

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2008.11.26	(73) Titular(es): GENENTECH, INC.	
(30) Prioridade(s): 2007.11.30 US 991616 P 2008.03.21 US 38699 P	1 DNA WAY SOUTH SAN FRANCISCO	US
(43) Data de publicação do pedido: 2010.08.25	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2011.08.31 239/2011	BRYAN P. SCHNEIDER	US
	MILAN RADOVICH	US
	GEORGE W. SLEDGE	US
	(74) Mandatário:	
	ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA	
	RUA DAS FLORES, N° 74, 4º AND 1249-235 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **POLIMORFISMOS DE VEGF E TERAPIA ANTI-ANGIOGÉNESE**

(57) Resumo:

MÉTODOS PARA DETERMINAR SE UM PACIENTE COM UM RISCO PARTICULAR DE HIPERTENSÃO ASSOCIADA A TRATAMENTO ANTI-VEGF TEM OU NÃO UMA MAIOR PROBABILIDADE DE BENEFICIAR DE TERAPIA ANTI-VEGF POR RASTREIO DE UMA AMOSTRA ISOLADA A PARTIR DO PACIENTE EM RELAÇÃO A POLIMORFISMOS GENÓMICOS ESPECÍFICOS.

RESUMO

"Polimorfismos de VEGF e terapia anti-angiogénese"

Métodos para determinar se um paciente com um risco particular de hipertensão associada a tratamento anti-VEGF tem ou não uma maior probabilidade de beneficiar de terapia anti-VEGF por rastreio de uma amostra isolada a partir do paciente em relação a polimorfismos genómicos específicos.

DESCRIÇÃO

"Polimorfismos de VEGF e terapia anti-angiogénese"

CAMPO DO INVENTO

Este invento refere-se em geral ao tratamento de doenças e perturbações humanas associadas a terapia anti-angiogénese. Mais especificamente, o invento refere-se a terapia anti-angiogénese do cancro, quer sozinha quer em combinação com outras terapias anticancro.

ANTECEDENTES DO INVENTO

O cancro continua a ser uma das ameaças mais mortais para a saúde humana, afectando mais de 1 milhão de novos pacientes todos os anos nos Estados Unidos da América. Os tumores sólidos são responsáveis pela maior parte dessas mortes. Ainda que tenham existido avanços significativos no tratamento médico de certos cancros, os métodos actuais de tratamento são relativamente não selectivos: a cirurgia remove o tecido doente; a radioterapia reduz os tumores sólidos; e a quimioterapia mata rapidamente as células em divisão. Estes tratamentos podem resultar em numerosos efeitos colaterais, em alguns casos tão graves que limitam a dosagem que pode ser dada e assim impedem a utilização de fármacos potencialmente eficazes.

A angiogénese é um evento celular importante no qual as células endoteliais vasculares proliferam, são aparadas e se reorganizam para formar novos vasos a partir de redes vasculares pré-existentes. A angiogénese é essencial para o crescimento da maioria dos tumores primários e sua metástase subsequente. O factor de crescimento celular endotelial vascular (VEGF), que é também denominado VEGF-A ou factor permeabilidade vascular (VPF), tem sido noticiado como um regulador fulcral da angiogénese tanto normal como anormal. Ferrara e Davis-Smyth (1997) *Endocrine Rev.* 18:4-25; Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543.

O anticorpo anti-VEGF "Bevacizumab", também conhecido como "BV", "rhuMAB VEGF" ou "Avastin[®]", é um anticorpo

monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante gerado de acordo com Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599, que está actualmente aprovado nos E.U.A. para o tratamento de cancro colo-rectal metastático, cancro do pulmão de células não pequenas e cancro da mama metastático. Tal como outros tratamentos do cancro, a terapia de Avastin® está associada a certos efeitos colaterais, incluindo um risco acrescido de hipertensão.

Ocorrem polimorfismos genéticos numa população quando alelos diferentes em genes particulares resultam em fenótipos diferentes. Estes polimorfismos podem desempenhar um papel na determinação da eficácia e da segurança de fármacos terapêuticos. Por exemplo, foi mostrado que polimorfismos específicos no VEGF estão associados à incidência do cancro da mama. Schneider *et al.* (2008) *Breast Cancer Research and Treatment* 111:157-63.

Kim, J. K. (2003) *Korean Journal of Biological Sciences* 7(3):261-264 investiga a distribuição de frequências do polimorfismo C936T na região não traduzida 3' do gene de VEGF, que está associado a níveis de expressão de VEGF no plasma.

Zhu, X. *et al.* (2007) *Current Hypertension Reviews* 3(2):149-155 revelam que a hipertensão tem emergido como um dos efeitos adversos mais importantes da terapia anti-VEGF. Os mecanismos subjacentes à hipertensão associada a anti-VEGF não são compreendidos. Têm sido propostos vários mecanismos potenciais incluindo rarefacção vascular, disfunção endotelial, metabolismo de óxido nítrico alterado e neurormonas aberrantes.

A WO 2006/086544 e a WO 2007/022101 revelam também uma conexão entre a administração de um antagonista de factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a hipertensão.

A identificação de polimorfismos adicionais preditivos da eficácia ou segurança de terapias particulares pode ser utilizada para melhor configurar terapias para aqueles pacientes que melhor beneficiariam delas.

SUMÁRIO DO INVENTO

O presente invento é baseado em parte na identificação de polimorfismos em VEGF que são preditivos de um risco acrescido de hipertensão em pacientes que estão a ser submetidos a terapia anti-VEGF, incluindo com Avastin®.

