P49771
CSF3	1440	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1440	G-CSF/GCSF	P09919
HGF	3082	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3082	HGF (86)	P14210
IL15	3600	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3600	IL-15	P40933
IL1RN	3557	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3557	IL-1ra	P18510
IL4	3565	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3565	IL-4	P05112
IL7	3574	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3574	IL-7	P13232
PDGFA	5154	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5154	PDGFA	P04085
PDGFB	5155	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5155	PDGFB	P01127
PGF	5228	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5228	PGF (91)	P49763
FLT1	2321	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2321	sVEGFR1	P17948
FLT4	2324	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2324	sVEGFR3	P35916
TGFA	7039	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7039	TGF α /TGF- α	P01135
VEGFA	7422	www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7422	VEGF/VEGFA (100)/VEGFA100	P15692

*Otros símbolos alternativos

PDGF-AA (símbolo alternativo PDGFAA); homodímero de PDGFA

PDGF-AB (símbolo alternativo PDGFAB); heterodímero de PDGFA y PDGFB

PDGF-BB (símbolo alternativo PDGFBB); homodímero de PDGFB

IL-12p70; heterodímero de IL12A(p35) e IL12B(p40)

Un nivel de expresión (por ejemplo, expresión de ARNm o de proteína) bajo (en comparación con un control) de ciertos genes enumerados en la tabla 3 es indicativo/predictivo de que un sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, concentraciones bajas (en comparación con un control) de ANGPT2, VEGFA, IFNG y KDR en una muestra biológica obtenida de un sujeto antes del tratamiento con la terapia son predictivas de que un sujeto dado responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). En este contexto, el término "control" incluye una muestra (del mismo tejido) obtenida de un sujeto del que se sabe que no responde a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). El término "control" también incluye una muestra obtenida en el pasado y usada como referencia para comparaciones futuras con muestras de prueba tomadas de sujetos para los que debe predecirse capacidad de respuesta terapéutica. Por ejemplo, el nivel de expresión "control" para un gen particular en un tipo celular o tejido particular puede establecerse previamente mediante un análisis de expresión génica en uno o más sujetos que no han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Este valor de referencia establecido previamente (que puede ser un nivel de expresión promedio o mediano tomado de múltiples sujetos que han respondido a la terapia) puede usarse entonces para el nivel de expresión "control" en la comparación con la muestra de prueba. El nivel de expresión "control" para un gen particular en un tipo celular o tejido particular puede establecerse previamente de manera alternativa mediante un análisis de expresión génica en uno o más sujetos que han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Este valor de referencia establecido previamente (que puede ser un nivel de expresión promedio o mediano tomado de múltiples sujetos que han respondido a la terapia) puede usarse entonces como nivel de expresión "control" en la comparación con la muestra de prueba. En una comparación de este tipo, se predice que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) si el nivel de expresión del gen que está analizándose es comparable a o menor que, por ejemplo, es menor que, igual que o aproximadamente igual que (al menos el 85% pero menos del 100% de), la referencia establecida previamente.

Un nivel de expresión (por ejemplo, expresión de ARNm o de proteína) alto (en comparación con un control) de ciertos genes enumerados en la tabla 3 es predictivo de que un sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, concentraciones altas (en comparación con un control) de PDGF-AB, FGF2, CSF3, IL6, IL13, FLT4, CCL3 y CCL4 en una muestra biológica obtenida de un sujeto antes del tratamiento con la terapia son predictivas de que un sujeto dado responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). En este contexto, el término "control" es idéntico al descrito en el párrafo anterior,

excepto que cuando el nivel de expresión “control” para un gen particular en un tipo celular o tejido particular se establece previamente de manera alternativa mediante un análisis de expresión génica en uno o más sujetos que han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), se predice que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) si el nivel de expresión del gen que está analizándose es comparable a o mayor que, por ejemplo es mayor que, igual que, o aproximadamente igual que (al menos 85% pero menos del 100% de), la referencia establecida previamente.

También está previsto que se administre a sujetos lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) durante cortos periodos de tiempo para determinar si la terapia administrada será eficaz para el sujeto. La determinación de la eficacia de la terapia se hace basándose en los niveles de expresión (por ejemplo, expresión de ARNm o de proteína) de ciertos genes en muestras biológicas obtenidas de estos sujetos en puntos de tiempo diferentes posteriores al tratamiento. Basándose en los niveles de expresión de estos genes, puede predecirse si el sujeto responderá a un tratamiento continuado. Por tanto, estos métodos son útiles a la hora de valorar o evaluar si es recomendable continuar con la administración de lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, concentraciones bajas (en comparación con un control) de ciertos genes, por ejemplo, ANGPT2 y/o IL13 de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) son predictivas de que el sujeto tendrá un desenlace clínico beneficioso (por ejemplo, respuesta del tumor y/o encogimiento del tumor) tras una terapia continuada con compuestos de lenvatinib. De manera similar, concentraciones altas (en comparación con un control) de ciertos genes, por ejemplo, IL10 y/o CXCL12 de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) también son predictivas de que el sujeto tendrá un desenlace clínico beneficioso (por ejemplo, respuesta del tumor y/o encogimiento del tumor) tras una terapia continuada con compuestos de lenvatinib.

Además, concentraciones bajas (en comparación con un control) de ciertos genes, por ejemplo, VEGFA, IL6 y/o PGF aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) son predictivas de que el sujeto tendrá un desenlace clínico beneficioso (por ejemplo, respuesta del tumor y/o encogimiento del tumor) tras una terapia continuada con compuestos de lenvatinib. Además, concentraciones altas (en comparación con un control) de ciertos genes, por ejemplo, CCL5 aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) son predictivas de que el sujeto tendrá un desenlace clínico beneficioso (por ejemplo, respuesta del tumor y/o encogimiento del tumor) tras una terapia continuada con compuestos de lenvatinib.

La razón del nivel de expresión (por ejemplo, expresión de ARNm o de proteína) de ciertos genes posterior al tratamiento con respecto al previo al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (en comparación con un control) también puede ser útil a la hora de predecir si un sujeto tendrá un desenlace clínico beneficioso (por ejemplo, mejor respuesta global, encogimiento del tumor, supervivencia libre de progresión) tras una terapia continuada con compuestos de lenvatinib. Por ejemplo, una razón reducida, en comparación con un control, del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, CCL5, FLT3LG, IL12(p40), EGF, PDGF-BB, PDGF-AA, CSF3, FLT1, TEK, HGF, VEGFA o IL6 es indicativa de que el sujeto responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, una razón aumentada, en comparación con un control, de la concentración de ciertos genes, por ejemplo, CSF2, FIGF, IL1RN, CCL11, IL1A, TGFA, PGF, PDGF AB, IL10 o FGF2 es predictiva de que el sujeto responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una razón reducida (en comparación con un control) del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, CCL5, FLT3LG basándose en la expresión de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto tendrá supervivencia libre de progresión.

Una razón aumentada (en comparación con un control) del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, CSF3 o FGF2 basándose en la expresión de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto tendrá respuesta del tumor.

Una razón aumentada (en comparación con un control) del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, CSF3, IL10 o FGF2 basándose en la expresión de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto mostrará encogimiento del tumor.

Una razón aumentada (en comparación con un control) del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, FIGF, ILIRN, PDGFAB o IL10 basándose en la expresión de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto tendrá supervivencia libre de progresión.

Una razón reducida del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, FLT3LG, IL12, EGF, PDGFBB, PDGFAA, CSF3 o FLT1 basándose en la expresión aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto tendrá supervivencia libre de progresión.

Una razón aumentada del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, CCL11 basándose en la expresión aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto presentará respuesta del tumor.

Una razón aumentada del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, IL1A o TGFA basándose en la expresión aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen antes del inicio de esta terapia es predictiva de que el sujeto presentará encogimiento del tumor.

Una razón reducida del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, FLT1, TEK, VEGFA o IL6 basándose en la expresión aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto presentará encogimiento del tumor.

Una razón reducida del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, TEK, HGF o VEGFA basándose en la expresión aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de esta terapia es predictiva de que el sujeto mostrará la mejor respuesta global.

Una razón aumentada del nivel de expresión de ciertos genes, por ejemplo, PGF basándose en la expresión aproximadamente 5 semanas (por ejemplo, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas) tras el inicio de terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y el nivel de expresión del mismo gen de aproximadamente 5 días a aproximadamente 18 días tras el inicio de esta terapia es indicativa de que el sujeto presentará encogimiento del tumor, mientras que una razón aumentada en las mismas condiciones de, por ejemplo, FGF2 es predictiva de que el sujeto presentará una respuesta del tumor.

La supervivencia libre de progresión observada anteriormente puede ser, por ejemplo, de 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses o 24 meses, o aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 13 meses, aproximadamente 14 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 15 meses, aproximadamente 17 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 19 meses, aproximadamente 20 meses, aproximadamente 21 meses, aproximadamente 22 meses, aproximadamente 23 meses o aproximadamente 24 meses.

A la hora de determinar si la razón está aumentada o disminuida se hace una comparación con un control. En este contexto, el término "control" incluye muestras obtenidas de la misma fuente (por ejemplo, muestra de sangre, suero o plasma) que la de las muestras de prueba y que se toman en los mismos, o sustancialmente los mismos, puntos de tiempo que las muestras de prueba, de un sujeto (o sujetos) que no ha respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). El término "control" incluye muestras obtenidas en el pasado (previamente y posteriormente al tratamiento con la terapia) y usadas como referencia para comparaciones futuras con muestras de prueba tomadas de sujetos para los que debe predecirse capacidad de respuesta terapéutica. Por ejemplo, el "control" puede ser una razón establecida previamente de la expresión del gen de interés previamente y posteriormente al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) en uno o más sujetos que no han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

Esta razón de referencia preestablecida (que puede ser una razón promedio o mediana tomada de múltiples sujetos que no han respondido a la terapia) puede usarse entonces para la razón "control" en la comparación con la muestra de prueba.

- 5 El "control" puede establecerse previamente de manera alternativa mediante un análisis de expresión del gen de interés en uno o más sujetos que han respondido al tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Esta razón de referencia preestablecida (que puede ser una razón promedio o mediana tomada de múltiples sujetos que han respondido a la terapia) puede usarse entonces como razón "control" en la comparación con la muestra de prueba. En una comparación de este tipo, se predice que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) si la razón de niveles de expresión del gen es comparable a, por ejemplo, igual a o aproximadamente igual a (al menos el 90% pero menos del 100% de), la razón de referencia preestablecida.

Métodos combinatorios

- 15 Cualquiera de los biomarcadores anteriores puede valorarse en combinación para determinar si un sujeto responderá a, o se beneficiará de una administración continuada de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por ejemplo, uno cualquiera o más de los biomarcadores de mutación pueden valorarse en combinación con las razones de expresión y/o niveles de expresión de tiroglobulina o razones de expresión de citocina, quimiocina o factores angiogénicos, y/o análisis histológico. En algunos casos, un(os) biomarcador(es) mutacional(es) se valora en combinación con análisis histológico. En otros casos, un(os) biomarcador(es) mutacional(es) se valora en combinación con las razones de expresión de tiroglobulina. En algunos casos, un(os) biomarcador(es) mutacional(es) se valora en combinación con niveles de expresión o razones de expresión de uno o más de citocina, quimiocina, o factores angiogénicos. En una realización, el estado mutacional de NRAS se valora en la muestra biológica obtenida del sujeto y considerada en combinación con concentraciones pretratamiento de ANGPT2. En otra realización, el estado mutacional de NRAS o KRAS se valora en la muestra biológica obtenida del sujeto y considerada en combinación con concentraciones pretratamiento de ANGPT2. Tales análisis de biomarcadores combinatorios proporcionan un valor predictivo incluso más fuerte que el estudio de biomarcadores individuales, y son útiles, por ejemplo, a la hora de predecir la capacidad de respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

- Puede usarse análisis estadístico para determinar qué marcadores cuando se usan en combinación están más asociados con un desenlace clínico deseado que los marcadores individuales. Un ejemplo no limitativo de un análisis de este tipo se proporciona en el ejemplo 4 de esta solicitud.

- La combinación de los niveles de expresión de VEGFA y ANGPT2 antes del inicio de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) ("pretratamiento") puede ser un mejor factor de pronóstico de respuesta a la terapia que cada uno de estos biomarcadores sanguíneos individuales. Por ejemplo, si las concentraciones de pretratamiento de VEGFA y ANGPT2 en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(0,000261) * (\text{Ang2}) + (0,00126) * (\text{VEGFA100}) - (1,09) < -0,24$$

- 45 convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< -0,24$ (por ejemplo, $-1,0$)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) tras tomar la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos cuyas concentraciones de estos factores no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra). Para otro ejemplo, si las concentraciones de pretratamiento de VEGFA, ANGPT2 y GCSF en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(0,000591) * (\text{ANG290}) + (-0,0178) * (\text{GCSF}) + (0,00142) * (\text{VEGFA100}) - (-0,671) < 0,651$$

- 55 convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 0,651$), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) tras tomar la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos cuyas concentraciones pretratamiento de estos factores no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

Para un ejemplo adicional, si las concentraciones de pretratamiento de IL13 y MIP1a en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(-0,0459) * (\text{IL13}) + (0,0459) * (\text{MIP1a}) - (0,0395) < 0,268$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 0,268$), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) tras tomar la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos cuyas concentraciones de estos factores no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

Para un ejemplo adicional, si las concentraciones de pretratamiento IL13, MIP1a y MIP1b en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(-0,0353)*(IL13) + (0,0713)*(MIP1a) + (-0,0154)*(MIP1b) - (0,188) < 0,222$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 0,222$), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) tras tomar la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos cuyas concentraciones pretratamiento de estos factores no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

La combinación de una(s) mutación(es) y los niveles de expresión de VEGFA y MIP1b antes del inicio de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) ("pretratamiento") también puede ser un mejor factor de pronóstico de respuesta a la terapia que cada uno de estos biomarcadores mutacionales y sanguíneos individuales. Por ejemplo, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de VEGFA y MIP1b en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(-0,025)*(MIP1b) + (-0,00616)*(VEGFA100) + (3,32)*D(NRAS, WT) - (-0,52) < 1,81$$

(La función $D(g, s)$ es 1 cuando el estado de mutación del/de los gene(s) g es el estado s , y 0 cuando g no es s . El estado s puede ser "WT" (tipo silvestre, *wild type*) o "MU" (mutación). Para el caso de múltiples genes, el estado de mutación es "MU" si uno o más genes tienen mutación y "WT" solo para el caso en el que todos los genes sean de tipo silvestre)

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 1,81$ (por ejemplo, 1,0)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de VEGFA y MIP1b no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

Para otro ejemplo, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de VEGFA, MIP1b y sVEGFR3 en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(-0,0494)*(MIP1b) + (-0,000472)*(sVEGFR3) + (-0,0119)*(VEGFA100) + (4,66)*D(NRAS,WT) - (-5,9) < 3,55$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 3,55$ (por ejemplo, 3,0)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de VEGFA, MIP1b y sVEGFR3 no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

Para un ejemplo adicional, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de VEGFA, MIP1b, sVEGFR3 y Ang2 en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

$$(0,00148)*(Ang2) + (-0,0606)*(MIP1b) + (-0,000917)*(sVEGFR3) + (-0,0177)*(VEGFA100) + (6,58)*D(NRAS,WT) - (-5,78) < 3,97$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 3,97$ (por ejemplo, 3,0)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de VEGFA, MIP1b, sVEGFR3 y Ang2 no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

Para un ejemplo adicional, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de Ang2 en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

5

$$(0,000751)*(Ang2) + (2,69)*D(NRAS,WT) - (3,92) < 0,716$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 0,716$ (por ejemplo, 0,5)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de Ang2 no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

10

15 Para un ejemplo adicional, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de ANG2(90) en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

20

$$(0,000972)*(ANG290) + (2,75)*D(NRAS,WT) - (2,96) < 0,633$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 0,633$ (por ejemplo, 0,5)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de ANG2(90) no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

25

Para otro ejemplo, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS o KRAS (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de ANG2(90) en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

30

$$(0,000869)*(ANG290) + (2,16)*D(KRASNRAS,WT) - (2,24) < 0,508$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 0,508$ (por ejemplo, 0,4)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS de tipo silvestre o KRAS y cuyas concentraciones pretratamiento de ANG2(90) no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

40

Para otro ejemplo, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS, KRAS o BRAF (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de MIP1a en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

45

$$(-0,0281)*(MIP1a) + (2,19)*D(BRAFKRASNRAS, WT) - (-0,41) < -0,0348$$

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< -0,0348$ (por ejemplo, -1,0)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS o KRAS o BRAF de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de MIP1a no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

50

Para otro ejemplo, si la muestra del sujeto tiene una mutación en NRAS, KRAS o BRAF (por ejemplo, una de las enumeradas en la tabla 1 o 2) y las concentraciones de pretratamiento de IL6, VEGFA, MIP1a y MIP1b en un sujeto cuando se introducen en la siguiente fórmula de predicción:

55

$$(0,126)*(IL6) + (-0,193)*(MIP1a) + (-0,0775)*(MIP1b) + (-0,0514)*(VEGFA100) + (7,94)*D(BRAFKRASNRAS,WT) - (-14,4) < 4,69$$

60

convierten esta fórmula en verdadera (es decir si el valor es $< 4,69$ (por ejemplo, 3,0)), entonces se predice que el sujeto tiene un desenlace clínico más fuerte (por ejemplo, supervivencia libre de progresión) con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) que los sujetos que tienen NRAS o KRAS o BRAF de tipo silvestre y cuyas concentraciones pretratamiento de IL6, VEGFA, MIP1a y MIP1b no satisfacen la fórmula (las pendientes, las inserciones y el valor de punto de corte en la fórmula pueden optimizarse de manera diferente cuando se analiza una población diferente de la muestra).