Num aspecto, o invento proporciona um método de prever se um paciente está ou não em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF, compreendendo rastrear uma amostra isolada a partir do paciente em relação a um polimorfismo genómico seleccionado entre VEGF (-1498C/T) e VEGF (-634G/C), onde o paciente está em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF se o genótipo correspondente compreende VEGF (-1498C) ou VEGF (-634G). Em algumas concretizações, o antagonista de VEGF é um anticorpo anti-VEGF, e.g. bevacizumab.

Em algumas concretizações, o paciente está a ser tratado em relação a um cancro, e.g. cancro da mama. Em algumas concretizações, o paciente está adicionalmente a ser tratado com uma composição antineoplásica.

É também revelado um *kit* para prever se um paciente está ou não em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF compreendendo um primeiro oligonucleótido e um segundo oligonucleótido específicos para um polimorfismo em VEGF seleccionado entre o grupo consistindo de: VEGF (-1498C/T) e VEGF (-634G/C). Em algumas concretizações, os oligonucleótidos no *kit* são úteis para amplificação da região de VEGF compreendendo um destes polimorfismos.

É também revelado um método para prever se um paciente tem ou não uma probabilidade acrescida de beneficiar de tratamento com um antagonista de VEGF, compreendendo rastrear uma amostra isolada a partir do paciente em relação a um polimorfismo genómico em VEGF (-2578C/A) ou VEGF (-1154G/A), onde o paciente tem uma probabilidade acrescida de beneficiar de tratamento com um antagonista de VEGF se o genótipo correspondente compreende VEGF (-2578AA) ou VEGF (1154AA). Em

algumas concretizações, o antagonista de VEGF é um anticorpo anti-VEGF, e.g. bevacizumab. Em algumas concretizações, o tratamento compreende adicionalmente a administração de uma composição antineoplásica. Em algumas concretizações, o paciente está a ser tratado em relação a um cancro, e.g. cancro da mama.

É também revelado um *kit* para prever se um paciente tem ou não uma probabilidade acrescida de beneficiar de tratamento com um antagonista de VEGF compreendendo um primeiro oligonucleótido e um segundo oligonucleótido específicos para um polimorfismo em VEGF seleccionado entre o grupo consistindo de: VEGF (-2578C/A) e VEGF (-1154G/A). Em algumas concretizações, os oligonucleótidos no *kit* são úteis para amplificação da região de VEGF compreendendo um destes polimorfismos.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PREFERIDAS

A prática do presente invento utilizará, a não ser que indicado de outro modo, técnicas convencionais de biologia molecular (incluindo técnicas recombinantes), microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia, que estão dentro das competências da especialidade. Estas técnicas estão explicadas detalhadamente na literatura, tal como em "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edição (Sambrook *et al.*, 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987, e actualizações periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994).

A não ser que definidos de outro modo, os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado habitualmente entendido por um técnico competente na especialidade ao qual este invento pertence. Singleton *et al.*, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2.^a ed., J. Wiley & Sons (New York, N.Y. 1994), e March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4.^a ed., John Wiley & Sons (New York, N.Y. 1992), proporcionam a

um técnico competente na especialidade um guia geral para muitos dos termos utilizados no presente pedido de patente.

DEFINIÇÕES

Como aqui utilizadas, as formas singulares "um", "uma", "o" e "a" incluem os plurais a não ser que o contexto dite claramente o contrário. Por exemplo, "uma" célula incluirá também "células".

O termo "compreendendo" pretende significar que as composições e métodos incluem os elementos enunciados, mas não excluem outros.

Os termos "VEGF" e "VEGF-A" são utilizados intermutavelmente para referir o factor de crescimento celular endotelial vascular de 165 aminoácidos e factores de crescimento celular endotelial vascular relacionados de 121, 189 e 206 aminoácidos, como descrito por Leung *et al. Science*, 246:1306 (1989), e Houck *et al. Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991), em conjunto com as suas formas alélicas de ocorrência natural e processadas. O termo "VEGF" é também utilizado para referir formas truncadas do polipéptido compreendendo os aminoácidos 8 a 109 ou 1 a 109 do factor de crescimento celular endotelial vascular humano de 165 aminoácidos. A referência a qualquer destas formas de VEGF pode ser identificada no presente pedido de patente, e.g., por "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" ou "VEGF₁₆₅." As posições de aminoácido para um VEGF nativo "truncado" são numeradas como indicado na sequência de VEGF nativo. Por exemplo, o aminoácido na posição 17 (metionina) no VEGF nativo truncado está também na posição 17 (metionina) no VEGF nativo. O VEGF nativo truncado tem afinidade de ligação pelos receptores KDR e Flt-1 comparável à do VEGF nativo.

Um "anticorpo anti-VEGF" é um anticorpo que se liga a VEGF com afinidade e especificidade suficientes. Preferivelmente, o anticorpo anti-VEGF do invento pode ser utilizado como um agente terapêutico para atingir e interferir com doenças ou condições onde a actividade de VEGF está envolvida. Um anticorpo anti-VEGF não se ligará usualmente a outros homólogos de VEGF tais como VEGF-B ou

VEGF-C, ou a outros factores de crescimento tais como PlGF, PDGF ou bFGF. Um anticorpo anti-VEGF preferido é um anticorpo monoclonal que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo monoclonal anti-VEGF A4.6.1 produzido pelo hibridoma ATCC HB 10709. Mais preferivelmente, o anticorpo anti-VEGF é um anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado recombinante gerado de acordo com Presta *et al.* (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599, incluindo mas não limitado ao anticorpo conhecido como bevacizumab (BV; Avastin®).

Um "antagonista de VEGF" refere-se a uma molécula capaz de neutralizar, bloquear, inibir, anular, reduzir ou interferir com actividades de VEGF incluindo a sua ligação a um ou mais receptores de VEGF. Antagonistas de VEGF incluem anticorpos anti-VEGF e seus fragmentos de ligação a antígeno, moléculas de receptor e derivados que se ligam especificamente a VEGF sequestrando desse modo a sua ligação a um ou mais receptores, anticorpos de receptor anti-VEGF e antagonistas de receptor de VEGF tais como inibidores de moléculas pequenas das tirosina-quinases de VEGFR.

O termo "anticorpo" é utilizado no seu sentido mais amplo e inclui anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais a todo o comprimento ou intactos), anticorpos policlonais, anticorpos multivalentes, anticorpos multiespecíficos (e.g., anticorpos biespecíficos), e fragmentos de anticorpo desde que estes exibam a actividade biológica desejada.

O termo "anticorpo monoclonal" como aqui utilizado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, i.e., os anticorpos individuais que constituem a população são idênticos excepto no que se refere a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas quantidades. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único antígeno. Adicionalmente, em contraste com preparações de anticorpos policlonais que incluem tipicamente diferentes anticorpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" não deve ser entendido

como requerendo a produção do anticorpo por qualquer método particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais para utilização de acordo com o presente invento podem ser preparados pelo método de hibridoma primeiro descrito por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975), ou podem ser preparados por métodos de ADN recombinante (ver, e.g., Patente dos E.U.A. N.º 4816567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados a partir de bibliotecas de anticorpos de fago utilizando as técnicas descritas em Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) ou Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), por exemplo.

Uma "perturbação" é qualquer condição que beneficiará de tratamento com o anticorpo. Isto inclui perturbações ou doenças crónicas e agudas incluindo aquelas condições patológicas que predispõem o mamífero para a perturbação em questão. Exemplos não limitantes de perturbações a serem aqui tratadas incluem tumores benignos e malignos; leucemias e malignidades linfóides; perturbações neuronais, gliais, astrocitais, hipotalâmicas e outras perturbações glandulares, macrofágicas, epiteliais, estromais e blastoceliais; e perturbações inflamatórias, angiogénicas e imunológicas.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade de um fármaco eficaz para tratar uma doença ou perturbação num mamífero. No caso de cancro, a quantidade terapeuticamente eficaz do fármaco pode reduzir o número de células de cancro; reduzir o tamanho do tumor; inibir (i.e., retardar em alguma extensão e preferivelmente parar) a infiltração de células de cancro nos órgãos periféricos; inibir (i.e., retardar em alguma extensão e preferivelmente parar) metástases do tumor; inibir, em alguma extensão, o crescimento do tumor; e/ou aliviar em alguma extensão um ou mais dos sintomas associados à perturbação. Na medida em que o fármaco possa prevenir o crescimento e/ou matar células de cancro existentes, este pode ser citostático e/ou citotóxico. Para terapia do cancro, a eficácia *in vivo* pode ser medida, por exemplo, por avaliação da sobrevivência global (OS, *overall survival*), sobrevivência sem progressão (PFS, *progression free survival*), tempo para progressão da doença (TTP, *time to disease progression*), as taxas de resposta (RR, *response rates*), duração da resposta, e/ou qualidade de vida.

"Tratamento" refere-se não só a tratamento terapêutico mas também a medidas profiláticas ou preventivas. Os necessitados de tratamento incluem aqueles já com a perturbação bem como aqueles em que se pretende prevenir a perturbação.

Os termos "cancro" e "canceroso" referem-se a ou descrevem a condição fisiológica em mamíferos que é tipicamente caracterizada por crescimento celular desregulado. Exemplos de cancro incluem mas não estão limitados a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia. Exemplos mais particulares destes cancros incluem cancro de células escamosas, cancro do pulmão (incluindo cancro do pulmão de células pequenas, cancro do pulmão de células não pequenas, adenocarcinoma do pulmão, e carcinoma escamoso do pulmão), cancro do peritoneu, cancro hepatocelular, cancro gástrico ou do estômago (incluindo cancro gastrointestinal), cancro pancreático, glioblastoma, cancro cervical, cancro do ovário, cancro do fígado, cancro da bexiga, hepatoma, cancro da mama, cancro do cólon, cancro colo-rectal, carcinoma endometrial ou uterino, carcinoma da glândula salivar, cancro do rim ou renal, cancro do fígado, cancro da próstata, cancro vulvar, cancro da tiróide, carcinoma hepático e vários tipos de cancro da cabeça e pescoço, bem como linfoma de células B (incluindo linfoma não Hodgkin (NHL) de grau baixo/folicular; NHL linfocítico pequeno (SL); NHL de grau intermédio/folicular; NHL de grau difuso intermédio; NHL imunoblástico de grau elevado; NHL linfoblástico de grau elevado; NHL de pequenas células não clivadas de grau elevado; NHL de doença volumosa; linfoma de células do manto; linfoma relacionado com a SIDA; e macroglobulinemia de Waldenstrom); leucemia linfocítica crónica (CLL); leucemia linfoblástica aguda (ALL); leucemia de células pilosas; leucemia mieloblástica crónica; e perturbação linfoproliferativa pós-transplante (PTLD), bem como proliferação vascular anormal associada a facomatoses, edema (tal como o associado a tumores cerebrais), e síndrome de Meigs.

O termo "composição antineoplásica" refere-se a uma composição útil no tratamento do cancro compreendendo pelo menos um agente terapêutico activo capaz de inibir ou

prevenir o crescimento ou função do tumor, e/ou causar a destruição de células de tumor. Agentes terapêuticos adequados numa composição antineoplásica para tratamento do cancro incluem, mas não estão limitados a, agentes quimioterapêuticos, isótopos radioactivos, toxinas, citocinas tais como interferões, e agentes antagonistas dirigidos a citocinas, receptores de citocina ou antigénios associados a células de tumor. Preferivelmente, o agente terapêutico é um agente quimioterapêutico.