65

Muestras biológicas

Las muestras biológicas adecuadas para los métodos descritos en el presente documento incluyen cualquier fluido biológico, célula, tejido o fracción del mismo, que incluye biomoléculas de analito de interés, tal como ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARNm) o proteína. Una muestra biológica puede ser, por ejemplo, un espécimen obtenido de un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) o puede derivarse de un sujeto de este tipo. Por ejemplo, una muestra puede ser una sección de tejido obtenida mediante biopsia, o células que se ponen en o se adaptan a cultivo de tejido. Una muestra biológica también puede ser un fluido biológico, tal como orina, sangre, plasma, suero, saliva, semen, esputo, fluido cerebroespinal, lágrimas o moco, o una muestra de este tipo absorbida sobre un sustrato (por ejemplo, vidrio, polímero, papel). Una muestra biológica también puede incluir una muestra de tejido de tiroides, una muestra de tejido renal, una muestra de tumor, células tumorales en circulación y ADN en circulación. En realizaciones específicas, la muestra biológica es una(s) célula(s) tumoral(es) o una(s) célula(s) obtenida(s) de una región del sujeto del que se sospecha que contiene un tumor o una lesión precancerosa. Una muestra biológica puede ser una muestra de tumor de tiroides o una muestra de tumor renal. Una muestra biológica puede fraccionarse adicionalmente, si se desea, hasta una fracción que contiene tipos celulares particulares. Por ejemplo, una muestra de sangre puede fraccionarse en suero o en fracciones que contienen tipos particulares 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 de fluido.

Las muestras biológicas pueden obtenerse de un sujeto, por ejemplo, un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar, un cáncer. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene un cáncer de tiroides. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un cáncer de tiroides diferenciado (por ejemplo, cáncer de tiroides papilar, cáncer de tiroides folicular). En otras realizaciones, el sujeto tiene un cáncer de tiroides medular. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene un cáncer de riñón. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un carcinoma de células renales. Puede emplearse cualquier método adecuado para obtener las muestras biológicas, aunque los métodos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, extracción de sangre, hisopo (por ejemplo, hisopo bucal) o procedimiento de biopsia con aspiración con aguja fina. Los ejemplos no limitativos de tejidos susceptibles de aspiración con aguja fina incluyen ganglio linfático, pulmón, tiroides, mama, piel e hígado. También puede recogerse muestras, por ejemplo, mediante microdissección (por ejemplo, microdissección por captura láser (LCM) o microdissección láser (LMD)).

Métodos para obtener y/o almacenar muestras que conservan la actividad o integridad de moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas) en la muestra se conocen ampliamente por los expertos en la técnica. Por ejemplo, una muestra biológica puede ponerse en contacto adicionalmente con uno o más agentes adicionales, tales como tampones y/o inhibidores apropiados, incluyendo inhibidores de nucleasa, proteasa y fosfatasa, que conservan o minimizan los cambios en las moléculas (por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas) en la muestra. Tales inhibidores incluyen, por ejemplo, quelantes, tales como ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(P-aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), inhibidores de proteasa, tales como fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), aprotinina, leupeptina, antipaina y similar, e inhibidores de fosfatasa, tales como fosfato, fluoruro de sodio, vanadato y similar. Tampones y condiciones apropiados para aislar moléculas se conocen ampliamente para los expertos en la técnica y pueden variarse dependiendo, por ejemplo, del tipo de molécula en la muestra que debe caracterizarse (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (suplemento 47), John Wiley & Sons, Nueva 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, 3ª ed. Burtis and Ashwood, eds. W.B. Saunders, Filadelfia, (1999)). Una muestra también puede procesarse para eliminar o minimizar la presencia de sustancias interferentes. Por ejemplo, una muestra biológica puede fraccionarse o purificarse para retirar 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 de líquidos, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía de afinidad. Para su uso en los métodos descritos en el presente documento, una muestra puede estar en una variedad de estados físicos. Por ejemplo, una muestra puede ser un líquido o sólido, puede estar disuelta o suspendida en un líquido, puede estar en una emulsión o gel, o puede estar absorbida sobre un material.

Valoración de la expresión de biomarcadores

La expresión génica puede detectarse como, por ejemplo, la expresión de proteína o de ARNm de un gen diana. Es decir, la presencia o nivel de expresión (cantidad) de un gen puede determinarse detectando y/o midiendo el nivel de expresión de ARNm o de proteína del gen. En algunas realizaciones, la expresión génica puede detectarse como la actividad de una proteína codificada por un gen, tal como un gen representado en la tabla 3.

Pueden emplearse una variedad de métodos adecuados para detectar y/o medir el nivel de expresión de ARNm de un gen. Por ejemplo, la expresión de ARNm puede determinarse usando análisis de transferencia Northern o en puntos, PCR de la transcriptasa inversa (RT-PCR; por ejemplo, RT-PCR cuantitativa), hibridación *in situ* (por

ejemplo, hibridación *in situ* cuantitativa) o análisis de red de ácido nucleico (por ejemplo, redes de oligonucleótidos o chips génicos). Detalles de tales métodos se describen a continuación y en, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Second Edition vol. 1, 2 and 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, Nueva York, USA, Nov. 1989; Gibson *et al.* (1999) Genome Res., 6(10):995-1001; y Zhang *et al.* (2005) Environ. Sci. Technol., 39(8):2777-2785; publicación estadounidense n.º 2004086915; la patente europea n.º 0543942; y la patente estadounidense n.º 7.101.663.

En un ejemplo, la presencia o cantidad de una o más poblaciones de ARNm diferenciadas en una muestra biológica puede determinarse aislando ARNm total de la muestra biológica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (citado anteriormente) y la patente estadounidense n.º 6.812.341) y sometiendo el ARNm aislado a electroforesis en gel de agarosa para separar el ARNm por tamaño. Los ARNm separados por tamaño se transfieren entonces (por ejemplo, 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 puede determinarse entonces usando una o más sondas de polinucleótido marcadas de manera detectable, complementarias a la secuencia de ARNm de interés, que se unen a y por tanto convierten en detectables sus poblaciones de ARNm correspondientes. Las etiquetas detectables incluyen, por ejemplo, etiquetas fluorescentes (por ejemplo, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo, alofocianina (APC) o ficoeritrina), luminiscentes (por ejemplo, europio, terbio, nanopartículas Qdot™ suministradas por Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA), radiológicas (por ejemplo, 125I, 131I, 35S, 32P, 33P o 3H) y enzimáticas (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa).

En otro ejemplo, la presencia o cantidad de poblaciones de ARNm diferenciadas (por ejemplo, ARNm codificado por uno o más genes representados en la tabla 3) en una muestra biológica puede determinarse usando redes de ácido nucleico (u oligonucleótidos) (por ejemplo, una red descrita más adelante en "Redes y kits"). Por ejemplo, ARNm aislado de una muestra biológica puede amplificarse usando RT-PCR con, por ejemplo, síntesis de primera hebra mediada por oligo(dT)-cebador o hexámero aleatorio. Los amplicones pueden fragmentarse en segmentos más cortos. La etapa de RT-PCR puede usarse 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 puede conjugarse enzimática (por ejemplo, mediante traslación por muescas o quinasa, tal como polinucleótido quinasa T4) o químicamente con los amplicones usando cualquiera de una variedad de técnicas adecuadas (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, citado anteriormente). Los amplicones etiquetados de manera detectable se ponen entonces en contacto con una pluralidad de conjuntos de sondas de polinucleótido, conteniendo cada conjunto uno o más de una sonda de polinucleótido (por ejemplo, un oligonucleótido) específica para (y capaz de unirse a) un amplicón correspondiente, y en el que la pluralidad contiene muchos conjuntos de sondas correspondiendo cada uno a un amplicón diferente. Generalmente, los conjuntos de sondas se unen a un soporte sólido y se predetermina la posición de cada conjunto de sondas en 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 de ARNm usando redes de ácido nucleico en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.445.934; 6.027.880; 6.057.100; 6.156.501; 6.261.776; y 6.576.424.

Los métodos de detección y/o para cuantificar una etiqueta detectable dependen de la naturaleza de la etiqueta. Los productos de reacciones catalizadas por enzimas apropiadas (en los que la etiqueta detectable es una enzima; véase anteriormente) pueden ser, sin limitación, fluorescentes, luminiscentes o radiactivos o pueden absorber luz visible o ultravioleta. Los ejemplos de detectores adecuados para detectar tales etiquetas detectables incluyen, sin limitación, película de rayos x, contadores de radiactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y densitómetros.

La expresión de un gen también puede determinarse detectando y/o midiendo la expresión de una proteína codificada por el gen. Métodos de determinación de la expresión de proteína se conocen ampliamente en la técnica. Un método usado generalmente implica el uso de anticuerpos específicos para la proteína diana de interés. Por ejemplo, los métodos de determinación de la expresión de proteína incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Western o en puntos, inmunohistoquímica (por ejemplo, inmunohistoquímica cuantitativa), inmunocitoquímica, ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), de puntos de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISPOT; Coligan, J. E., *et al.*, eds. (1995) Current Protocols in Immunology. Wiley, Nueva York), o análisis de red de anticuerpos (véase, por ejemplo, las publicaciones estadounidenses n.ºs 20030013208 y 2004171068). Una descripción adicional de muchos de los métodos anteriores y métodos adicionales para detectar la expresión de proteína puede encontrarse en, por ejemplo, Sambrook *et al.* (citado anteriormente).

En un ejemplo, la presencia o cantidad de expresión de proteína de un gen (por ejemplo, un gen representado en la tabla 3) puede determinarse usando una técnica de transferencia Western. Por ejemplo, pueden prepararse un lisado a partir de una muestra biológica, o la propia muestra biológica, puede ponerse en contacto con tampón Laemmli y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las proteínas resueltas mediante SDS-PAGE, separadas por tamaño, pueden transferirse entonces a una membrana de filtro (por ejemplo, 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, puede usarse un inmunoensayo para detectar y/o medir la expresión de proteína de un gen (por ejemplo, un gen representado en la tabla 3). Tal como anteriormente, para los propósitos de detección, un inmunoensayo puede realizarse con un anticuerpo que porta un resto de detección (por ejemplo, una enzima o agente fluorescente). Las proteínas de una muestra biológica pueden conjugarse directamente con una matriz de fase sólida (por ejemplo, una placa de ensayo de múltiples pocillos, nitrocelulosa, agarosa, sefarosa, partículas codificadas o perlas magnéticas) o puede conjugarse con un primer elemento de un par de unión específico (por ejemplo, biotina o estreptavidina) que se sujeta a una matriz de fase sólida tras la unión a un segundo elemento del par de unión específico (por ejemplo, estreptavidina o biotina). Tal sujeción a una matriz de fase sólida permite eliminar las proteínas mediante purificación de otros componentes interferentes o irrelevantes de la muestra biológica antes de entrar en contacto con el anticuerpo de detección y también permite el lavado posterior de anticuerpo no unido. En este caso como anteriormente, la presencia o cantidad de anticuerpo etiquetado de manera detectable unido indica la presencia o cantidad de proteína en la muestra biológica.

No hay ninguna restricción particular en cuanto a la forma del anticuerpo y la presente divulgación incluye anticuerpos policlonales, así como anticuerpos monoclonales. El antisuero obtenido inmunizando animales, tales como conejos, con una proteína usada en la invención, así como anticuerpos policlonales y monoclonales de todas las clases, anticuerpos humanos, y anticuerpos humanizados producidos mediante recombinación genética, también están incluidos.

Una proteína intacta o su péptido parcial puede usarse como antígeno para inmunización. Como péptidos parciales de las proteínas, por ejemplo, pueden facilitarse el fragmento amino (N)-terminal de la proteína y el fragmento carboxilo (C)-terminal.

Un gen que codifica para una proteína de interés o un fragmento de la misma se inserta en un vector de expresión conocido, y, transformando las células huésped con el vector descrito en el presente documento, la proteína deseada o un fragmento de la misma se recupera del exterior o del interior de las células huésped usando métodos convencionales. Esta proteína puede usarse como antígeno de sensibilización. Además, también pueden usarse células que expresan la proteína, lisados celulares o una proteína sintetizada químicamente usada en la invención como antígeno de sensibilización.

El mamífero que se inmuniza mediante el antígeno de sensibilización no está restringido; sin embargo, es preferible seleccionar animales considerando la compatibilidad con las células parentales usadas en la fusión celular. Generalmente se usan animales que pertenecen a los órdenes rodentia, lagomorpha o primates. Los ejemplos de animales que pertenecen al orden de rodentia que pueden usarse incluyen, por ejemplo, ratones, ratas y hámsteres. Los ejemplos de animales que pertenecen al orden de lagomorpha que pueden usarse incluyen, por ejemplo, conejos. Los ejemplos de animales que pertenecen al orden de primates que pueden usarse incluyen, por ejemplo, monos. Los ejemplos de monos que deben usarse incluyen el infraorden catarrhini (monos del Viejo Mundo), por ejemplo, *Macaca fascicularis*, macaco Rhesus, babuinos sagrados y chimpancés.

Pueden usarse métodos ampliamente conocidos para inmunizar animales con el antígeno de sensibilización. Por ejemplo, el antígeno de sensibilización se inyecta por vía intraperitoneal o por vía subcutánea en mamíferos. Específicamente, el antígeno de sensibilización se diluye y se suspende de manera adecuada en solución salina fisiológica, solución salina tamponada con fosfato (PBS), etcétera, y se mezcla con una cantidad adecuada de adyuvante general si se desea, por ejemplo, con adyuvante completo de Freund. Entonces, la disolución se emulsiona y se inyecta en el mamífero. Después, el antígeno de sensibilización mezclado de manera adecuada con adyuvante incompleto de Freund se facilita preferiblemente varias veces cada de 4 a 21 días. También puede usarse un portador adecuado cuando se inmuniza un animal con el antígeno de sensibilización. Tras la inmunización, la elevación en el nivel de anticuerpo en suero se detecta mediante métodos habituales.

Los anticuerpos policlonales frente a las proteínas de la presente divulgación pueden prepararse tal como sigue. Tras verificar que se ha alcanzado el nivel de anticuerpo en suero deseado, se extrae sangre del mamífero sensibilizado con antígeno. Se aísla suero de esta sangre usando métodos convencionales. El suero que contiene el anticuerpo policlonal puede usarse como anticuerpo policlonal, o según las necesidades, la fracción que contiene anticuerpo policlonal puede aislarse adicionalmente del suero. Por ejemplo, una fracción de anticuerpos que reconoce específicamente la proteína usada en la invención puede prepararse usando una columna de afinidad a la que está acoplada la proteína. Entonces, la fracción puede purificarse adicionalmente usando una columna de proteína A o proteína G con el fin de preparar inmunoglobulina G o M.

Para obtener anticuerpos monoclonales, tras 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 fusión celular. Para este propósito, pueden mencionarse esplénocitos como inmunocitos preferibles. Como células parentales fusionadas con los inmunocitos anteriores, se usan preferiblemente células de mieloma de

mamífero. Más preferiblemente, células de mieloma que han adquirido la característica, que puede usarse para distinguir células de fusión mediante antes, se usan como célula parental.

La fusión celular entre los inmunocitos anteriores y células de mieloma puede realizarse según métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein *et al.* (Galfre *et al.*, *Methods Enzymol.* 73:3-46, 1981).

El hibridoma obtenido de fusión celular se selecciona cultivando las células en un medio de selección convencional, por ejemplo, medio de cultivo HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en este medio HAT se continúa durante un periodo suficiente para que mueran células (células no de fusión) distintas del hibridoma objetivo, habitualmente desde unos pocos días hasta unas pocas semanas. Entonces, se lleva a cabo el método de dilución limitante habitual y se selecciona y clona el hibridoma que produce el anticuerpo objetivo.

Además del método anterior para obtener hibridomas, inmunizando un animal distinto a los seres humanos con el antígeno, un hibridoma que produce los anticuerpos humanos objetivo que tiene la actividad para unirse a proteínas puede obtenerse mediante el método de sensibilizar linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con el virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas o lisados de las mismas *in vitro* y fusionar los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas de ser humano, por ejemplo, U266, que tienen una capacidad de división celular permanente.

Los anticuerpos monoclonales obtenidos trasplantando los hibridomas obtenidos en la cavidad abdominal de un ratón y extrayendo ascitis pueden purificarse mediante, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, columna de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico DEAE, una columna de afinidad a la que está acoplada la proteína de la presente divulgación, etcétera.

También pueden obtenerse anticuerpos monoclonales como anticuerpos recombinantes producidos usando 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)). Se producen anticuerpos recombinantes clonando el ADN codificante de inmunocitos, tales como hibridoma o linfocitos sensibilizados que producen anticuerpos, incorporándolo en un vector adecuado e introduciendo este vector en un huésped para producir el anticuerpo. La presente divulgación también abarca tales anticuerpos recombinantes.

También pueden generarse anticuerpos o fragmentos de anticuerpo específicos para una proteína codificada por uno o más biomarcadores mediante métodos *in vitro*, tal como presentación en fago.

Además, el anticuerpo de la presente divulgación puede ser un fragmento de anticuerpo o anticuerpo modificado, siempre que se una a una proteína codificada por un biomarcador usado en la invención. Por ejemplo, Fab, F (ab')₂, Fv o Fv monocatenario (scFv), en el que Fv de la cadena H y Fv de la cadena L están ligados de manera adecuada mediante un ligador (Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, (1988)), pueden facilitarse como fragmentos de anticuerpo. Específicamente, se generan fragmentos de anticuerpo tratando anticuerpos con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina. Alternativamente, pueden generarse construyendo un gen que codifica para un fragmento de anticuerpo, introduciéndolo en un vector de expresión, y expresando este vector en células huésped 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 polietilenglicol (PEG), sustancias fluorescentes, sustancias radiactivas y sustancias luminiscentes. Métodos para sujetar tales restos a un anticuerpo ya están establecidos y son convencionales en el campo (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.057.313 y 5.156.840).