Um "agente quimioterapêutico" é um composto químico útil no tratamento do cancro.

Uma molécula de ácido nucleico "isolada" é uma molécula de ácido nucleico que está identificada e separada de pelo menos uma molécula de ácido nucleico contaminante com a qual está habitualmente associada na fonte natural do ácido nucleico de polipéptido. Uma molécula de ácido nucleico isolada está numa outra forma ou configuração que não a encontrada na natureza. Deste modo, moléculas de ácido nucleico isoladas distinguem-se da molécula de ácido nucleico tal como esta existe em células naturais. No entanto, uma molécula de ácido nucleico isolada inclui uma molécula de ácido nucleico contida em células que habitualmente expressam o polipéptido onde, por exemplo, a molécula de ácido nucleico está numa localização cromossómica diferente da das células naturais.

O termo "polimorfismo" refere-se a uma localização na sequência de um gene que varia dentro de uma população. Um polimorfismo consiste de diferentes "alelos". A localização de um tal polimorfismo é identificada pela sua posição no gene e pelas bases diferentes que aí são encontradas. Por exemplo, VEGF-1498C/T indica que existe uma variação entre C e T na posição -1498 no gene de VEGF. As duas variantes possíveis, C e T, são dois alelos diferentes. Porque o genótipo é constituído de dois alelos separados, pode-se observar num dado indivíduo qualquer uma de várias variantes possíveis (e.g. para este exemplo, CC, CT ou TT).

O termo "genótipo" refere-se aos alelos específicos de um certo gene numa amostra de células ou tecido. No exemplo

anterior, CC, CT ou TT são genótipos possíveis no polimorfismo VEGF-1498C/T.

O termo "amostra" inclui uma amostra de células ou tecido colhida de um paciente. Por exemplo, uma amostra pode incluir uma amostra de tumor, uma amostra de tecido normal correspondendo ao tipo de tumor, uma amostra de tecido colhida da área circundante do tumor, ou células de sangue.

A identificação do genótipo particular numa amostra pode ser realizada por qualquer de vários métodos bem conhecidos de um perito na especialidade. Por exemplo, a identificação do polimorfismo pode ser levada a cabo por clonagem do alelo e sequenciação do mesmo utilizando técnicas bem conhecidas na especialidade. Alternativamente, as sequências génicas podem ser amplificadas a partir de ADN genómico, e.g. utilizando PCR, e o produto sequenciado. São a seguir descritos vários métodos não limitantes para análise do ADN de um paciente quanto a mutações num dado *locus* genético.

Pode-se utilizar tecnologia de microarranjo de ADN, e.g., dispositivos de *chip* de ADN e microarranjos de alta densidade para aplicações de rastreio de elevada capacidade e microarranjos de densidade mais baixa. São conhecidos na especialidade métodos para fabricação de microarranjos e incluem várias tecnologias e processos de deposição ou impressão a jacto de tinta e microjacto, processos de síntese de oligonucleótidos fotolitográficos *in situ* ou sobre o *chip*, e processos electrónicos de endereçamento de sondas de ADN. As aplicações de hibridização de microarranjo de ADN têm sido aplicadas com sucesso nas áreas de análise da expressão génica e de genotipagem em relação a mutações pontuais, polimorfismos de nucleótidos simples (SNP) e repetições em tandem curtas (STR). Métodos adicionais incluem microarranjos de ARN de interferência e combinações de microarranjos e outros métodos tais como microdissecção de captura por laser (LCM), hibridização genómica comparativa (CGH) e imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Ver, e.g., He *et al.* (2007) *Adv. Exp. Med. Biol.* 593:117-133 e Heller (2002) *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 4:129-153. Outros métodos incluem PCR, xMAP, ensaio de invasor, espectrometria de massa e pirosequenciação (Wang *et al.* (2007) 593:105-106).

Outro método de detecção é a hibridização específica de alelo utilizando sondas sobrepostas com o local polimórfico e possuindo cerca de 5, ou alternativamente 10, ou alternativamente 20, ou alternativamente 25, ou alternativamente 30 nucleótidos à volta da região polimórfica. Por exemplo, várias sondas capazes de se hibridizarem especificamente com a variante alélica estão ligadas a um suporte de fase sólida, *e.g.*, um "*chip*". Podem-se ligar oligonucleótidos a um suporte sólido por uma variedade de processos, incluindo litografia. A análise de detecção de mutação utilizando estes *chips* compreendendo oligonucleótidos, também denominados "arranjos de sonda de ADN" está descrita *e.g.*, em Cronin *et al.* (1996) *Human Mutation* 7:244.

Noutros métodos de detecção, é necessário amplificar primeiro pelo menos uma porção do gene antes de identificar a variante alélica. A amplificação pode ser realizada, *e.g.*, por PCR e/ou LCR ou outros métodos bem conhecidos na especialidade.

Nalguns casos, a presença do alelo específico em ADN de um sujeito pode ser mostrada por análise com enzimas de restrição. Por exemplo, o polimorfismo de nucleótidos específicos pode resultar numa sequência de nucleótidos compreendendo um local de restrição que está ausente da sequência de nucleótidos de outra variante alélica.

Numa concretização adicional, a protecção contra agentes de clivagem (tais como uma nuclease, hidroxilamina ou tetróxido de ósmio e com piperidina) pode ser utilizada para detectar bases desemparelhadas em heteroduplexes de ARN/ARN ADN/ADN ou ARN/ADN (ver, *e.g.*, Myers *et al.* (1985) *Science* 230:1242). Em geral, a técnica de "clivagem no desemparelhamento" inicia-se proporcionando heteroduplexes formados por hibridização de um ácido nucleico de controlo, que está opcionalmente marcado, *e.g.*, ARN ou ADN, compreendendo uma sequência de nucleótidos da variante alélica do gene, com uma amostra de ácido nucleico, *e.g.*, ARN ou ADN, obtida a partir de uma amostra de tecido. Os duplexes de cadeia dupla são tratados com um agente que cliva as regiões de cadeia simples do duplex tais como duplexes

formados com base em desemparelhamentos de pares de bases entre as cadeias de controlo e de amostra. Por exemplo, duplexes de ARN/ADN podem ser tratados com RNase e híbridos de ADN/ADN tratados com nuclease S1 para enzimaticamente digerir regiões desemparelhadas. Alternativamente, qualquer dos duplexes ADN/ADN or ARN/ADN pode ser tratado com hidroxilamina ou tetróxido de ósmio e com piperidina de modo a digerir as regiões desemparelhadas. Após digestão das regiões desemparelhadas, o material resultante é então separado por tamanhos sobre géis de poliacrilamida desnaturantes para determinar se os ácidos nucleicos de controlo e de amostra têm uma sequência de nucleótidos idêntica ou em que nucleótidos são diferentes. Ver, por exemplo, Patente dos E.U.A. N.º 6455249, Cotton *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397; Saleeba *et al.* (1992) *Meth. Enzymol.* 217:286-295.

Podem-se também utilizar alterações na mobilidade electroforética para identificar a variante alélica particular. Por exemplo, pode-se utilizar polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP) para detectar diferenças em mobilidade electroforética entre ácidos nucleicos mutantes e ácidos nucleicos do tipo selvagem (Orita *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:2766; Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285:125-144 e Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9:73-79). Desnaturam-se fragmentos de ADN de cadeia simples de ácidos nucleicos de amostra e de controlo e deixam-se renaturar. A estrutura secundária de ácidos nucleicos de cadeia simples varia de acordo com a sequência, e a alteração resultante em mobilidade electroforética possibilita a detecção mesmo de uma única alteração de base. Os fragmentos de ADN podem ser marcados ou detectados com sondas marcadas. A sensibilidade do ensaio pode ser melhorada utilizando ARN (em vez de ADN), cuja estrutura secundária é mais sensível a uma alteração em sequência. Noutra concretização preferida, o presente método utiliza análise de heteroduplex para separar moléculas de heteroduplex de cadeia dupla com base em alterações na mobilidade electroforética (Keen *et al.* (1991) *Trends Genet.* 7:5).

A identidade da variante alélica pode também ser obtida por análise do movimento de um ácido nucleico compreendendo a

região polimórfica em géis de poliacrilamida contendo um gradiente de desnaturante, que é ensaiado utilizando electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) (Myers *et al.* (1985) *Nature* 313:495). Quando se utiliza DGGE como o método de análise, o ADN será modificado para assegurar que este não se desnatura completamente, por exemplo por adição de um grampo de GC de aproximadamente 40 pb de ADN rico em GC de alto ponto de fusão por PCR. Numa concretização adicional, utiliza-se um gradiente de temperatura em vez de um gradiente de agente desnaturante para identificar diferenças na mobilidade de ADN de controlo e de amostra (Rosenbaum e Reissner (1987) *Biophys. Chem.* 265:1275).

Exemplos de técnicas para detectar diferenças de pelo menos um nucleótido entre 2 ácidos nucleicos incluem, mas não estão limitadas a, hibridização selectiva de oligonucleótidos, amplificação selectiva ou extensão selectiva de iniciadores. Por exemplo, podem-se preparar sondas de oligonucleótido nas quais o nucleótido polimórfico conhecido é colocado centralmente (sondas específicas de alelo) e depois hibridizado para atingir ADN sob condições que permitem a hibridização apenas se for encontrado um emparelhamento perfeito (Saiki *et al.* (1986) *Nature* 324:163; Saiki *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6230). Estas técnicas de hibridização de oligonucleótidos específicas de alelos podem ser utilizadas para a detecção das alterações de nucleótidos na região polimórfica do gene. Por exemplo, oligonucleótidos possuindo a sequência de nucleótidos da variante alélica específica são ligados a uma membrana de hibridização e esta membrana é depois hibridizada com ácido nucleico de amostra marcado. A análise do sinal de hibridização revelará então a identidade dos nucleótidos do ácido nucleico de amostra.

Alternativamente, pode-se utilizar tecnologia de amplificação específica de alelo que depende da amplificação selectiva por PCR em conjunto com o presente invento. Oligonucleótidos utilizados como iniciadores para amplificação específica podem transportar a variante alélica de interesse no centro da molécula (pelo que a amplificação depende de hibridização diferencial) (Gibbs *et al.* (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2437-2448) ou na extremidade do terminal

3' de um iniciador onde, sob condições apropriadas, o desemparelhamento pode prevenir, ou reduzir a extensão de polimerase (Prossner (1993) *Tibtech* 11:238 e Newton et al. (1989) *Nucl. Acids Res.* 17:2503). Esta técnica é denominada "PROBE" de *Probe Oligo Base Extension*. Adicionalmente, pode ser desejável introduzir um novo local de restrição na região da mutação para permitir a detecção com base na clivagem (Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6:1).