Los ejemplos de métodos que someten a ensayo la actividad de unión a antígeno de los anticuerpos incluyen, por ejemplo, medición de la absorbancia, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), radioinmunoensayo (RIA) y/o inmunofluorescencia. Por ejemplo, cuando se usa ELISA, una proteína codificada por un biomarcador usado en la invención se añade a una placa recubierta con los anticuerpos de la presente divulgación, y entonces, el anticuerpo muestra, por ejemplo, sobrenadantes de cultivo de células productoras de anticuerpos, o se añaden anticuerpos purificados. Entonces, se añade el anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario, que se etiqueta mediante fosfatasa alcalina y tales enzimas, la placa se incuba y se lava, y se mide la absorbancia para evaluar la actividad de unión a antígeno tras añadir un sustrato enzimático, tal como fosfato de p-nitrofenilo. Como proteína puede usarse un fragmento de proteína, por ejemplo, un fragmento que comprende un extremo C-terminal, o un fragmento que comprende un extremo N-terminal. Para evaluar la actividad del anticuerpo usado en la invención, puede usarse BIAcore (Pharmacia).

Usando estos métodos, el anticuerpo usado en la invención y una muestra de la que se presupone que contiene una proteína usada en la invención se ponen en contacto, y la proteína codificada por un biomarcador usado en la

invención se detecta o se somete a ensayo detectando o sometiendo a ensayo el complejo inmunitario formado entre el anticuerpo mencionado anteriormente y la proteína.

Los métodos de ensayo de cuantificación a base de espectrometría de masas, por ejemplo, pero sin limitarse a, enfoques a base de monitorización de reacción múltiple (MRM) en combinación con patrones internos etiquetados con isótopos estables, son una alternativa a los inmunoensayos para la medición cuantitativa de proteínas. Estos enfoques no requieren el uso de anticuerpos y así el análisis puede realizarse de una manera que ahorra tiempo y eficaz (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, MRM ofrece capacidades de multiplexación superior, permitiendo la cuantificación simultánea de numerosas proteínas en paralelo. La teoría básica de estos métodos se ha establecido ampliamente y se utiliza ampliamente para el metabolismo de fármacos y el análisis de farmacocinética de moléculas pequeñas.

Pueden realizarse opcionalmente métodos para detectar o medir la expresión génica (por ejemplo, expresión de ARNm o de proteína) en formatos que permiten una preparación, procesamiento y análisis de múltiples muestras rápido. Esto puede ser, por ejemplo, en placas de ensayo de múltiples pocillos (por ejemplo, 96 pocillos o 386 pocillos) o redes (por ejemplo, chips de ácido nucleico o chips de proteína). Pueden proporcionarse disoluciones madre para diversos reactivos manual o robóticamente, y la posterior preparación de la muestra (por ejemplo, RT-PCR, etiquetado o fijación de la célula), pipeteo, dilución, mezclado, distribución, lavado, incubación (por ejemplo, hibridación), lectura de muestras, recogida de datos (datos ópticos) y/o análisis (análisis de imágenes asistido por ordenador) pueden realizarse robóticamente usando software de análisis disponible comercialmente, robótica e instrumentación de detección que puede detectar a señal generada desde el ensayo. Los ejemplos de tales detectores incluyen, pero no se limitan a, espectrofotómetros, luminómetros, fluorímetros, y dispositivos que miden la desintegración del radioisótopo. Los ensayos a base de células de alto rendimiento a modo de ejemplo (por ejemplo, detectar la presencia o el nivel de una proteína diana en una célula) pueden utilizar tecnología ArrayScan® VTI HCS Reader o KineticScan® HCS Reader (Cellomics Inc., Pittsburg, 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, 12 genes, 13 genes, 14 genes, 15 genes, 16 genes, 17 genes, 18 genes, 19 genes, 20 genes, 21 genes, 22 genes, 23 genes, al menos 24 genes, al menos 25 genes o más, 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, al menos 10 genes, al menos 11 genes, al menos 12 genes, al menos 13 genes, al menos 14 genes, al menos 15 genes, al menos 16 genes, al menos 17 genes, al menos 18 genes, al menos 19 genes, al menos 20 genes, al menos 21 genes, al menos 22 genes, al menos 23 genes, al menos 24 genes, o al menos 25 genes o más pueden valorarse y/o medirse.

Para ayudar en la detección de la presencia o el nivel de expresión de uno o más de los genes representados en la tabla 3, puede usarse cualquiera parte de la secuencia de ácido nucleico de los genes, por ejemplo, como cebadores o sondas de polinucleótido de hibridación (por ejemplo, para amplificación o transcripción inversa). Los cebadores y sondas pueden ser oligonucleótidos de longitud suficiente para proporcionar hibridación específica a un ARN, ADN, ADNc o fragmentos de los mismos derivados de una muestra biológica. Dependiendo de la aplicación específica, pueden emplearse condiciones de hibridación variables para alcanzar grados variables de selectividad de un cebador o sonda hacia una secuencia diana. Los cebadores y sondas pueden etiquetarse de manera detectable con reactivos que facilitan la detección (por ejemplo, etiquetas fluorescentes, etiquetas químicas (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 4.582.789 y 4.563.417), o bases modificadas).

Condiciones de rigurosidad convencionales se describen por Sambrook, *et al.* (citado anteriormente) y Haymes, *et al.* Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985). Con el fin de que una molécula de ácido nucleico sirva como cebador o sonda, solo es necesario que sea suficientemente complementario en secuencia como para poder formar una estructura de doble hebra estable en las condiciones de hibridación particulares (por ejemplo, concentraciones de sal y disolvente) empleadas.

La hibridación puede usarse para valorar la homología entre dos secuencias de ácido nucleico. Una secuencia de ácido nucleico descrita en el presente documento, o un fragmento de la misma, puede usarse como sonda de hibridación según técnicas de hibridación convencionales. La hibridación de una sonda de interés (por ejemplo, una sonda que contiene una parte de una secuencia de nucleótidos descrita en el presente documento o su complemento) a ADN, ARN, ADNc o fragmentos de los mismos 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 se conocen por los expertos en la técnica y pueden encontrarse 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) a 30°C, seguido por un lavado en 1 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C. Las condiciones muy rigurosas se definen como hibridación en 6X SSC a 45°C, seguido por un lavado en 0,2 X SSC, SDS al 0,1% a 65°C.

Los cebadores pueden usarse en una variedad de métodos de tipo PCR. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar secuencias específicas de ADN, así como ARN,

incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores de PCR están diseñados para flanquear la región que interesa amplificar. Los cebadores pueden estar ubicados cerca del extremo 5', el extremo 3' o en cualquier punto dentro de la secuencia de nucleótidos que debe amplificarse. La longitud del amplicón está dictada por los objetivos experimentales. Para qPCR, la longitud diana está más cerca de 100 pb y para PCR convencional, está cerca de 500 pb. Generalmente, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá se emplea para diseñar cebadores de oligonucleótidos que son idénticos o similares en secuencia a hebras opuestas de la plantilla que debe amplificarse. Los cebadores de PCR pueden sintetizarse químicamente, o bien como molécula de ácido nucleico individual (por ejemplo, usando síntesis de ADN automatizada en el sentido de 3' a 5' usando tecnología de fosforamidita) o como serie de oligonucleótidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse uno o más pares de oligonucleótidos largos (por ejemplo, >100 nucleótidos) que contienen la secuencia deseada, con cada par que contiene un segmento de complementariedad corto (por ejemplo, aproximadamente 15 nucleótidos) de modo que se forma un dúplex cuando el par de oligonucleótidos se aparea. Se usa ADN polimerasa para extender los oligonucleótidos, dando como resultado una única, molécula de ácido nucleico de doble hebra por par de oligonucleótidos.

Además, las secuencias de ácido nucleico o fragmentos de las mismas (por ejemplo, sondas de oligonucleótidos) pueden usarse en redes de ácido nucleico (tal como las redes de ácido nucleico descritas más adelante en "Redes") para la detección y/o cuantificación de la expresión génica.

Valores de punto de corte

Como se indicó anteriormente, los métodos descritos en el presente documento pueden implicar valorar el nivel de expresión (por ejemplo, nivel de expresión de ARNm o de proteína) de uno o más genes (por ejemplo, uno o más genes representados en la tabla 3), prediciendo el nivel de expresión de uno o más de los genes la respuesta de un sujeto al tratamiento que comprende un lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). "Valorar" puede incluir, por ejemplo, comparar la expresión de uno o más genes en una muestra biológica de prueba con un nivel de expresión conocido o uno control (por ejemplo, en una muestra biológica de referencia) del/de los gene(s) particular(es) de interés. Por ejemplo, el nivel de expresión de uno o más genes en una muestra biológica de prueba can compararse con los niveles de expresión correspondientes en un sujeto que ha respondido o no ha respondido a lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), o un nivel de expresión promedio o mediano de múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 o más) sujetos, de la misma especie, que han respondido o no han respondido a lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Valorar también puede incluir determinar si el nivel de expresión de uno o más genes (por ejemplo, uno o más genes representados en la tabla 3) se encuentra dentro de un intervalo de valores predeterminados como predictivos de la capacidad de respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). En algunas realizaciones, valorar puede ser, o incluir, determinar si la expresión de uno o más genes (por ejemplo, uno o más de los genes representados en la tabla 3) se encuentra por encima o por debajo de un valor de punto de corte predeterminado. Un valor de punto de corte es normalmente un nivel de expresión de un gen, o razón del nivel de expresión de un gen con el nivel de expresión de otro gen, por encima o por debajo del cual se considera predictivo de la capacidad de respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por tanto, según los métodos (y composiciones) descritos en el presente documento, un nivel de expresión de referencia de un gen (por ejemplo, un gen representado en la tabla 3) se identifica como valor de punto de corte, por encima o por debajo del cual es predictivo de la capacidad de respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Algunos valores de punto de corte no son absolutos, porque correlaciones clínicas todavía pueden seguir siendo significativas a lo largo de un intervalo de valores a cada lado del punto de corte; sin embargo, es posible seleccionar un valor de punto de corte óptimo (por ejemplo, puntuaciones H variables) de niveles de expresión de genes para unos tipos de muestra particulares. Los valores de punto de corte determinados para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden compararse con, por ejemplo, intervalos publicados de niveles de expresión, pero pueden individualizarse a la metodología usada y la población de pacientes. Se entiende que pueden determinarse mejoras en los valores de punto de corte óptimos dependiendo de la sofisticación de los métodos estadísticos usados y del número y la fuente de muestras usadas para determinar los valores de nivel de referencia para los diferentes genes y tipos de muestra. Por tanto, los valores de punto de corte establecidos pueden ajustarse hacia arriba o hacia abajo, basándose en nuevas evaluaciones periódicas o cambios en la metodología o la distribución de la población.

El nivel de expresión de referencia de uno o más genes puede determinarse mediante una variedad de métodos. El nivel de referencia puede determinarse mediante la comparación del nivel de expresión de un gen de interés en, por ejemplo, poblaciones de sujetos (por ejemplo, pacientes) que responden a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) o no responden a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Esto puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante análisis de histogramas, en el que una cohorte completa de pacientes se presenta gráficamente, representando un primer eje el nivel de expresión de un gen y representando un segundo eje el número de sujetos en la cohorte cuya muestra contiene uno o más niveles de expresión a una cantidad dada. La determinación del

nivel de expresión de referencia de un gen puede realizarse entonces basándose en una cantidad que distingue de la mejor manera estos grupos independientes. El nivel de referencia puede ser un único número, aplicable igualmente a cada sujeto, o el nivel de referencia puede variar, según subpoblaciones de sujetos específicas. Por ejemplo, los sujetos más viejos pueden tener un nivel de referencia diferente al de los sujetos más jóvenes para el mismo trastorno metabólico. Además, un sujeto con una enfermedad más avanzada (por ejemplo, una forma más avanzada de una enfermedad que puede tratarse mediante lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib)) puede tener un valor de referencia diferente al de uno con una forma más suave de la enfermedad.

10 Crear un perfil de respuesta

Los métodos descritos en el presente documento también pueden usarse para generar un perfil de respuesta a la terapia con lenvatinib (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) para un sujeto. El perfil puede incluir información que indica si una o más de las mutaciones tales como las enumeradas en las tablas 1 y 2 están presentes en una muestra del sujeto; y/o información que indica el nivel de expresión de uno o más genes (por ejemplo, uno o más genes representados en la tabla 3); y/o la razón de expresión de tiroglobulina en una muestra (por ejemplo, plasma, suero) del sujeto pos-/pretratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y/o el análisis histológico de cualquier tumor (por ejemplo, si un cáncer de tiroides es un FTC o PTC). Un perfil de respuesta a la terapia con lenvatinib puede incluir el nivel de expresión de uno o más genes adicionales y/u otros marcadores proteómicos, marcadores de suero o marcadores clínicos. Los perfiles de respuesta descritos en el presente documento pueden contener información sobre la expresión o el 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, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 21, al menos 22, al menos 23, al menos 24 o al menos 25 genes enumerados en la tabla 3. Los perfiles de respuesta descritos en el presente documento también pueden contener información sobre la presencia de mutaciones (si alguna) y la naturaleza de la(s) mutación(es) en uno cualquiera o más de los siguientes genes: NRAS, KRAS, VHL, BRAF, ERBB2, PTEN y MET. La información resultante (perfil de respuesta a la terapia con lenvatinib) puede usarse para predecir la respuesta de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) a un tratamiento que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Además, los perfiles de respuesta pueden usarse a la hora de predecir la respuesta de un sujeto a una variedad de terapias y/o una variedad de estados patológicos dado que, por ejemplo, los niveles de expresión de uno o más de los genes (por ejemplo, uno o más de los genes representados en la tabla 3), las mutaciones, los niveles de tiroglobulina, y/o los datos histológicos examinados pueden ser indicativos de tales respuestas o trastornos, si síntomas fisiológico o de comportamiento del trastorno se han vuelto evidentes o no.

Se entiende que un perfil de respuesta a lenvatinib (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) puede ser en forma electrónica (por ejemplo, un historial de paciente electrónicos almacenado en un ordenador u otro medio electrónico (legible por ordenador), tal como un DVD, CD o disquete) o forma escrita. El perfil de respuesta a lenvatinib (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) también puede incluir información para varios (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, 10, 20, 30, 50 o 100 o más) sujetos (por ejemplo, pacientes humanos). Tales perfiles de respuesta multi-sujeto pueden usarse, por ejemplo, en análisis (por ejemplo, análisis estadísticos) de características particulares de cohortes de sujetos.

La capacidad de respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) puede clasificarse de varias maneras y la clasificación depende de la enfermedad del sujeto (por ejemplo, cáncer de tiroides, un cáncer de riñón o cualquier otra de las enfermedades que pueden tratarse mediante terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib)), la gravedad de la enfermedad, y el medicamento particular que se administra al sujeto. En el sentido más simple, la capacidad de respuesta es cualquier disminución en el estado patológico en comparación con previamente al tratamiento, y la no capacidad de respuesta es la ausencia de cualquier cambio en el estado patológico en comparación con previamente al tratamiento. La capacidad de respuesta de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) con un cáncer puede clasificarse basándose en uno o más de un número de indicios clínicos objetivos, tal como, pero sin limitarse a, tamaño del tumor, beneficio clínico (CB, *clinical benefit*), supervivencia global (OS, *overall survival*), supervivencia libre de progresión (PFS), tasa de control de la enfermedad (DCR, *disease control rate*), tiempo hasta la respuesta (TTR, *Time-To-Response*), encogimiento del tumor (TS) o respuesta del tumor (TR).

“Beneficio clínico” se refiere a tener uno de los siguientes estados - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR); o enfermedad estable (SD) con 6 meses o más de supervivencia libre de progresión (PFS). “Respuesta completa” significa la desaparición completa de todas las lesiones diana. “Respuesta parcial” significa al menos el 30% de disminución en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado de referencia. “Enfermedad progresiva” (PD) significa al menos el 20% de aumento en la suma del LD de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde que empezó el tratamiento, o la aparición de una o más nuevas lesiones. “Enfermedad estable” significa ni un encogimiento suficiente de las lesiones diana para cumplir los requisitos para PR ni un aumento suficiente para cumplir los requisitos para

enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde que empezó el tratamiento.

“Supervivencia global” (OS) se define como el tiempo desde la aleatorización hasta la muerte por cualquier causa.

“Aleatorización” significa la aleatorización de un paciente en un grupo de prueba o un grupo control cuando se determina un plan de terapia para un paciente.

“Supervivencia libre de progresión” (PFS) se refiere al periodo desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la última fecha antes de entrar en el estado PD.

“Tasa de control de enfermedad” (DCR) se define como CR o PR o SD durante 7 semanas.

“Tiempo hasta la respuesta” (TTR) se define como el tiempo desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la fecha en la se cumplen por primera vez los criterios de respuesta (CR o PR).

“Encogimiento del tumor” (TS) significa el cambio porcentual de la suma de diámetros de lesiones diana, tomando como referencia los diámetros de suma de referencia.

“Respuesta del tumor” (TR) compara sujetos con “respuesta parcial” (PR) con sujetos con o bien enfermedad estable (SD) o bien enfermedad progresiva (PD).

Métodos de tratamiento

Los métodos dados a conocer en el presente documento posibilitan la valoración de un sujeto para determinar la capacidad de respuesta a lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). A un sujeto que tiene probabilidad de responder a lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) se le puede administrar lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

Los métodos de esta divulgación también posibilitan la clasificación de sujetos en grupos de sujetos que tienen más probabilidad de beneficiarse, y grupos de sujetos que tienen menos probabilidad de beneficiarse, de tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). La capacidad de seleccionar tales sujetos de un conjunto de sujetos que están considerándose para el tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) es beneficiosa para un tratamiento eficaz.

Los métodos de esta divulgación también pueden usarse para determinar si continuar con el tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tras administrar esta terapia durante un corto periodo de tiempo y determinar, basándose en el perfil de expresión de uno o más de los biomarcadores descritos anteriormente posteriormente al tratamiento o posteriormente al tratamiento frente a previamente al tratamiento, si esta terapia tiene más probabilidad o menos de probabilidad de beneficiar al paciente.

El lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) muestra efectos antitumorales potentes en modelos de xenoinjerto de diversos tumores inhibiendo la angiogénesis. Los sujetos que se consideran para el tratamiento con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) incluyen, pero no se limitan a, sujetos que tienen, de los que se sospecha que tienen o que tienen probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón (por ejemplo, carcinoma de células renales).

En una realización, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides. El cáncer de tiroides es un crecimiento o tumor canceroso ubicado dentro de la glándula tiroides. Es el cáncer endocrino más común y es uno de los pocos cánceres que ha aumentado en las tasas de incidencia a lo largo de los últimos años. Se produce en todos los grupos de edad de niños a ancianos. La Asociación Americana contra el Cáncer estima que había aproximadamente 44.670 nuevos casos de cáncer de tiroides en los Estados Unidos en 2010. De estos nuevos casos, aproximadamente 33.930 eran en mujeres y aproximadamente 10.740 en hombres. Aproximadamente 1.690 personas (960 mujeres y 730 hombres) murieron de cáncer de tiroides en 2010. Muchos pacientes, especialmente en los estadios tempranos de cáncer de tiroides, no experimentan síntomas. Sin embargo, a medida que el cáncer se desarrolla, los síntomas pueden incluir un nudo o nódulo en la parte delantera del cuello, ronquera o dificultad para hablar, ganglios linfáticos hinchados, dificultad para tragar o respirar, y dolor en la garganta o el cuello. Hay varios tipos de cáncer de tiroides: papilar, folicular, medular, anaplásico y variantes. El carcinoma papilar es el tipo más común que representa aproximadamente el 85% de todos los cánceres de tiroides, y habitualmente afecta a mujeres en edad de procrear. Se extiende lentamente y es el tipo de cáncer de tiroides menos peligroso. El carcinoma folicular representa aproximadamente el 10% de todos los casos y tiene más probabilidad de que vuelva y se extienda. El carcinoma medular es un cáncer de células no tiroideas que están presentes normalmente en la glándula tiroides. Esta forma del cáncer de tiroides tiende a producirse en familias.

Requiere un tratamiento diferente al de otros tipos de cáncer de tiroides. El carcinoma anaplásico (también denominado cáncer de células gigantes y husiformes) es la forma más peligrosa de cáncer de tiroides. Es raro, y no responde a terapia con yodo radiactivo. El carcinoma anaplásico se propaga rápidamente e invade estructuras adyacentes, tal como la tráquea, provocando dificultades para respirar. Las variantes incluyen célula alta, célula insular, columnar y de Hurthle. Puede usarse lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) para tratar a un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o tiene probabilidad de desarrollar cualquier de los cánceres de tiroides descritos anteriormente. En determinadas realizaciones, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides diferenciado. En otras realizaciones, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides medular. En una realización, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides papilar. En otra realización, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides folicular. En otra realización, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de tiroides de células de Hürthle.

En una realización, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un cáncer de riñón. El cáncer de riñón se define habitualmente como un cáncer que se origina en el riñón. Los dos tipos de cáncer de riñón más comunes, que reflejan su ubicación dentro del riñón, son carcinoma de células renales (RCC, también conocido como hipernefroma) y carcinoma de células uroteliales (UCC) de la pelvis renal. Otros tipos de cáncer de riñón menos comunes incluyen: carcinoma de células escamosas, tumores de células yuxtglomerulares (reninoma), angiomiolipoma, oncocitoma renal, carcinoma de los conductos de Bellini, sarcoma de células claras del riñón, nefroma mesoblástico, tumor de Wilms y tumor estromal-epitelial mixto. El RCC es un cáncer de riñón que se origina en el revestimiento del túbulo convoluto proximal, los tubos muy pequeños en el riñón que filtran la sangre y retiran los productos residuales. El RCC es el tipo de cáncer de riñón más común en adultos, responsable de aproximadamente el 80% de los casos. También se conoce por ser el más letal de todos los tumores genitourinarios. El tratamiento inicial es lo más comúnmente una nefrectomía radical o parcial y sigue siendo la piedra angular el tratamiento curativo. Cuando el tumor está confinado en el parénquima renal, la tasa de supervivencia a los 5 años es del 60-70%, pero se reduce considerablemente cuando se han propagado metástasis. Es resistente a la radioterapia y quimioterapia, aunque algunos casos responden a inmunoterapia. Puede usarse lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) para tratar a un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que tiene probabilidad de desarrollar cualquier de los cánceres de riñón descritos anteriormente. En una realización específica, el sujeto que debe tratarse con lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) tiene, se sospecha del mismo que tiene o tiene probabilidad de desarrollar un carcinoma de células renales.

Si el sujeto tiene más probabilidad de responder a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (basándose en la presencia de biomarcadores mutacionales y/o niveles/razones de expresión de los biomarcadores descritos anteriormente), al sujeto se le puede administrar entonces una cantidad eficaz del compuesto de lenvatinib (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Una cantidad eficaz del compuesto can determinarse de manera adecuada por un profesional sanitario teniendo 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 el sujeto tiene menos probabilidad de responder a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), al sujeto se le puede administrar entonces opcionalmente una terapia que no comprenda lenvatinib. Estas terapias incluyen, pero no se limitan a, yodo radiactivo, doxorrubicina, carboplatino, cisplatino, paclitaxel, sorafenib, docetaxel, trastumab, interleucina-2, interferón, everolímús, sunitinib, pazopanib, vandetanib y el tratamiento "estándar de cuidado" (es decir, el estándar de cuidado que prevalece según se determine por el profesional sanitario o según se especifique en el estudio clínico) tal como fármacos en investigación y quimioterapia.

Sujetos de todas las edades pueden verse afectados por trastornos que pueden tratarse mediante lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Por tanto, una muestra biológica usada en métodos descritos en el presente documento puede obtenerse de un sujeto (por ejemplo, un ser humano) de cualquier edad, incluyendo un niño, un adolescente o un adulto, tal como un adulto que tiene, o del que se sospecha que tiene, una enfermedad (por ejemplo, cáncer de tiroides papilar, carcinoma de células renales) que puede tratarse mediante lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

Los métodos también pueden aplicarse a individuos que corren el riesgo de desarrollar un cáncer que puede tratarse mediante lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). Tales

individuos incluyen aquellos que tienen (i) un historial familiar de (una predisposición genética para) tales trastornos o (ii) uno o más factores de riesgo para desarrollar tales trastornos.

Tras clasificar o seleccionar un sujeto basándose en si el sujeto tendrá más probabilidad o menos probabilidad de responder a lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), un profesional médico (por ejemplo, un doctor) puede administrar la modalidad terapéutica apropiada al sujeto. Métodos de administración de terapias con lenvatinib se conocen ampliamente en la técnica.

Se entiende que cualquier terapia descrita en el presente documento (por ejemplo, una terapia que comprende un lenvatinib o una terapia que no comprende un lenvatinib) puede incluir uno o más agentes terapéuticos adicionales. Es decir, cualquier terapia descrita en el presente documento puede administrarse conjuntamente (administrarse en combinación) con uno o más agentes terapéuticos adicionales tales como, pero sin limitarse a, doxorrubicina, carboplatino, cisplatino, paclitaxel, docetaxel, trastumab, interleucina-2, interferón y everolímús. Además, cualquier terapia descrita en el presente documento puede incluir uno o más agentes para tratar, por ejemplo, dolor, náuseas, y/o uno o más efectos secundarios de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

Las terapias de combinación (por ejemplo, administración conjunta de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y uno o más agentes terapéuticos adicionales) pueden ser, por ejemplo, simultáneas o sucesivas. Por ejemplo, pueden administrarse lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) y uno o más agentes terapéuticos adicionales al mismo tiempo o puede administrarse un compuesto de lenvatinib (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) primero en el tiempo y administrarse el uno o más agentes terapéuticos adicionales segundos en el tiempo. En algunas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse primeros en el tiempo y el lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) administrarse segundo en el tiempo.

En los casos en los que al sujeto del que se predice que responderá a una terapia con lenvatinib (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) se le haya administrado previamente una o más terapias no con lenvatinib, la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) puede sustituir o aumentar una terapia administrarse previamente o actualmente. Por ejemplo, tras el tratamiento con la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), la administración de las terapias no con lenvatinib puede cesar o disminuir, por ejemplo, administrarse a niveles menores. La administración de la terapia previa puede mantenerse mientras se administra la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib). En algunas realizaciones, una terapia previa puede mantenerse hasta que el nivel de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) alcanza un nivel suficiente para proporcionar un efecto terapéutico.

Redes

Las redes de ácido nucleico que incluyen los biomarcadores de ácido nucleico dados a conocer en el presente documento son útiles en, por ejemplo, la detección de la expresión génica y/o la medición de niveles de expresión génica. Las redes también son útiles, por ejemplo, a la hora de predecir la respuesta de un sujeto a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), para identificar sujetos que pueden beneficiarse de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), y para dirigir a los sujetos que probablemente no se beneficiaría de una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib) a otras terapias contra el cáncer.

Una red es una disposición ordenada de muestras en la que el apareamiento de muestras de ADN conocidas y desconocidas se realiza basándose en reglas de emparejamiento de bases (por ejemplo, pares de adenosina con timina o uracilo; pares de guanosa con citosina). Un experimento de microrred típico implica la hibridación de un ARNm, una molécula de ADNc o fragmentos de los mismos, a una plantilla de ADN a partir de la que se origina o se deriva. Se usan muchas muestras de ADN para construir una red. Un experimento de red hace uso de sistemas de ensayo comunes, tales como microplacas o membranas de transferencia convencionales. Los tamaños de puntos de muestra son normalmente menores de 200 micras de diámetro y la red contiene habitualmente miles de puntos. Miles de muestras ubicadas conocidas como sondas (con identidad conocida) se inmovilizan sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio de microscopio, chips de silicio, membrana de nailon). Los puntos pueden ser ADN, ADNc u oligonucleótidos. Estos se usan para determinar la unión complementaria de las secuencias desconocidas, permitiendo así un análisis paralelo de la expresión génica y el descubrimiento de genes. Un experimento con un chip de ADN individual puede proporcionar información sobre miles de genes simultáneamente. Una disposición ordenada de las sondas sobre el soporte es importante, ya que la ubicación de cada punto en la red se usa para la identificación de un gen. La cantidad de ARNm unido a cada sitio en la red indica el nivel de expresión de los diversos genes que están incluidos en la red. Usando una red que contiene muchas muestras de ADN, pueden determinarse, en un único experimento, los niveles de expresión de cientos o miles de genes midiendo la

cantidad de ARNm unido a cada sitio en la red. Con la ayuda de un ordenador, puede medirse de manera precisa la cantidad de ARNm unido a los puntos en la microrred, generando un perfil de expresión génica en la célula.

Las dos plataformas de microrred de ADN principales que se usan generalmente son microrredes de ADNc y de oligonucleótidos. Las microrredes de ADNc están hechas con moléculas de ADN de hebra doble largas generadas mediante reacciones enzimáticas tales como PCR (Schna, M. *et al.*, Science, 270:467-470 (1995)), mientras que las microrredes de oligonucleótidos emplean sondas de oligonucleótidos ubicadas o bien mediante deposición robótica o bien síntesis *in situ* sobre un sustrato (Lockhart, D.J. *et al.*, Nat. Biotechnol., 14, 1675-1680 (1996)).

Kits

Esta solicitud también proporciona kits. En algunas realizaciones, los kits incluyen sondas que pueden usarse para identificar o detectar cualquiera de los biomarcadores de la tabla 3. En algunas realizaciones, los kits incluyen cebadores que pueden usarse para amplificar la región que contiene cualquiera de las mutaciones enumeradas en la tabla 1 y/o la tabla 2. En algunas realizaciones, los kits incluyen cualquiera de las redes de ácido nucleico descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, los kits incluyen anticuerpos que pueden usarse para detectar tiroglobulina o para detectar cualquiera de los biomarcadores de la tabla 3 o su expresión o niveles de expresión. En algunas realizaciones, los kits incluyen sondas y anticuerpos que pueden usarse para identificar o detectar cualquiera de los biomarcadores de la tabla 3 o su expresión o niveles de expresión. Los kits pueden contener, opcionalmente, instrucciones para detectar y/o medir el nivel de uno o más genes en una muestra biológica.

Los kits pueden incluir opcionalmente, por ejemplo, una muestra biológica control o un conjunto de amplicones etiquetados control que contiene cantidades conocidas de uno o más amplicones reconocidos por las sondas de ácido nucleico de la red. En algunos casos, el control puede ser un inserto (por ejemplo, un inserto de papel o medio electrónico tal como un CD, DVD o disquete) que contiene los intervalos de nivel de expresión de uno o más genes predictivos de una respuesta a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

En algunas realizaciones, los kits pueden incluir uno o más reactivos para procesar una muestra biológica. Por ejemplo, un kit puede incluir reactivos para aislar una proteína de una muestra biológica y/o reactivos para detectar la presencia y/o cantidad de una proteína en una muestra biológica (por ejemplo, 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 algunas realizaciones, los kits pueden incluir un paquete de software para analizar los resultados de, por ejemplo, un análisis de microrred o un perfil de expresión.

Los kits también pueden incluir uno o más anticuerpos para detectar la expresión de proteína de cualquiera de los genes descritos en el presente documento. Por ejemplo, un kit puede incluir (o en algunos casos consistir en) una pluralidad de anticuerpos que pueden unirse específicamente a una o más proteínas codificadas por cualquiera de los genes representados en la tabla 3 y opcionalmente, instrucciones para detectar la una o más proteínas y/o un anticuerpo de detección que comprende un anticuerpo etiquetado de manera detectable que puede unirse a al menos un anticuerpo de la pluralidad. En algunas realizaciones, los kits pueden incluir anticuerpos que reconocen 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 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 o 46 proteínas codificadas por los genes representados en la tabla 3.

Los kits descritos en el presente documento también pueden, opcionalmente, incluir instrucciones para administrar una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib), prediciendo el nivel de expresión de uno o más genes detectables mediante la red que un sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo (por ejemplo, mesilato de lenvatinib).

Los siguientes son ejemplos de la práctica de la invención. No deben interpretarse como que limitan de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estado de mutación como biomarcadores predictivos para la capacidad de respuesta a una terapia que comprende E7080

Propósito: Se observaron la respuesta del tumor y la estabilización de la enfermedad prolongada en pacientes con cáncer de tiroides diferenciado tratado en fase II con E7080 (lenvatinib). Este experimento iba dirigido a identificar mutaciones de aminoácidos que son útiles a la hora de predecir si sujetos responderán a un tratamiento con E7080

usando tres criterios de respuesta: mejor respuesta global, encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión.

Materiales y métodos: Se obtuvieron muestras de tejido por cirugía antes de que los pacientes hubiesen recibido ninguna terapia que comprende E7080 y se procesaron de manera rutinaria con tejidos fijados en formalina, incrustados en parafina (FFPE). El protocolo que se usó fue aprobado por el comité de revisión institucional, y se obtuvo un consentimiento informado de cada sujeto. Se usaron muestras de tejido tumoral de 27 pacientes, para los que estaban disponibles tejidos, para el análisis de mutaciones. Se aisló ADN de bloques de tumores FFPE recogidos de pacientes que participaban en el ensayo. Se extrajo ADN genómico de dos a cinco secciones sin teñir de 10 micras mediante desparafinización y el Qiagen DNA Mini Kit Tissue Protocol con una modificación menor. Para la detección de las mutaciones, se usaron la plataforma SEQUENOM® (San Diego, CA) y OncoCarta™ Panel v1.0 y OncoCarta™ Panel v3.0 (véase, www.sequenom.com/Files/Genetic-Analysis---Graphics/All-Application-PDFs/AssayExplorer2010_1110-Web/). Los OncoCarta™ Panels de Sequenom son un conjunto de ensayos prediseñados y prevalidados para un examen de mutaciones eficiente. Los genes de OncoCarta™ Panel v1.0 y el número de mutaciones (en paréntesis) son: ABL1 (14); AKT1 (7); AKT2 (2); BRAF (25); CDK4 (2); EGFR (40); ERBB2 (9); FGFR1 (2); FGFR3 (7); FLT3 (3); HRAS (10); JAK2 (1); KIT (32); KRAS (16); MET (5); NRAS (19); PDGFRA (11); PIK3CA (14); y RET (6). Los genes de OncoCarta™ Panel v3.0 y el número de mutaciones (en paréntesis) son: ABL1 (2); AKT1 (1); APC (12); BRAF (19); CDKN2A (7); CSF1R (6); CTTNB1 (28); EGFR (32); ERBB2 (2); FLT3 (3); HRAS (2); JAK3 (3); KIT (3); KRAS (5); MET (6); MLH1 (1); MYC (6); PDGFRA (11); PIK3CA (4); PTEN (14); RB1 (11); RET (13); SRC (1); STK11 (12); P53 (7); y VH1 (7). Los genes de OncoCarta™ Panel v3.0 y el número de mutaciones (en paréntesis) son: ABL1 (2); AKT1 (1); APC (12); BRAF (19); CDKN2A (7); CSF1R (6); CTTNB1 (28); EGFR (32); ERBB2 (2); FLT3 (3); HRAS (2); JAK3 (3); KIT (3); KRAS (5); MET (6); MLH1 (1); MYC (6); PDGFRA (11); PIK3CA (4); PTEN (14); RB1 (11); RET (13); SRC (1); STK11 (12); P53 (7); y VH1 (7).