Noutra concretização, a identificação da variante alélica é realizada utilizando um ensaio de ligação de oligonucleótido (OLA), como descrito, e.g., na Patente dos E.U.A. N.º 4998617 e em Laridegren, U. et al. *Science* 241:1077-1080 (1988). O protocolo OLA utiliza dois oligonucleótidos que estão desenhados para serem capazes de se hibridizar com sequências limítrofes de uma cadeia simples de um alvo. Um dos oligonucleótidos está ligado a um marcador de separação, e.g., biotinilado, e o outro está marcado detectavelmente. Se a sequência complementar exacta é encontrada numa molécula alvo, os oligonucleótidos hibridizar-se-ão tal que os seus terminais se juntam, e criam um substrato de ligação. A ligação permite então que o oligonucleótido marcado seja recuperado utilizando avidina, ou outro ligando de biotina. Nickerson, D. A. et al. descreveram um ensaio de detecção de ácido nucleico que combina atributos de PCR e OLA (Nickerson, D. A. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8923-8927). Neste método, utiliza-se PCR para conseguir a amplificação exponencial de ADN alvo, que é depois detectado utilizando OLA.

O invento proporciona métodos para detecção de um polimorfismo de um único nucleótido (SNP) em VEGF. Porque os polimorfismos de um único nucleótido são flanqueados por regiões de sequência invariante, a sua análise requer apenas a determinação da identidade do único nucleótido variante e não é necessário determinar uma sequência génica completa para cada paciente. Têm sido desenvolvidos vários métodos para facilitar a análise de SNP.

O polimorfismo de uma única base pode ser detectado utilizando um nucleótido especializado resistente a

exonuclease, como revelado, e.g., na Patente dos E.U.A. 4656127. De acordo com o método, permite-se que um iniciador complementar com a sequência alélica imediatamente 3' em relação ao local polimórfico se hibridize com uma molécula alvo obtida a partir de um animal ou humano particular. Se o local polimórfico na molécula alvo contém um nucleótido que é complementar do derivado de nucleótido resistente a exonuclease particular presente, então esse derivado será incorporado na extremidade do iniciador hibridizado. Esta incorporação torna o iniciador resistente a exonuclease, e desse modo permite a sua detecção. Uma vez que a identidade do derivado resistente a exonuclease da amostra é conhecida, a constatação de que o iniciador se tornou resistente a exonucleases revela que o nucleótido presente no local polimórfico da molécula alvo era complementar em relação ao do derivado de nucleótido utilizado na reacção. Este método tem a vantagem de não requerer a determinação de grandes quantidades de dados de sequências estranhas.

Pode-se também utilizar um método baseado em solução para determinar a identidade do nucleótido do local polimórfico (WO 91/02087). Como anteriormente, utiliza-se um iniciador que é complementar de sequências alélicas imediatamente 3' em relação a um local polimórfico. O método determina a identidade do nucleótido desse local utilizando derivados de didesoxinucleótido marcados que, se complementares com o nucleótido do local polimórfico, ficarão incorporados na extremidade do iniciador.

Um método alternativo é descrito na WO 92/15712. Este método utiliza misturas de terminadores marcados e um iniciador que é complementar da sequência 3' em relação a um local polimórfico. O terminador marcado que é incorporado é assim complementar e é determinado pelo nucleótido presente no local polimórfico da molécula alvo que está a ser avaliada. O método é usualmente um ensaio de fase heterogénea, no qual o iniciador ou a molécula alvo estão imobilizados sobre uma fase sólida.

Têm sido descritos muitos outros procedimentos de incorporação de nucleótidos guiada por iniciador para ensaiar locais polimórficos em ADN (Komher, J. S. et al. (1989) *Nucl.*

Acids. Res. 17:7779-7784; Sokolov, B. P. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18:3671; Syvanen, A.-C., et al. (1990) *Genomics* 8:684-692; Kuppuswamy, M. N. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1143-1147; Prezant, T. R. et al. (1992) *Hum. Mutat.* 1:159-164; Ugozzoli, L. et al. (1992) *GATA* 9:107-112; Nyren, P. et al. (1993) *Anal. Biochem.* 208:171-175). Estes métodos baseiam-se todos na incorporação de desoxinucleótidos marcados para distinguir entre bases num local polimórfico.

Além disso, será entendido que qualquer dos métodos acima para detectar alterações num gene ou produto de gene ou variantes polimórficos pode ser utilizado para monitorizar o curso do tratamento ou terapia.

Os métodos aqui descritos podem ser realizados, por exemplo, utilizando kits de diagnóstico pré-embalados, tais como os descritos abaixo, compreendendo pelo menos uma sonda ou iniciador de ácido nucleico, que pode ser convenientemente utilizado, e.g., para determinar se um sujeito está ou não em risco de desenvolver hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF.

Ácido nucleico de amostra para utilização nos métodos de diagnóstico e prognóstico acima descritos pode ser obtido a partir de qualquer tipo de célula ou tecido de um sujeito. Por exemplo, um fluido corporal de um sujeito (e.g. sangue) pode ser obtido por técnicas conhecidas. Alternativamente, podem-se realizar testes de ácido nucleico em amostras secas (e.g., cabelo ou pele).

O invento aqui descrito refere-se a métodos para determinar e identificar o alelo presente no *locus* de VEGF. Esta informação é útil para prever o nível de risco de desenvolvimento de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF. Podem-se utilizar sondas para determinar o genótipo da amostra directamente ou simultaneamente ou subsequentemente à amplificação. O termo "sondas" inclui ácidos nucleicos de cadeia simples ou de cadeia dupla de ocorrência natural ou recombinantes ou ácidos nucleicos sintetizados quimicamente. Estes podem ser marcados por *nick translation*, reacção de preenchimento Klenow, PCR ou outros métodos conhecidos na especialidade. Em Sambrook et al.

(1989) *supra* descrevem-se sondas, a sua preparação e/ou marcação. Uma sonda pode ser um polinucleótido de qualquer comprimento adequado para hibridização selectiva com um ácido nucleico contendo uma região polimórfica do invento. O comprimento da sonda utilizada dependerá, em parte, da natureza do ensaio utilizado e das condições de hibridização utilizadas.