Se amplificó ADN usando los conjuntos de cebadores de PCR OncoCarta™, se inactivaron los nucleótidos no incorporados mediante fosfatasa alcalina de gamba (SAP), y se realizó una única reacción de extensión de base usando cebadores de extensión que se hibridan de manera inmediatamente adyacente a las mutaciones y una mezcla personalizada de nucleótidos. Se retiraron las sales mediante la adición de una resina de intercambio catiónico. Se ubicaron reacciones multiplexadas sobre el SpectroChipII, y se resolvieron las mutaciones, si estaban presentes, mediante MALDI-TOF en el espectrómetro de masas compacto (Sequenom®, San Diego, CA). El OncoCarta™ Panel v1.0 (Sequenom®, San Diego, CA) consiste en 24 conjuntos de pares de cebadores y 24 conjuntos de cebadores de extensión, y tiene la capacidad para detectar 225 mutaciones en 19 genes. El OncoCarta™ Panel v 3.0 consiste en 24 conjuntos de pares de cebadores y 24 conjuntos de cebadores de extensión, y tiene la capacidad para detectar 218 mutaciones en 26 genes. Cada conjunto consiste en 5-9 pares de cebadores en la reacción de PCR. Se han diseñado dos tipos de ensayos en el panel OncoCarta, denominados simples y complejos. Los ensayos simples son aquellos en los que un único ensayo puede detectar los cambios de aminoácido en ese codón. Los ensayos complejos son aquellos que requieren más de un ensayo para identificar cambios o deleciones e inserción en el codón, y por tanto pueden detectar múltiples sustituciones o deleciones de aminoácidos diferentes. Un ejemplo de un ensayo complejo implica el uso de los ensayos KRAS_1 y KRAS_2, que interrogan a 2 posiciones de nucleótido diferentes dentro del codón 12 e identifican conjuntamente todos los cambios de aminoácido en el codón 12. En la mutación KRAS G12R, el alelo mutante tiene el codón CGT (arginina) a diferencia del alelo de tipo silvestre, que tiene el codón GGT (glicina). Así, el primer nucleótido del codón 12 tiene que ser "C" y el segundo nucleótido tiene que ser "G". El ensayo KRAS_2 revela que el nucleótido se incorpora en el primer nucleótido del codón 12, y el ensayo KRAS_1 es para el segundo nucleótido. Conjuntamente, los datos de estos dos ensayos detectan la sustitución G12R. Para la mutación BRAF V600E (GTG a GAG), el ensayo BRAF_16 (para el primer nucleótido del codón 600) identifica "G" y BRAF_15 (para el segundo nucleótido) identifica "A". Para la mutación VHL P81S, el alelo mutante tiene TCG (serina) mientras que el alelo de tipo silvestre tiene CCG (prolina). El ensayo VHL_498 revela que el nucleótido se incorpora en el primer nucleótido del codón 81. Para la mutación KRAS Q61R, el ensayo KRAS_7 discrimina el alelo mutante (CGA, arginina) del alelo de tipo silvestre (CAA, glutamina) examinando la variación de nucleótido en la segunda posición del codón. En el caso del codón de NRAS 61, hay tres mutaciones conocidas, Q61L (CAA a CTA), Q61R (CAA a CGA) y Q61P (CAA a CCA). El ensayo NRAS_6 detecta la variación de nucleótido en la segunda posición del codón. Ensayos incluso más complejos también están incluidos en OncoCarta™, que interroga las inserciones y deleciones dentro del gen EGFR.

El análisis de datos se realizó usando el software MassArray Type Analyzer (Sequenom®), que facilita la visualización de patrones de datos, así como los espectros sin procesar. Todas las mutaciones del informe de mutaciones Onco se revisaron manualmente para identificar picos mutantes "reales" con respecto a picos de sal u otros picos de fondo.

El periodo durante el cual un paciente toma E7080 se dividió artificialmente en diferentes ciclos para una mayor facilidad de evaluación y seguimiento. Los pacientes recibieron E7080 a una dosis de 24 mg orales una vez al día en ciclos de 28 días. Con fines analíticos, las valoraciones de los desenlaces clínicos se realizaron en el momento del seguimiento mínimo del mes 9 y del mes 14. Para el ensayo de cáncer de tiroides con E7080, cada ciclo es de 28 días (4 semanas) de modo que el día 1-28 es el ciclo 1; el día 29 es el día 1 del ciclo 2; y el día 57 es el día 1 del ciclo 3. Se tomaron muestras de sangre para análisis farmacocinético (PK) los días 1 y 8 del ciclo 1, el día 1 del ciclo 2 y el día 1 del ciclo 3. Se tomaron un total de 9 muestras por paciente tal como sigue: ciclo 1 día 1: inmediatamente

antes de la dosis de E7080, y a las 0,5 y 2 horas tras la primera dosis de E7080 (posteriormente a la dosis); ciclo 1 día 8: inmediatamente antes de la dosis de E7080; ciclo 2 día 1: inmediatamente antes de la dosis de E7080, 0,5 y 2 horas posteriormente a la dosis; ciclo 3 día 1: inmediatamente antes de la dosis de E7080 y 2 horas posteriormente a la dosis. Para el análisis de supervivencia libre de progresión, se usó el parámetro PK como covariable en el modelo Cox de riesgos proporcionales.

Los tres criterios de respuesta: mejor respuesta global, encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión se definen a continuación.

“Mejor respuesta global” (BOR, *best overall response*) se refiere a tener uno de los siguientes estados - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD).

“Beneficio clínico” (CB) se refiere a tener uno de los siguientes estados - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR); o enfermedad estable (SD) con 6 meses o más de supervivencia libre de progresión (PFS).

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

“Respuesta parcial” significa al menos el 30% de disminución en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado de referencia.

“Enfermedad progresiva” (PD) significa al menos el 20% de aumento en la suma del LD de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde que empezó el tratamiento, o la aparición de una o más nuevas lesiones.

“Enfermedad estable” significa ni encogimiento suficiente de las lesiones diana para cumplir los requisitos para PR ni aumento suficiente para cumplir los requisitos para enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde que empezó el tratamiento.

“Supervivencia libre de progresión” (PFS) se refiere al periodo desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la última fecha antes de entrar en el estado PD.

“Encogimiento del tumor” (TS) significa el cambio porcentual de la suma de diámetros de lesiones diana, tomando como referencia los diámetros de suma de referencia.

Resultados: Un total de 443 mutaciones entre 33 genes se sometieron a prueba usando el panel de mutaciones OncoCarta™ Panel v1.0 y OncoCarta™ Panel v3.0 y se encontraron mutaciones en 16 de los 23 sujetos examinados. De los 27 pacientes, se analizaron 23 muestras de paciente usando OncoCarta™ Panel v1.0 y usando OncoCarta™ Panel v3.0. Se identificaron 12 mutaciones entre 10 genes y se enumeran en la tabla 4. 7 pacientes eran de tipo silvestre para todos los genes sometidos a prueba.

Tabla 4: Sumario de mutaciones encontradas en pacientes con DTC

N° de paciente	Mutación				
	BRAF	NRAS	KRAS	VHL	Otra mutación
1	WT	Q61P	WT	P81S	ERBB2 (S779_P780insVGS)
2	WT	Q61R	WT	P81S	PTEN (N323S*2)
3	WT	Q61R	WT	WT	
4	WT	Q61R	WT	WT	
5	WT	Q61R	WT	WT	
6	WT	Q61R	WT	P81S	
7	V600E	WT	WT	WT	
8	V600E	WT	WT	WT	myc (A59V)
9	V600E	WT	WT	WT	
10	V600E	WT	WT	WT	
11	WT	WT	WT	P81S	
12	WT	WT	Q61R	WT	
13	WT	WT	G12R	WT	
14	WT	WT	WT	WT	PI3KCA (E545A,E545G)
15	WT	WT	WT	WT	TP53 (R248W)
16	WT	WT	WT	WT	MET (T1010L,T992I)

El número de registro Genbank® para: BRAF es NM_004333,3; para NRAS es NM_002524,2; para KRAS es NM_033360,2 (variante A) y NM_004985,3 (variante B); y para VHL es NM_000551,2 (variante 1) y NM_198156,1 (variante 2).

La mejor respuesta global era significativamente mejor en pacientes cuyo tumor tenía mutaciones en cualquiera de los genes KRAS, NRAS, BRAF, VHL-1 (prueba exacta de Fisher) tal como se muestra en la tabla 5. Por ejemplo, 8 de 8 pacientes con una mutación o bien en NRAS o bien en KRAS tenían una respuesta parcial (PR), mientras que solo 5 de 14 pacientes tenían PR sin mutaciones en NRAS y KRAS.

5

Tabla 5: Mutación y mejor respuesta global (BOR)

Mutación (cualquiera del gen)	Valor p de BOR (exacto de Fisher)	Mutación (cualquiera del gen)	BOR	ACT	NHL
BRAF, NRAS	0.038	BRAF, NRAS	PR	5	8
KRAS, NRAS	0.007	BRAF, NRAS	SD	6	1
BRAF, KRAS, NRAS	0.010	BRAF, NRAS	PD	2	0
BRAF, VHL	0.042	KRAS, NRAS	PR	5	8
BRAF, KRAS, VHL	0.034	KRAS, NRAS	SD	7	0
KRAS, NRAS, VHL	0.020	KRAS, NRAS	PD	2	0
BRAF, KRAS, NRAS, VHL	0.012	BRAF, KRAS, NRAS	PR	3	10
		BRAF, KRAS, NRAS	SD	6	1
		BRAF, KRAS, NRAS	PD	2	0
		BRAF, VHL	PR	10	0
		BRAF, VHL	SD	5	0
		BRAF, VHL	PD	0	2
		BRAF, KRAS, VHL	PR	8	8
		BRAF, KRAS, VHL	SD	5	0
		BRAF, KRAS, VHL	PD	0	2
		KRAS, NRAS, VHL	PR	5	8
		KRAS, NRAS, VHL	SD	7	0
		KRAS, NRAS, VHL	PD	1	1
		BRAF, KRAS, NRAS, VHL	PR	3	10
		BRAF, KRAS, NRAS, VHL	SD	6	1
		BRAF, KRAS, NRAS, VHL	PD	1	1

* El tamaño del tumor de 1 paciente de tipo silvestre no era evaluable

10

Los pacientes con mutaciones en o bien NRAS, o bien NRAS o KRAS, o bien BRAF, KRAS o NRAS, tenían una mayor disminución del tamaño del tumor indicado como cambio porcentual en el encogimiento del tumor, en comparación con pacientes que eran de tipo silvestre para NRAS, KRAS y BRAF (véase, tabla 6).

Tabla 6: Mutación y % de encogimiento del tumor máximo

Gen (cualquiera del gen)	Tipo silv *	Mutación	% de encogimiento de tumor (mediana)		Valor p
			Tipo silv	Mutación	
NRAS	16	6	-35.5	-45.5	0.042
KRAS, NRAS	14	8	-31.0	-44.5	0.022

* El tamaño del tumor de 1 paciente de tipo silvestre no era evaluable

15

20

25

30

La asociación de mutaciones génicas con supervivencia libre de progresión de pacientes tratados se analizó primer realizando una prueba de rangos logarítmicos y entonces usando el modelo Cox de riesgos proporcionales con o sin covariables. La covariable usada son los siguientes parámetros PK: ciclo 1 día 1 Cmax (concentración de E7080 2 h tras la dosificación en el ciclo 1 día 1: MAX1); ciclo 1 día 1 Cmin (concentración de E7080 antes de la dosificación en el ciclo 1 día 8: MIN1); ciclo 2 día 1 Cmax (concentración de E7080 2 h tras la dosificación en el ciclo 2 día 1: MAX2); ciclo 2 día 1 Cmin (concentración de E7080 antes de la dosificación en el ciclo 2 día 1: MIN2). La prueba de rangos logarítmicos demostró que los pacientes con mutaciones en NRAS solas o con mutaciones en o bien NRAS o bien KRAS tenían una mejor supervivencia libre de progresión que aquellos pacientes que eran del tipo silvestre para NRAS o KRAS (Fig. 1). El modelo Cox de riesgos proporcionales también demostró que los pacientes con mutaciones en o bien NRAS, o bien KRAS, o bien VHL y mutaciones en o bien NRAS, o bien o bien KRAS o bien BRAF tenían una mejor supervivencia libre de progresión que aquellos que no tenían mutaciones basándose en la prueba de Cox de riesgos proporcionales con una covariable de ciclo 1 día 1 Cmin (MIN1), dado que el tipo silvestre se fijó como 1 y la mutación se fijó como 0 y los coeficientes menores de 0 suponen un menor riesgo para la mutación (véase, tabla 7).

Tabla 7: Mutación génica y supervivencia libre de progresión

Mutación (cualquiera del gen)	n	Coef	Valor p	PR Mina
KRAS.NRAS	23	-1.586	0.043	
NRAS	23	-2.091	0.047	
BRAF.KRAS.NRAS	23	-1.428	0.032	0.037
KRAS.NRAS	23	-2.629	0.021	0.007
KRAS.NRAS.VHL	23	-1.700	0.043	0.018

Conclusión: Las mutaciones en un pequeño conjunto de genes, tales como uno cualquiera o una combinación de NRAS, KRAS, BRAF y VHL en tumores de tiroides son útiles a la hora de predecir la respuesta clínica de un paciente que presenta, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar cáncer de tiroides, a una terapia que comprende E7080.

Ejemplo 2: Tiroglobulina como biomarcador para una terapia que comprende E7080 en tumores de tiroides

Propósito: Este experimento iba dirigido a determinar si los cambios en los niveles de tiroglobulina son predictivos de si pacientes responden al tratamiento con E7080 usando tres criterios de respuesta clínica: respuesta del tumor, encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión.

Material y métodos: El suero para los ensayos de tiroglobulina se recogió en el plazo de 72 horas antes del día 1 de todos los ciclos. Se administraron por vía oral 24 mg de E7080, continuamente de manera diaria en ciclos de 28 días. Se usaron muestras de suero de 58 pacientes para las mediciones de tiroglobulina. Se extrajeron 6 ml de sangre en tubos con la parte superior roja y se deja coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 min. En el plazo de 60 minutos de la recogida de muestras, los tubos se centrifugaron durante 15 minutos a 20-25°C a 1000x g. El sobrenadante se extrajo sin alterar el sedimento, se puso en tubos de muestra con filtro de suero y se enviaron congelados al laboratorio central para las pruebas el día de la recogida. El nivel de tiroglobulina se detectó mediante un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE 2000 Thyroglobulin Assay System, Siemens) siguiendo el procedimiento de funcionamiento convencional. En resumen, la tiroglobulina sérica se capturó mediante perlas recubiertas con anticuerpo anti-tiroglobulina y se detectaron usando anticuerpo anti-tiroglobulina ligado a fosfatasa alcalina. El nivel de tiroglobulina sérica se calculó a partir de una curva patrón generada con tiroglobulina liofilizada. La tiroglobulina sérica era estable durante hasta 2 meses cuando se almacenaba congelada para el ensayo. La sensibilidad de este ensayo era de 0,2 ng/ml.

Resultados: De 58 muestras de paciente, se usaron 50 muestras de sangre previas y posteriores al tratamiento como máximo para estos análisis. Se observaron cambios drásticos en los niveles de tiroglobulina 29 días tras el inicio del tratamiento con E7080. Los niveles de tiroglobulina disminuyeron significativamente 48 días (en el plazo de 2 ciclos) tras el tratamiento con E7080 y la disminución continuó hasta el ciclo 8.

Los cambios en los niveles de tiroglobulina en grupos de pacientes, que tienen una respuesta parcial (PR) con E7080, eran significativamente menores que aquellos en grupos de pacientes, que tenían o bien enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD) (prueba de la U de Mann Whitney, Fig. 2; ○ mediana de grupos PR, ● mediana de Otros - SD o PD y tabla 8, parte superior). Además, los cambios en los niveles de tiroglobulina estaban asociados con el encogimiento del tumor tras la finalización del ciclo 2 (56 días tras el tratamiento) (prueba de correlación por rangos de Spearman, tabla 8, parte central). La prueba Cox de riesgos proporcionales demostró que la supervivencia libre de progresión de los pacientes estaba asociada con cambios en los niveles de tiroglobulina 28 días tras el tratamiento con E7080, los que indica que una mayor disminución predice una PFS más larga (tabla 8, parte inferior).

Tabla 8: Cambios en los niveles de tiroglobulina tras el tratamiento con E7080

(a) Disminución grande del nivel de tiroglobulina en el grupo de pacientes con PR

Variable	Time point	n	Disminución		Disminución		
			TR	PR	SD	PD	P
Tiroglobulina	CICLO 2 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	49	0.195	0.233	0.288	0.460	0.154
	CICLO 3 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	44	0.109	0.144	0.223	0.243	0.034
	CICLO 4 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	44	0.079	0.112	0.227	0.390	0.007
	CICLO 5 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	42	0.106	0.119	0.332	0.403	0.019
	CICLO 6 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	40	0.078	0.133	0.198	0.235	0.044

(b) Asociación de la disminución grande del nivel de tiroglobulina con el % de encogimiento del tumor

Variable	Time point	Asociación de la disminución grande del nivel de tiroglobulina con el % de encogimiento del tumor	
		Chi-square	P-value
Tiroglobulina	CICLO 2 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	0.163	0.280
	CICLO 3 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	0.342	0.026
	CICLO 4 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	0.457	0.002
	CICLO 5 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	0.443	0.004
	CICLO 6 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	0.358	0.023

(c) Asociación de un cambio del nivel de tiroglobulina con la PFS tras 1 ciclo de tratamiento con E7080

Factor	Time to progression	n	TR	P-value
Tiroglobulina	CICLO 2 DÍA 1/CICLO 1 DÍA 1	49	0.995	0.039

Conclusión: Los cambios en los niveles de tiroglobulina tras la terapia con E7080 están asociados con la respuesta del tumor, la disminución de tamaño del tumor y la supervivencia libre de progresión y pueden usarse para predecir la respuesta clínica tan pronto como 4 semanas tras el tratamiento con E7080. Por tanto, los niveles de tiroglobulina son útiles a la hora de valor si continuar con la terapia que comprende E7080.

Ejemplo 3: Citocina, quimiocina y factores angiogénicos (biomarcadores sanguíneos) como biomarcadores predictivos y de respuesta de E7080

Propósito: La angiogénesis se regula mediante la señalización a través de múltiples receptores de factores del crecimiento, tal como el receptor de VEGF y FGF. La señalización del receptor de VEGF también está asociada con una función celular inmunitaria. El propósito de este análisis era medir la citocina, la quimiocina y los factores angiogénicos (denominados colectivamente en el presente documento “biomarcadores sanguíneos”) en muestras de suero obtenidas de pacientes en ensayos clínicos tanto previamente como posteriormente al tratamiento con E7080 y para identificar biomarcadores sanguíneos que pueden usarse para predecir si los pacientes responderán a un tratamiento con E7080. Para estos análisis, se emplearon tres criterios de respuesta, concretamente: respuesta del tumor, % de encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión.

“Respuesta del tumor” (TR) compara sujetos con “respuesta parcial” (PR) con sujetos con o bien enfermedad estable (SD) o bien enfermedad progresiva (PD).

Materiales y métodos: Los pacientes recibieron E7080 a una dosis de 24 mg por vía oral una vez al día en ciclos de 28 días. Se recogieron muestras de suero en el ciclo 1 día 1 (previamente al tratamiento), ciclo 1 día 8 y ciclo 2 día 8 (es decir, día 36 posteriormente al tratamiento). Se extrajeron 7,5 ml de sangre en un tubo de acero inoxidable (SST) de suero y se deja coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 min. En el plazo de 60 minutos de recogida de las muestras, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 20-25°C a 1400x g. Se extrajo el sobrenadante sin alterar el sedimento y se mezcló el suero y se dividió en dos tubos de muestra y se almacenaron congelados (-70°C) en una posición vertical hasta un tratamiento adicional para su análisis. Se usaron muestras de suero de 58 pacientes para el análisis de biomarcadores sanguíneos. Se usó el suero del ciclo 1 día 1 (referencia), ciclo 1 día 8, y ciclo 2 día 8 en este análisis. Se analizó la asociación de supervivencia libre de progresión con o sin una covariable. Las covariables usadas son los siguientes parámetros PK: ciclo 1 día 1 Cmax (concentración de E7080 2 h tras la dosificación en el ciclo 1 día 1: MAX1); ciclo 1 día 1 Cmin (concentración de E7080 antes de la dosificación en el ciclo 1 día 8: MIN1); ciclo 2 día 1 Cmax (concentración de E7080 2 h tras la dosificación en el ciclo 2 día 1: MAX2); ciclo 2 día 1 Cmin (concentración de E7080 antes de la dosificación en el ciclo 2 día 1: MIN2). Las muestras de suero se sometieron a prueba en formato de lotes cuando todos los puntos de tiempo del mismo sujeto se sometieron a ensayo el mismo día. El día del ensayo, las muestras se retiraron de -80°C y se permitió que se descongelaran y alcanzaran temperatura ambiente. Las muestras de suero se sometieron a prueba usando los siguientes kits de ensayo comerciales según las instrucciones del fabricante: Human Soluble Tie-2 ELISA (R&D Systems n.º de cat. DTE200), Human Angiopoietin-1 ELISA (R&D Systems n.º de cat. DANG10), Human FGF23 ELISA, Human SDF-1a ELISA, Human Angiopoietin-2 ELISA (R&D Systems n.º de cat. DANG20), Human Soluble Receptor Multiplex (Millipore n.º de cat. HSCR-32K; sVEGF R1, sVEGF R2 y sVEGF R3 solo), Human Cytokine/Chemokine Panel I Multiplex (Millipore n.º de cat. MPXHCYTO-60K; IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, sCD40L, EGF, eotaxina, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-AA, RANTES, TGF-α, TNF-α y VEGF solo) y Human Growth Factor Multiplex (Origene TruPLEX n.º de cat. AM100096; PDGF-AB, PDGF-BB, FGF4, VEGFD, FGF2, EGF, HGF, FLT3LG, ANGPT2, PGF y VEGFA).

Las placas de ELISA se midieron usando un lector de microplacas cinético UVmax de Molecular Devices con software SoftMax Pro 5.2. Los ensayos múltiplex se realizaron usando el sistema Bio-Plex de Bio-Rad con software Bio-Plex Manager 4.1. Las concentraciones proteína finales (pg/ml) se calcularon a partir de la curva patrón para cada ensayo. Dependiendo del ensayo, las muestras de suero pueden haberse diluido en tampón de ensayo antes de las pruebas. En estos casos, las concentraciones de proteína se multiplicaron por el factor de dilución.

Resultados y discusión: De 58 muestras de pacientes, se usaron entre 27 y 49 muestras de sangre previas y posteriores al tratamiento para los análisis. Se observó un cambio significativo en los niveles de 23 factores entre 46 factores sometidos a prueba en 50 ensayos en ambos, o en cualquier, del ciclo 1 día 8 o el ciclo 2 día 8 en el suero de pacientes tratados con E7080 en comparación con niveles previos al tratamiento (ciclo 1 día 1 (referencia)) (tabla 9).

Tabla 9: Cambio en los niveles de biomarcadores sanguíneos tras el tratamiento con E7080

Factor	Punto de tiempo		Número		Niveles previos		Post-tratamiento		Cambios en valores		
	Pre	Post	Pre	Post	median	IC95	median	IC95	median	IC95	P-value
EGF	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	42	44	119.9	128.5	75.9	76.6	0.808	0.735	3.7E-02
Eotaxina	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	128.2	75.9	154.7	117.5	1.171	0.313	3.2E-05
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	128.2	75.9	177.0	123.9	1.363	0.540	1.1E-06
G-CSF	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	51.2	34.5	67.1	46.3	1.250	0.570	3.8E-04
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	51.2	34.5	61.3	53.8	1.215	1.011	8.8E-03
IL-6	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	37	49	9.9	23.3	17.3	34.9	1.824	2.759	2.1E-03
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	34	44	9.9	23.3	15.0	34.4	1.299	2.069	1.9E-02
IL-7	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	27	49	3.3	15.7	6.4	14.5	1.000	0.507	3.8E-02
IL-8	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	48	49	26.1	24.9	31.7	28.4	1.164	0.660	1.2E-02
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	43	44	26.1	24.9	31.4	20.3	1.205	0.799	7.8E-03
IL-17	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	39	49	9.3	30.7	14.4	52.2	1.025	0.378	4.7E-02
IP-10	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	387.7	313.0	474.3	443.1	1.249	0.410	2.7E-05
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	387.7	313.0	602.8	538.5	1.382	0.719	9.4E-04
MCP-1	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	582.7	323.3	618.0	342.1	1.086	0.431	4.1E-03
TGF α	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	45	49	12.2	12.0	14.6	9.9	1.157	0.706	2.8E-02
VEGF	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	48	49	622.0	1845.8	741.4	1918.7	1.290	0.517	1.2E-04
Ang-2	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	2717.0	1697.8	1812.0	1150.0	0.665	0.298	3.1E-13
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	2717.0	1697.8	1533.0	729.0	0.618	0.379	1.6E-11
Tie-2	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	33675.0	10817.5	31685.0	11800.0	0.917	0.166	9.4E-06
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	33675.0	10817.5	26220.0	6845.0	0.766	0.143	9.1E-09
sVEGFR1	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	43	49	345.2	539.7	300.0	341.0	0.920	0.361	6.0E-03
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	38	44	345.2	539.7	341.5	444.9	0.805	0.660	3.5E-02
sVEGFR2	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	26778.4	9033.4	18823.1	6482.8	0.676	0.230	7.4E-13
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	44	44	26778.4	9033.4	13352.1	4041.9	0.499	0.167	5.7E-13
sVEGFR3	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	39	44	6226.6	4858.8	4030.9	6017.5	0.843	0.327	1.8E-03
EGF (80)	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	38	41	879.6	753.5	875.8	823.7	1.170	0.653	4.7E-02
HGF (86)	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	46	48	1201.8	651.4	1339.3	1335.9	1.096	0.572	2.7E-02
FLT3 LG (89)	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	48	48	80.4	56.5	71.1	50.6	0.885	0.249	5.4E-03
ANG2 (90)	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	48	48	928.2	748.9	688.6	442.3	0.671	0.218	3.2E-12
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	41	41	928.2	748.9	600.6	373.9	0.586	0.327	2.9E-09
PGF (91)	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	48	48	16.1	8.5	35.9	37.2	2.306	1.769	1.7E-09
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	41	41	16.1	8.5	46.0	55.1	3.050	2.717	3.0E-11
VEGFA (100)	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	48	48	125.9	142.4	202.1	204.5	1.280	0.838	9.4E-08
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	41	41	125.9	142.4	212.5	191.4	1.426	0.941	3.2E-04
SDF-1 α	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 1 DÍA 8	49	49	2582.6	957.7	3129.0	1161.8	1.210	0.172	5.3E-12
	CICLO 1 DÍA 1	CICLO 2 DÍA 8	43	43	2582.6	957.7	3529.5	970.0	1.345	0.246	6.8E-13

A continuación, se valoró si los cambios en los niveles de expresión de estos factores estaban asociados con los desenlaces clínicos (respuesta del tumor; PR y otros (SD o PD), encogimiento del tumor y PFS).

Tabla 10: Concentración y razón de biomarcadores sanguíneos y respuesta del tumor

Factor	Punto de tiempo	PR		Otros		valor p
		Mediana	ICR	Mediana	ICR	
IFN-g	CICLO 1 DÍA 1	7.9	14.1	21.2	60.2	0.013
Ang-2		2530.5	914.5	3399.0	2288.0	0.032
ANG2 (90)		829.5	541.3	1032.9	1113.4	0.032
ANG2 (90)	CICLO 1 DÍA 8	591.7	329.3	799.3	505.6	0.043
SDF-1a		3294.0	1271.3	2915.0	866.2	0.042
IL-6	CICLO 2 DÍA 8	8.2	17.8	33.9	33.7	0.026
FGF-2	CICLO 1 DÍA 8 / CICLO 1 DÍA 1	1.189	0.821	0.952	0.397	0.021
GM-CSF		1.037	0.641	0.945	0.459	0.044
Eotaxina	CICLO 2 DÍA 8 / CICLO 1 DÍA 1	1.541	0.464	1.242	0.411	0.008
IP-10		1.547	0.616	1.151	0.606	0.039
Tie-2	CICLO 2 DÍA 8 / CICLO 1 DÍA 8	0.791	0.159	0.852	0.206	0.023
FGF2 (79)		1.132	1.051	0.978	0.391	0.043
GM-CSF		1.051	0.547	0.876	0.439	0.070
HGF (86)		0.789	0.318	1.087	0.491	0.004
VEGFA (100)		0.899	0.521	1.172	0.422	0.011

Las concentraciones medianas de 4 factores (IFN-g, ANG-2, SDF-1a e IL-6) en 5 ensayos previamente al tratamiento o bien 1 semana o 5 semanas tras el tratamiento con E7080 eran significativamente diferentes en pacientes que respondieron a un tratamiento con E7080 (grupo PR) en comparación con el grupo “otros” (pacientes con SD o PD) (tabla 10, prueba de la U de Mann-Whitney). Por ejemplo, las concentraciones de IFN-g y ANG-2 previamente al tratamiento eran significativamente menores que las observadas en pacientes que tenían o bien SD o bien PD, lo que indica que las concentraciones bajas de IFN-g y ANG-2 antes del comienzo del tratamiento con E7080 son predictivas de respuesta beneficiosa del tumor a E7080. Los cambios en los niveles de expresión de 3 factores (FGF2, eotaxina, IP-10) aumentaron en el grupo PR o bien en el ciclo 1 día 8 o bien en el ciclo 2 día 8, mientras que el nivel de expresión de estos 3 factores disminuyó en el grupo “otros”. De manera interesante, los niveles de expresión de GM-CSF disminuyeron solo en los grupos otros en el ciclo 2 día 8 en comparación con o bien el ciclo 1 día 1 o bien el ciclo 1 día 8. Además, los niveles de expresión de Tie-2, HGF y VEGF disminuyeron significativamente en los grupos PR en el ciclo 2 día 8 más que en el grupo “otros” en comparación con el ciclo 1 día 8. Estos resultados demostraron que los cambios en los niveles de expresión de biomarcadores sanguíneos estaban asociados con y por tanto pueden usarse para predecir respuestas de tumores a terapia que comprende E7080.

A continuación, se investigaron los factores asociados con encogimiento del tumor (prueba del coeficiente de correlación de Pearson, tabla 11).

Tabla 11: Concentración y razón de biomarcadores sanguíneos y % de encogimiento del tumor máximo

Factor	Punto de tiempo	Correlación r3	valor p
ANG2 (90)	CICLO 1 DÍA 1	0.309	0.033
PDGFAB (68)		-0.420	0.011
Ang-2		0.341	0.012
sVEGFR2		0.289	0.036
VEGF		0.276	0.048
IL-10	CICLO 1 DÍA 8	-0.315	0.035
SDF-1a		-0.354	0.009
IL-13		0.399	0.048
PGF (91)	CICLO 2 DÍA 8	0.305	0.040
VEGFA (100)		0.300	0.043
RANTES		-0.311	0.045
VEGF		0.292	0.047
FGF-2		0.347	0.021
IL-10	CICLO 1 DÍA 8/CICLO 1 DÍA 1	-0.38	0.020
GM-CSF		0.360	0.032
IL-1a	CICLO 2 DÍA 8/CICLO 1 DÍA 1	0.468	0.028
TGFa		-0.348	0.030
IL-6	CICLO 2 DÍA 8/CICLO 1 DÍA 8	0.392	0.017
Tie-2		0.352	0.019
PGF (91)		-0.214	0.045
sVEGFR1		0.332	0.032
VEGFA (100)		0.219	0.035

La concentración de 4 factores (ANG-2, PDGF-AB, sVEGFR2 y VEGF) en 5 ensayos estaba asociada significativamente con el encogimiento del tumor previamente al tratamiento. Estos estudios indicaron que concentraciones menores de estos 4 factores pueden predecir un mayor encogimiento del tumor, mientras que una concentración mayor de PDGF-AB puede predecir un mayor encogimiento del tumor. La concentración de 3 factores (IL-13, PGF y VEGF) en 4 ensayos o bien 1 semana o bien 5 semanas tras los tratamientos con E7080 estaban asociadas significativamente con el encogimiento del tumor. Estos estudios mostraron que concentraciones menores de estas IL-13, PGF y VEGF son predictivas de un mayor encogimiento del tumor en puntos de tiempo indicados. La concentración mayor de 3 factores (IL-10, SDF1a y RANTES) en 3 ensayos o bien 1 semana o 5 semanas tras los tratamientos de E7080 son predictivas de un mayor encogimiento del tumor. El aumento de los niveles de expresión (que indica una alta razón) de FGF2, IL10, GMCSF en el ciclo 1 día 8 en comparación con el ciclo 1 día 1 estaban asociados significativamente con el encogimiento del tumor y son predictivos de un mayor encogimiento del tumor. En el ciclo 2 día 8 en comparación con el ciclo 1 día 1, una alta razón de IL1a y TGFa es predictiva de un mayor encogimiento del tumor. Una razón baja de la expresión de 4 factores (IL-6, Tie-2, sVEGFR1 y VEGF) en el ciclo 2 día 8 en comparación con el ciclo 1 día 8 estaba asociada con un mayor encogimiento del tumor. Una razón alta de la expresión de PGF en el ciclo 2 día 8 en comparación con el ciclo 1 día 8 estaba asociada con un mayor encogimiento del tumor.

El modelo Cox de riesgos proporcionales se realizó para identificar biomarcadores sanguíneos que predijesen la supervivencia libre de progresión mediante o bien concentraciones o bien la razón (cambios en los niveles de expresión) de factores. Se usó un parámetro farmacocinético (PK) como covariable en el modelo Cox de riesgos proporcionales. Las concentraciones bajas de ANG-2 y VEGF en el ciclo 1 día 1, o una razón baja de IL-12(p40) en el ciclo 2 día 8 en comparación con el ciclo 1 día 1 estaban asociadas significativamente con una PFS más larga, lo que indica que estos factores pueden usarse como biomarcadores para la predicción o la respuesta a la terapia con E7080 (tabla 12). El modelo Cox de riesgos proporcionales con parámetro PK demostró que las concentraciones altas de 7 factores (GCSF, MIP1b, FGF2, MIP1a, IL6, IL13 y sVEGFR3) previamente al tratamiento pueden ser predictivas de una PFS más larga; mientras que las concentraciones bajas de ANG-2 previamente al tratamiento pueden ser predictivas de una PFS más larga. El modelo Cox de riesgos proporcionales con parámetro PK demostró que las razones bajas de 7 factores (FLT3LG, RANTES, GCSF, sVEGFR1, EGF, PDGF-BB, PDGF-AA) son predictivas de una mejor PFS y que las razones altas de 4 factores (VEGFD, IL10, IL1RA, PDGF-AB) son predictivas de una mejor PFS.