Podem também ser utilizadas sondas marcadas em conjunto com amplificação de um polimorfismo. (Holland *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7280). A Patente dos E.U.A. N.º 5210015 descreve abordagens baseadas em fluorescência para proporcionar medições em tempo real de produtos de amplificação durante a PCR. Estas abordagens têm sido utilizadas ou intercalando pigmentos (tais como brometo de etídio) para indicar a quantidade de ADN de cadeia dupla presente, ou têm utilizadas sondas contendo pares de fluorescência-extintor (também denominada como a abordagem "Taq-Man") onde a sonda é clivada durante a amplificação para libertar uma molécula fluorescente cuja concentração é proporcional à quantidade de ADN de cadeia dupla presente. Durante a amplificação, a sonda é digerida pela actividade de nuclease de uma polimerase quando hibridizada com a sequência alvo para fazer com que a molécula fluorescente seja separada da molécula de extintor, causando por isso o aparecimento de fluorescência a partir da molécula repórter. A abordagem Taq-Man utiliza uma sonda contendo um par de molécula repórter-molécula extintora que especificamente se hibridiza com uma região de um polinucleótido alvo contendo o polimorfismo.

As sondas podem ser afixadas à superfície para utilização como "*chips* de genes". Estes *chips* de genes podem ser utilizados para detectar variações genéticas por várias técnicas conhecidas de um perito na especialidade. Numa técnica, oligonucleótidos são dispostos em arranjo sobre um *chip* de gene para determinação da sequência de ADN por sequenciação pela abordagem de hibridização, tal como descrito nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 6025136 e 6018041. As sondas podem também ser utilizadas para detecção fluorescente de uma sequência genética. Estas técnicas foram descritas, por exemplo, nas Patentes dos E.U.A. N.ºs 5968740 e 5858659. Uma sonda pode também ser afixada a uma superfície de

eléctrodo para a detecção electroquímica de sequências de ácido nucleico tal como descrito na Patente dos E.U.A. N.º 5952172 e por Kelley, S. O. et al. (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:4830-4837.

Adicionalmente, os ácidos nucleicos isolados utilizados como sondas ou iniciadores podem ser modificados para ficarem mais estáveis. Exemplos de moléculas de ácido nucleico que são modificadas incluem análogos de ADN de fosforamidato, fosfotioato e metilfosfonato (ver também Patentes dos E.U.A. N.ºs 5176996, 5264564 e 5256775).

Como aqui descrito, o invento proporciona métodos de diagnóstico para determinar o tipo de variante alélica de uma região polimórfica presente em VEGF. Em algumas concretizações, os métodos utilizam sondas ou iniciadores compreendendo sequências de nucleótidos que são complementares da região polimórfica de VEGF. Por conseguinte, são também revelados *kits* para realização destes métodos.

Em algumas concretizações, são revelados *kits* para determinar se um sujeito está ou não em risco de desenvolver hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF. Em algumas concretizações, os *kits* são para determinar se um sujeito tem ou não uma maior probabilidade de beneficiar de terapia anti-VEGF. Estes *kits* contêm uma ou mais das composições acima descritas e instruções para utilização. Apenas como exemplo, os *kits* são para determinar se um paciente está ou não em risco de desenvolver hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF contendo um primeiro e um segundo oligonucleótidos específicos de uma região polimórfica de VEGF, e.g., VEGF (-2578C/A), VEGF (-1498C/T), VEGF (-1154G/A) ou VEGF (-634G/C). Como outro exemplo, os *kits* são para determinar se um sujeito tem ou não uma maior probabilidade de beneficiar de terapia anti-VEGF contendo um primeiro e um segundo oligonucleótidos específicos de uma região polimórfica de VEGF, e.g., VEGF (-2578C/A) ou VEGF (-1154G/A). Oligonucleótidos "específicos de" um *locus* genético ou se ligam à região polimórfica do *locus* ou se ligam adjacentes à região polimórfica do *locus*. Para oligonucleótidos a utilizar

como iniciadores para amplificação, os iniciadores são adjacentes se estiverem suficientemente próximos para serem utilizados para produzir um polinucleótido compreendendo a região polimórfica. Numa concretização, os oligonucleótidos são adjacentes se se ligarem a menos de cerca de 1-2 kb, e.g. menos de 1 kb desde o polimorfismo. Oligonucleótidos específicos são capazes de se hibridizarem com uma sequência, e sob condições adequadas não se ligarão a uma sequência diferindo num único nucleótido.

O *kit* pode compreender pelo menos uma sonda ou iniciador que é capaz de se hibridar especificamente com a região polimórfica do VEGF e instruções para utilização. Os *kits* compreendem usualmente pelo menos um dos ácidos nucleicos acima descritos. *Kits* para amplificar pelo menos uma porção de VEGF compreendem geralmente dois iniciadores, pelo menos um dos quais é capaz de se hibridizar com a sequência do variante alélico. Estes *kits* são adequados para detecção do genótipo, por exemplo, por detecção de fluorescência, por detecção electroquímica, ou por outra detecção.

Os oligonucleótidos contidos num *kit*, sejam eles utilizados como sondas ou como iniciadores, podem estar marcados de modo detectável. Os marcadores podem ser detectados quer directamente, por exemplo para marcadores fluorescentes, quer indirectamente. A detecção indirecta pode incluir qualquer método de detecção conhecido de um perito na especialidade, incluindo interacções biotina-avidina, ligação de anticorpo e outros. Oligonucleótidos marcados de modo fluorescente podem também conter uma molécula de extinção. Os oligonucleótidos podem estar ligados a uma superfície. Em algumas concretizações, a superfície é sílica ou vidro. Em algumas concretizações, a superfície é um eléctrodo de metal.