Tabla 12: Concentración y razón de biomarcador sanguíneo y supervivencia libre de progresión

Factor	Tiempo	Coef	Valor p	Covariable (valor p)			
				MAX1	MAX2	MIN1	MIN2
Ang-2	CICLO 1 DÍA 1	2.7E-04	0.017				
VEGFA (100)		1.4E-03	0.020				
IL-12(p40)	CICLO 2 DÍA 8/CICLO 1 DÍA 1	1.9E-01	0.046				
Ang-2	CICLO 1 DÍA 1	3.3E-04	0.004	0.006	0.006		
G-CSF		-1.6E-02	0.045	0.01	0.007		
ANG2 (90)		6.5E-04	0.021	0.003	0.01		
MIP-1b		-1.1E-02	0.048	0.007	0.006		
FGF-2		-1.1E-02	0.049	0.003	0.004		
MIP-1a		-2.6E-02	0.033	0.003	0.009		
IL-6		-3.0E-02	0.018	0.002	0.002		
IL-13		-3.0E-02	0.033	0.047			0.049
sVEGFR3		-1.0E-04	0.045	0.001	0.003	0.023	
FLT3 LG (89)		1.7E+00	0.022			0.049	
VEGFD (78)	CICLO 1 DÍA 8/CICLO 1 DÍA 1	-1.2E+00	0.043	0.006	0.006		
RANTES		2.5E+00	0.018	0.006	0.014		
IL-10		-8.6E-01	0.050	0.014	0.019		
IL-1ra		-8.3E-01	0.033	0.028	0.008		
PDGF AB (68)		-2.0E+00	0.043			0.018	0.031
G-CSF		2.2E-01	0.021	0.025			
FLT3 LG (89)	CICLO 2 DÍA 8/CICLO 1 DÍA 1	6.4E-01	0.029	0.002	0.008		
sVEGFR1		9.3E-01	0.038			0.042	
EGF (80)		1.1E+00	0.036	0.006	0.01		
PDGF BB (73)		4.4E-01	0.044			0.018	
PDGF-AA		2.3E+00	0.014	0.011	0.003		

Conclusión: La concentración y los cambios en los niveles de expresión de citocinas, quimiocina y factores angiogénicos están asociados a la respuesta del tumor, al encogimiento del tumor y a la supervivencia libre de progresión y pueden usarse para predecir la respuesta clínica al tratamiento con E7080.

Ejemplo 4: Análisis multivariable para desarrollar biomarcadores que combinan dos o más de los 3 factores para a predicción de los desenlaces clínicos

Propósito: El propósito de este análisis era identificar combinaciones de factores, tales como mutaciones, tiroglobulina, biomarcadores sanguíneos que se asocian mejor con los desenlaces clínicos, tal como supervivencia libre de progresión (PFS), que un único factor y para predecir aquellos desenlaces clínicos.

Materiales y métodos: Todos los factores (es decir, mutaciones, tiroglobulina, citocina, quimiocina y factores angiogénicos) se usaron como variables independientes de interés, es decir, como candidatos de biomarcador. Se usó PFS como variable dependiente, es decir, como uno de los desenlaces clínicos, en este análisis. En primer lugar, todos los factores se examinaron según valores p calculados mediante el modelo Cox de riesgos proporcionales con un único factor. En segundo lugar, todas las combinaciones de los factores examinados se sometieron a prueba mediante el modelo Cox de riesgos proporcionales para encontrar factores significativos en todas las combinaciones de los factores. Las combinaciones en las que todos los factores eran significativos se eligieron para su análisis adicional. Las funciones de riesgo de las combinaciones de factores definidos por sus coeficientes se obtuvieron de este análisis. Cada paciente tiene su propio valor de riesgo para cada modelo, de modo que los pacientes pueden asignarse a dos grupos cuando viene dado un umbral de riesgo para un modelo. Tras agrupar los pacientes, se realizó la prueba de rangos logarítmicos de la supervivencia libre de progresión para

someter a prueba la diferencia de las curvas de supervivencia entre dos grupos (riesgo bajo y riesgo alto). El mejor umbral de riesgo para cada modelo de combinación de factores se identificó haciendo un barrido del umbral para calcular valores p de prueba de rangos logarítmicos y encontrar un umbral que minimice la curva suavizada construida a partir de los valores p, que era similar al enfoque descrito en U. Abel, J. Berger y H. Wiebelt, "CRITLEVEL: An Exploratory Procedure for the Evaluation of Quantitative Prognostic Factors", *Methods Inf. Medicine*, 23(3):154-6(1984). Los mejores umbrales de los modelos dividieron los pacientes en grupos de riesgo alto y bajo. Los pacientes se predicen como de PFS más larga cuando su valor de riesgo es menor que el umbral.

Resultados y discusión: Para encontrar biomarcadores para predecir la PFS en el pretratamiento, se analizaron los datos que estaban disponibles antes del tratamiento. El modelo Cox de riesgos proporcionales demostró 4 tipos de combinación en dos grupos de biomarcadores. Un grupo es ANG-2, VEGF, GCSF y otro grupo es IL13, MIP1a y MIP1b. La razón de riesgo determinada mediante modelos de predicción indicó que la combinación de VEGF y ANG-2 (razón de riesgo =0,386) tenían una predicción de PFS mejor que cada factor individual (VEGF; 0,552, ANG-2; razón de riesgo =0,545). La adición de GCSF a VEGF y ANG-2 no provocó una disminución adicional de la razón de riesgo (0,413). La combinación de IL13 y MIP1a mostró una razón de riesgo baja ($1,0 \times 10^{-9}$) en nuestro modelo de predicción y la adición de MIP1b no afectó a la razón de riesgo adicionalmente (tabla 13).

Tabla 13: Biomarcador predictivo usando una combinación de biomarcadores sanguíneos en pretratamiento

Modelo Cox de riesgos proporcionales (valor p)						Pruebas de rangos logarítmicos				Modelo de predicción
VEGFA	ANG-2	GCSF	IL13	MIP1a	MIP1b	Bajo n _B	Alto n _A	Valor p	HR*	
0.020						15	36	0.198	0.552	$(0.0014) * (VEGFA100) - (0.279) < -0.15$
	0.017					27	26	0.108	0.545	$(0.000267) * (Ang2) - (0.854) < -0.128$
0.037	0.026					23	28	0.021	0.386	$(0.000261) * (Ang2) + (0.00126) * (VEGFA100) - (1.09) < -0.24$
0.016	0.028	0.034				25	26	0.027	0.413	$(0.000591) * (ANG290) + (-0.0178) * (GCSF) + (0.00142) * (VEGFA100) - (-0.671) < 0.651$
			0.009	0.005		7	18	0.015	$1.0E-09$	$(-0.0459) * (IL13) + (0.0459) * (MIP1a) - (0.0395) < 0.268$
			0.031	0.001	0.049	12	13	0.002	0.121	$(-0.0353) * (IL13) + (0.0713) * (MIP1a) + (-0.0154) * (MIP1b) - (0.188) < 0.222$

A continuación, se examinó si la combinación de la mutación génica y biomarcador sanguíneo predecía la PFS mejor que la mutación génica sola. El modelo Cox de riesgos proporcionales demostró 3 grupos de combinación entre 3 mutaciones génicas (tabla 14), tal como:

Grupo (1): mutación NRAS (mu)

- a. más ANG-2;
- b. más VEGF, MIP1b;
- c. más VEGF, MIP1b, sVEGFR3;
- d. NRAS mu más ANG-2, VEGF, MIP1b, sVEGFR3;

Grupo (2): NRAS mu o KRAS mu más ANG-2; y

Grupo (3): NRAS mu o KRAS mu o VHL mu

- a. más MIP1a;
- b. más IL6, VEGF, MIP1a, MIP1b.

Por ejemplo, la razón de riesgo determinada mediante los modelos de predicción indicaba que la combinación de NRAS mu y ANG-2 (razón de riesgo =0,085) predecía la PFS mejor que la mutación sola (NRAS; razón de riesgo =0,124). También la combinación de cualquiera de NRAS mu o KRAS mu y ANG-2 (razón de riesgo =0,083) tenía una razón de riesgo menor que la mutación sola (KRAS mu o NRAS mu; razón de riesgo =0,205). La combinación de cualquiera de BRAF mu o NRAS mu o KRAS mu e IL6, VEGF, MIP1a, MIP1b tenía una razón de riesgo menor (razón de riesgo= $1,9E-10$) que la mutación sola (razón de riesgo=0,086) (tabla 14).

Tabla 14: Biomarcador predictivo usando la combinación de mutación génica y biomarcadores sanguíneos en pretratamiento

Mutación génica		Biomarcadores sanguíneos						n		p		p		p	
Gen	Alélico	Normal	Abn.	Normal	Abn.	Normal	Abn.	Gen	Alélico	Normal	Abn.	Gen	Alélico	Normal	Abn.
0.047								6	17	1.9E-02	0.124				
0.011		0.044		0.035				14	6	1.7E-04	0.297				
0.003		0.010		0.004	0.016			14	6	8.7E-05	0.054				
0.003		0.006	0.017	0.007	0.005			12	8	2.0E-06	2.6E-10				
0.015		0.049						13	8	5.1E-04	0.135				
0.013		0.028						14	7	2.8E-04	0.585				
0.045								5	15	2.7E-02	0.205				
0.010		0.045						13	8	2.7E-04	0.083				
0.004			0.044					11	9	2.6E-04	0.086				
0.030	0.037		0.035	0.036		0.039		10	5	3.3E-05	1.9E-10				

5 **Conclusión:** La combinación de biomarcadores, o bien mutaciones génicas o bien biomarcadores sanguíneos o bien la combinación entre biomarcadores sanguíneos predecía la PFS mejor que un único biomarcador basándose en modelos de predicción tras determinar combinaciones de los mismos usando el modelo Cox de riesgos proporcionales. Las combinaciones de biomarcadores que se encontraron mediante este análisis pueden usarse para predecir los desenlaces clínicos, tales como PFS con E7080 y respuesta a tratamiento con E7080.

10 **Ejemplo 5: Estado de mutación como biomarcadores predictivos para la capacidad de respuesta de pacientes con RCC a una terapia que comprende E7080 o bien solo o bien en combinación con everolímús**

15 **Propósito:** Se observan la respuesta del tumor y la estabilización de la enfermedad prolongada en pacientes con carcinoma de células renales (RCC) tratados en un estudio de fase II con E7080 (sal de ácido metanosulfónico de lenvatinib) solo en combinación con everolímús. Este experimento va dirigido a identificar mutaciones de aminoácidos que son útiles a la hora de predecir si sujetos con RCC responde, o no responden, al tratamiento con E7080 usando tres criterios de respuesta: mejor respuesta global, encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión.

20 **Materiales y métodos:** Se obtuvieron muestras de tejido por cirugía antes de que los pacientes hubiesen recibido ninguna terapia que comprende E7080 y se procesaron de manera rutinaria con tejidos fijados con formalina, incrustados en parafina (FFPE). El protocolo que se usó está aprobado por el comité de revisión institucional, y se obtiene un consentimiento informado de cada sujeto. Se usarán muestras de tejido tumoral de X pacientes, para los que están disponibles tejidos, para el análisis de mutaciones. Se aísla ADN de bloques de tumores FFPE recogidos de pacientes que participaban en el ensayo. Se extrae ADN genómico de dos a cinco secciones no teñidas de 10 micras mediante desparafinización y Qiagen ADN Mini Kit Tissue Protocol con una modificación menor. Para la detección de las mutaciones se usa una tecnología de secuenciación, tal como la plataforma SEQUENOM® (San Diego, CA) y el OncoCarta™ Panel v1.0 y OncoCarta™ Panel v3.0 descritos en el ejemplo 1, secuenciación por semiconductores, tal como Ion Torrent PGM, High Resolución Melt Analysis, o secuenciación Sanger clásica.

El periodo durante el cual un paciente toma E7080 se divide artificialmente en diferentes ciclos para una mayor facilidad de evaluación y seguimiento. Los pacientes reciben E7080 a una dosis de 24 mg por vía oral una vez al día en ciclos de 28 días o bien solo o bien en combinación con everolímús (E7080 y/o everolímús). Para el ensayo de carcinoma de células renales con E7080, cada ciclo es de 28 días (4 semanas) de modo que el día 1-28 es el ciclo 1; el día 29 es el día 1 del ciclo 2; y el día 57 es el día 1 del ciclo 3. Se toman muestras de sangre para el análisis farmacocinético (PK) en el ciclo 1 día 1, ciclo 2 día 1, y ciclo 3 día 1. Se toman un total de 6 muestras por paciente tal como sigue: ciclo 1 día 1: inmediatamente antes de la dosis de E7080, y de 2 a 8 horas tras la primera dosis de E7080 (posteriormente a la dosis); ciclo 2 día 1: inmediatamente antes de la dosis de E7080 y de 2 a 8 horas tras la primera dosis de E7080 (posteriormente a la dosis); ciclo 3 día 1: inmediatamente antes de la dosis de E7080 y de 2 a 8 horas tras la primera dosis de E7080 (posteriormente a la dosis). Para el análisis de supervivencia libre de progresión, se usa el parámetro PK como covariable en el modelo Cox de riesgos proporcionales.

Los cuatro criterios de respuesta: mejor respuesta global, respuesta del tumor, encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión se definen a continuación.

“Mejor respuesta global” (BOR) se refiere a tener uno de los siguientes estados - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD), una asociación de BOR a la mutación génica se analiza mediante la prueba exacta de Fisher.

“Beneficio clínico” (CB) se refiere a tener uno de los siguientes estados - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR); o enfermedad estable (SD) con 6 meses o más de supervivencia libre de progresión (PFS).

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

“Respuesta parcial” significa al menos el 30% de disminución en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado de referencia.

“Enfermedad progresiva” (PD) significa al menos el 20% de aumento en la suma del LD de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde que empezó el tratamiento, o la aparición de una o más nuevas lesiones.

“Enfermedad estable” significa ni encogimiento suficiente de las lesiones diana para cumplir los requisitos para PR ni aumento suficiente para cumplir los requisitos para enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde que empezó el tratamiento.

“Supervivencia libre de progresión” (PFS) se refiere al periodo desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la última fecha antes de entrar en el estado PD y la correlación de la mutación génica con PFS se analiza mediante una prueba de rangos logarítmicos y el modelo Cox de riesgos proporcionales.

“Encogimiento del tumor” (TS) significa el cambio porcentual de la suma de diámetros de lesiones diana, tomando como referencia los diámetros de suma de referencia y la correlación de la mutación génica con TS se analiza mediante la prueba del coeficiente de correlación producto-momento de Pearson y del coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

“Respuesta del tumor” (TR) compara los sujetos con “respuesta parcial” (PR) con sujetos con o bien enfermedad estable (SD) o bien enfermedad progresiva (PD). => no para el análisis de mutaciones, sino para TG y biomarcadores sanguíneos.

Ejemplo 6: Biomarcadores sanguíneos como biomarcadores predictivos y de respuesta de E7080 o bien solo o bien en combinación con everolímús en sujetos con RCC

Propósito: El propósito de este análisis es medir la citocina, la quimiocina y los factores angiogénicos (denominados colectivamente en el presente documento “biomarcadores sanguíneos”) en muestras de sangre obtenidas de pacientes en ensayos clínicos tanto previamente como posteriormente al tratamiento con E7080 y/o everolímús y para identificar biomarcadores sanguíneos que pueden usarse para predecir si los pacientes con carcinoma de células renales responderán o no responderán a un tratamiento con E7080. Para estos análisis, se emplean cuatro criterios de respuesta, concretamente: mejor respuesta global, respuesta del tumor, % de encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión.

Materiales y métodos: Los pacientes reciben E7080 a una dosis de 24 mg por vía oral una vez al día en ciclos de 28 días o bien solo o bien en combinación con everolímús. Se toman muestras de suero en el ciclo 1 día 1 (previamente al tratamiento), ciclo 1 día 15 e inmediatamente antes de dosificar el día 1 de cada ciclo posterior y en el momento cuando el paciente está fuera del tratamiento. Se extraen 7,5 ml de sangre en un tubo de acero inoxidable (SST) de suero y se deja coagular a temperatura ambiente durante al menos 30 min. En el plazo de 60 minutos de recogida de la muestra, los tubos se centrifugan durante 10 minutos a 20-25°C a 1400x g. El sobrenadante se extrae sin alterar el sedimento y se mezcla el suero y se divide en dos tubos de muestra y se almacenan congelados (-70°C) en una posición vertical hasta un tratamiento adicional para su análisis. Se usan muestras de suero de pacientes para el análisis de biomarcadores sanguíneos. En este análisis se usan suero del ciclo 1 día 1 (referencia), ciclo 1 día 15, muestra previa a la dosis del día 1 de cada ciclo posterior y una muestra de suero cuando el paciente abandona el tratamiento. Se analiza la asociación de supervivencia libre de progresión con o sin una covariable. Las covariables usadas son los siguientes parámetros PK: ciclo 1 día 1 Cmax (concentración de E7080 de 2 h a 8 h tras la dosificación en el ciclo 1 día 1: MAX1); ciclo 2 día 1 Cmax (concentración de E7080 de 2 h a 8 h tras la dosificación en el ciclo 2 día 1: MAX2); ciclo 2 día 1 Cmin (concentración de E7080 antes de la dosificación en el ciclo 2 día 1: MIN2). Se sometieron a prueba muestras de suero en formato de lotes cuando todos los puntos de tiempo del mismo sujeto se someten a ensayo el mismo día. El día del ensayo, se retiraron las muestras de -80°C y se permitió que se descongelaran y alcanzaran temperatura ambiente. Las muestras de suero se someten a prueba usando los siguientes kits de ensayo comerciales según las instrucciones del fabricante: Human Soluble Tie-2 ELISA (R&D Systems n.º de cat. DTE200), Human Angiopoietin-1 ELISA (R&D Systems n.º de cat. DANG10), Human Angiopoietin-2 ELISA (R&D Systems n.º de cat. DANG20), Human Soluble Receptor Multiplex (Millipore n.º de cat. HSCR-32K; sVEGF R1, sVEGF R2 y sVEGF R3 solo), Human Cytokine/Chemokine Panel I Multiplex (Millipore n.º de cat. MPXHCYTO-60K; IL-1α, IL-1β, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17, sCD40L, EGF, eotaxina, FGF-2, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-AA, RANTES, TGF-α, TNF-α y VEGF solo) y Human Growth Factor Multiplex (Origene TruPLEX n.º de cat. AM100096; PDGF-AB, PDGF-BB, FGF4, VEGFD, FGF2, EGF, HGF, FLT3LG, ANGPT2, PGF y VEGFA).

Las placas de ELISA se midieron usando un lector de microplacas cinético UVmax de Molecular Devices con software SoftMax Pro 5.2. Los ensayos múltiplex se realizan usando el sistema Bio-Plex de Bio-Rad con software

Bio-Plex Manager 4.1. Las concentraciones de proteína finales (pg/ml) se calculan a partir de la curva patrón para cada ensayo. Dependiendo del ensayo, las muestras de suero pueden diluirse en tampón de ensayo antes de las pruebas. En estos casos, las concentraciones de proteína se multiplican por el factor de dilución.

- 5 Los cuatro criterios de respuesta; mejor respuesta global, respuesta del tumor, encogimiento del tumor y supervivencia libre de progresión se definen a continuación y se analizan mediante los métodos indicados.

10 “Mejor respuesta global” (BOR) se refiere a tener uno de los siguientes estados: - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR), enfermedad estable (SD) o enfermedad progresiva (PD), y la asociación de BOR a la mutación génica se analiza mediante la prueba exacta de Fisher

15 “Beneficio clínico” (CB) se refiere a tener uno de los siguientes estados, y la asociación de CB a la mutación génica se analiza mediante la prueba de la t de Student y la prueba de la U de Mann-Whitney. - respuesta completa (CR), respuesta parcial (PR); o enfermedad estable (SD) con 6 meses o más de supervivencia libre de progresión (PFS)

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

20 “Respuesta parcial” significa al menos el 30% de disminución en la suma del diámetro más largo (LD) de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado de referencia.

“Enfermedad progresiva” (PD) significa al menos el 20% de aumento en la suma del LD de lesiones diana, tomando como referencia el LD sumado más pequeño registrado desde que empezó el tratamiento, o la aparición de una o más nuevas lesiones.

25 “Enfermedad estable” significa ni encogimiento suficiente de las lesiones diana para cumplir los requisitos para PR ni aumento suficiente para cumplir los requisitos para enfermedad progresiva (PD), tomando como referencia el LD sumado más pequeño desde que empezó el tratamiento.

30 “Supervivencia libre de progresión” (PFS) se refiere al periodo desde la fecha de inicio de tratamiento hasta la última fecha antes de entrar en el estado PD y la correlación de la mutación génica con PFS se analiza mediante una prueba de rangos logarítmicos y el modelo Cox de riesgos proporcionales.

35 “Encogimiento del tumor” (TS) significa el cambio porcentual de la suma de diámetros de lesiones diana, tomando como referencia los diámetros de suma de referencia y la correlación de la mutación génica con TS se analiza mediante la prueba de coeficiente de correlación producto-momento de Pearson y * de coeficiente de correlación por rangos de Spearman.

40 “Respuesta del tumor” (TR) compara los sujetos con “respuesta parcial” (PR) con sujetos con o bien enfermedad estable (SD) o bien enfermedad progresiva (PD), y la asociación de biomarcadores sanguíneos se analiza mediante la prueba de la t de Student y la prueba de la U de Mann-Whitney.

Ejemplo 7: Análisis multivariable para desarrollar biomarcadores que combinan dos o más de los 3 factores para la predicción de los desenlaces clínicos en pacientes con RCC

45 *Propósito:* El propósito de este análisis es identificar combinaciones de factores, tales como mutaciones, y niveles o razones de expresión de citocina, quimiocina y factores angiogénicos, que se asocian mejor con la supervivencia libre de progresión (PFS) que un único factor y predecir los desenlaces clínicos, tales como PFS y TS, en pacientes con RCC.

50 *Materiales y métodos:* Todos los factores (es decir, mutaciones, citocina, quimiocina y factores angiogénicos) se usan como variables independientes de interés, es decir, como candidatos de biomarcador. Se usa PFS como variable dependiente, es decir, como desenlace clínico en este análisis. En primer lugar, todos los factores se examinan según valores p calculados mediante el modelo Cox de riesgos proporcionales con un único factor. En segundo lugar, todas las combinaciones de los factores examinados se someten a prueba mediante el modelo Cox de riesgos proporcionales para encontrar factores significativos en todas las combinaciones de los factores. Las combinaciones en las que todos los factores son significativos se eligen para su análisis adicional. Las funciones de riesgo de las combinaciones de factores definidas por sus coeficientes se obtienen de este análisis. Cada paciente tiene su propio valor de riesgo para cada modelo, de modo que los pacientes pueden asignarse a dos grupos cuando viene dado un umbral de riesgo para un modelo. Tras agrupar los pacientes, se realiza la prueba de rangos logarítmicos de supervivencia libre de progresión para someter a prueba la diferencia de las curvas de supervivencia entre dos grupos (riesgo bajo y riesgo alto). El mejor umbral de riesgo para cada modelo de combinación de factores se identifica haciendo un barrido del umbral para calcular valores p de la prueba de rangos logarítmicos y encontrar un umbral que minimice la curva suavizada construida a partir de los valores p, que es similar al enfoque descrito en U. Abel, J. Berger y H. Wiebelt, “CRITLEVEL: An Exploratory Procedure for the Evaluation of Quantitative Prognostic Factors”, *Methods Inf. Medicine*, 23(3):154-6(1984). Los mejores umbrales de los modelos dividen los pacientes en

65

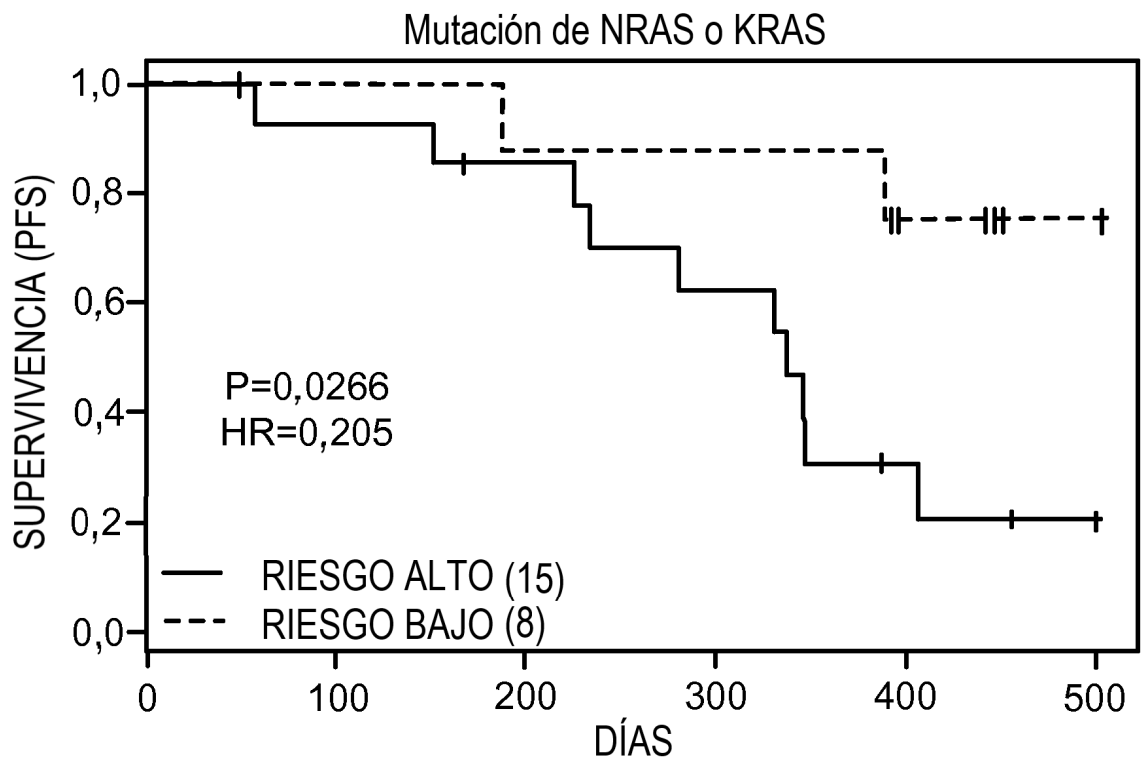
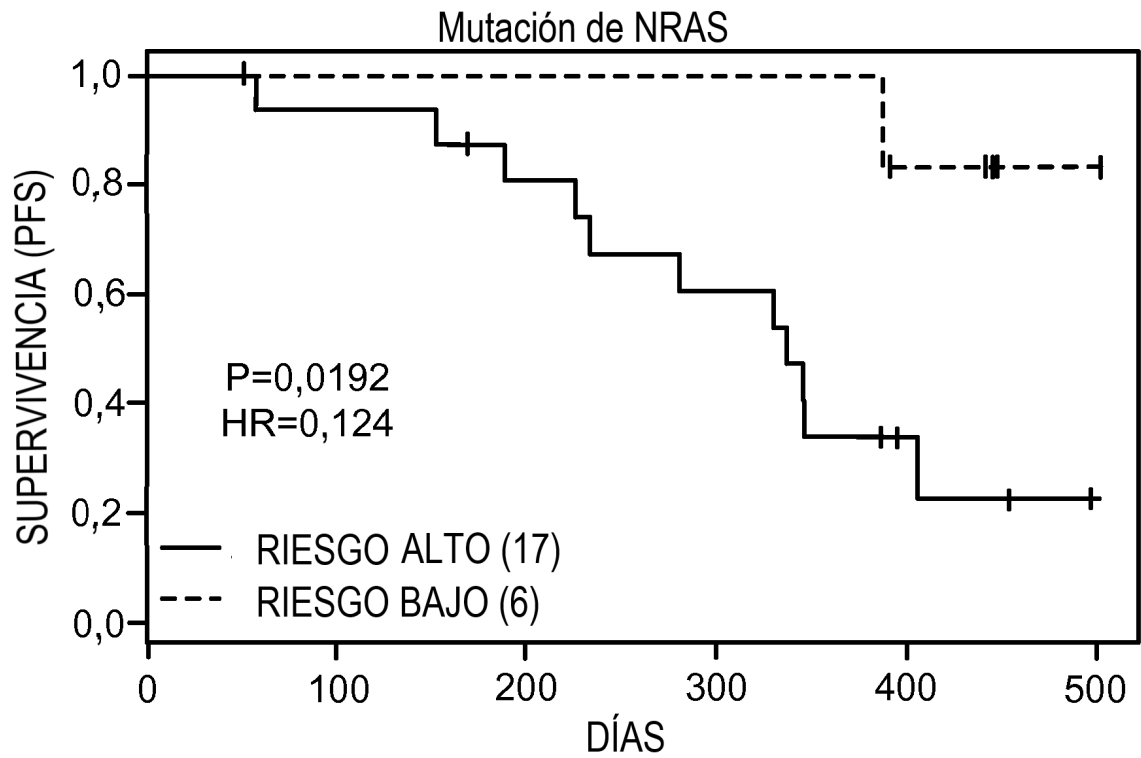
grupos de riesgo alto y bajo. Los criterios de predicción de paciente de PFS más larga se definen como un valor de riesgo calculado mediante la función de riesgo que es menor que el umbral.

Otras realizaciones

- 5 Aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

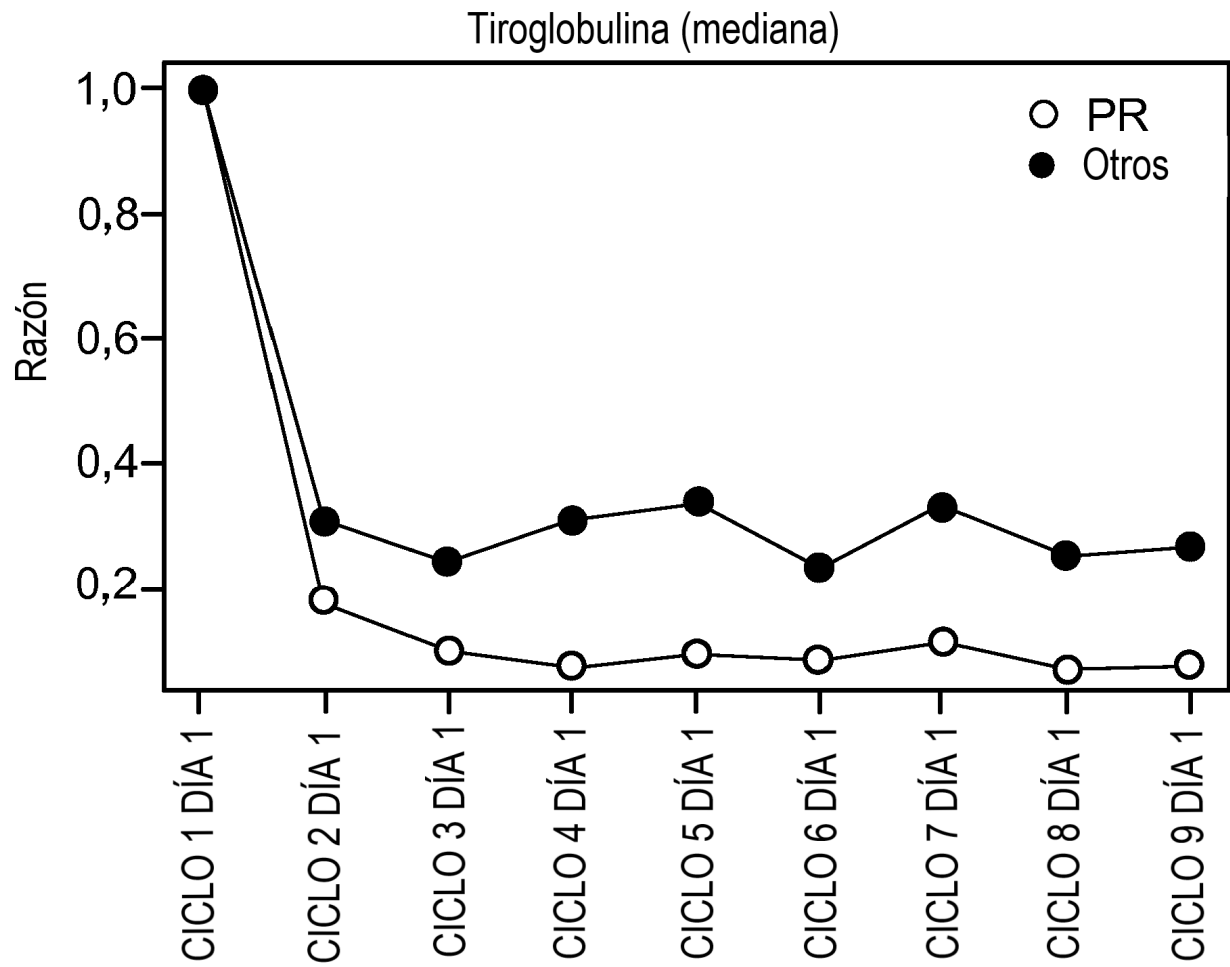
REIVINDICACIONES

- 1.- Un método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método:
5 proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto tras la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
10 medir la concentración de proteína ANGPT2 en la muestra biológica,
siendo una concentración reducida, en comparación con un control, de ANGPT2 predictiva de que el sujeto responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 2.- Un método de predicción de la respuesta de un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, comprendiendo el método:
20 proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto antes de la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y
medir la concentración de proteína ANGPT2 en la muestra biológica,
siendo una concentración reducida, en comparación con un control, de ANGPT2 predictiva de que el sujeto
25 responderá a la terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 3.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el cáncer de tiroides un cáncer de tiroides diferenciado.
- 30 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el cáncer de tiroides diferenciado un cáncer de tiroides folicular, o un cáncer de tiroides papilar.
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el cáncer de riñón un carcinoma de células renales.
- 35 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el lenvatinib o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo mesilato de lenvatinib.
- 7.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, siendo el sujeto un ser humano.
- 40 8.- Lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en un método para tratar un sujeto que tiene, del que se sospecha que tiene o que corre el riesgo de desarrollar, un cáncer de tiroides o un cáncer de riñón, habiéndose predicho que el sujeto responderá a una terapia que comprende lenvatinib o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo mediante el método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 45



Mutación génica y supervivencia libre de progresión

FIG. 1



Cambio en el nivel de tiroglobulina tras el tratamiento con E7080

FIG. 2