Ainda outros *kits* compreendem pelo menos um reagente necessário para realizar o ensaio. Por exemplo, o *kit* pode compreender uma enzima. Alternativamente, o *kit* pode compreender um tampão ou qualquer outro reagente necessário.

Os *kits* podem incluir todos ou alguns dos controlos positivos, controlos negativos, reagentes, iniciadores, marcadores de sequenciação, sondas e anticorpos aqui

descritos para determinar o genótipo do sujeito na região polimórfica do VEGF.

O exemplo seguinte destina-se simplesmente a ilustrar a prática do presente invento e não é apresentado como limitação.

EXEMPLO

Exemplo 1. Polimorfismos genéticos em VEGF e sua associação com o desfecho

O E2100 era um ensaio de Fase III, intergrupo que demonstrou uma melhoria na sobrevivência sem progressão (PFS) e na taxa de resposta (RR) quando se adicionou bevacizumab a paclitaxel para mulheres com cancro da mama metastático previamente não tratado. Observou-se significativamente mais hipertensão e proteinúria em mulheres que receberam bevacizumab.

Amostras

Realizámos um ensaio retrospectivo de dados a partir do ensaio E2100 de Avastin em relação ao cancro da mama. O conjunto de dados incluiu 673 pacientes elegíveis com 623 eventos de progressão da doença e 483 mortes. Entre estes, determinámos o genótipo de blocos de tumor embebidos em parafina a partir de 363 casos elegíveis (seguimento mediano de 43 meses). Adicionalmente, estavam disponíveis 377 casos elegíveis para IHC de VEGF e estavam disponíveis 341 para IHC de VEGFR-2. Todos os espécimes foram analisados de modo "cego" sem identificadores do paciente ou informação do desfecho clínico.

Polimorfismos

Apresentam-se na Tabela 1 os polimorfismos testados.

Tabela 1. Polimorfismos de um único nucleótido (SNP) testados

Gene	Polimorfismo de um único nucleótido (SNP)	Localização	Caucasiano: Frequência de alelo raro ¹	Afro-americano: Frequência de alelo raro ¹
VEGF	-2578 C/A	Promotor	A = 49%	A = 24%
	-1498 C/T	Promotor	C = 49%	C = 33%
	-1154 G/A	Promotor	A = 33%	A = 10%
	-634 G/C	5' UTR	C = 32%	C = 35%
	936 C/T	3' UTR	T = 15%	T = 13%
VEGFR-2	889 G/A (V297I)	Exão 7	A = 9%	A = 20%
	1416 A/T (Q472H)	Exão 11	T = 25%	T = 10%

Escolheram-se estes polimorfismos porque estes genes são conhecidos por modularem a angiogénese: 1) estão envolvidos no percurso da angiogénese; 2) tinham um polimorfismo genético estabelecido; 3) a frequência do polimorfismo era elevada o suficiente tal que o seu impacto na resposta ao fármaco ao nível de uma população seria significativo; e/ou 4) o polimorfismo poderia alterar a função do gene de um modo relevante biologicamente.

Genotipagem de SNP

Extraíu-se ADN a partir de secções de tecido embebidas em parafina de 20 micron utilizando o *kit* de tecido DNeasy® (Qiagen, Valencia, CA). Determinaram-se os SNP for genotipagem com PCR em tempo real baseada em Taqman®. Os detalhes para cada SNP foram anteriormente descritos em Schneider, *et al.* (2007) "Association of polymorphisms of angiogenesis genes with breast cancer." *Breast Cancer Res. Treat.* Acima de tudo, o genótipo foi determinado com sucesso em 88,2% dos casos. Isto variou com base no SNP analisado e com uma taxa de sucesso de 82% a 92%. Para todos os SNP combinados, 50% foram avaliados com exactidão a partir do braço de controlo e 50% a partir do braço de combinação.

Avaliação da expressão de proteína

A expressão de proteína em relação a VEGF e VEGFR-2 foi avaliada por IHC a partir do bloco de tumor submetido. Para a avaliação de VEGF, desparafinaram-se as lâminas, reidrataram-se e colocaram-se numa panela de cozedura a vapor para vegetais com tampão citrato a pH de 6,0 durante 30 minutos. Após as lâminas terem arrefecido até à temperatura ambiente, lavaram-se em duas mudas de água destilada seguindo-se duas mudas de solução salina tamponada com fosfato (PBST) com 0,05% de Tween™ 20 (Fisher Scientific, Pittsburgh PA). Colocaram-se depois as lâminas num Dako Autostainer (Dako Cytomation, Carpinteria CA). Incubaram-se as lâminas com solução de bloqueio de peroxidase (Dako, S2001) durante 10 minutos seguindo-se três mudas de PBST durante um mínimo de 10 minutos no total. Incubaram-se depois as lâminas sequencialmente com anticorpo anti-VEGF (VG1, Lab Vision, Fremont CA) diluído 1:100 durante 60 minutos, Dako Envision + (Dako, K4001) durante 60 minutos e Sistema Substrato-Cromogénio DAB (Dako, K3466), com três mudanças de PBST entre cada passo. As lâminas foram contrastadas com hematoxilina Harris (Fisher), desidratadas, limpas e colocou-se uma lamela. Calculou-se uma *VEGF-inv score* por estimativa da percentagem de células de tumor invasivas com coloração de VEGF citoplásmico da totalidade da lâmina.

Para IHC de VEGFR-2, secções de tumor da mama embebidas em parafina fixadas com formalina foram primeiro desparafinadas e reidratadas. Em seguida, executou-se a recuperação de antigénio a 98°C durante 20 minutos em Target Retrieval Solution a pH de 9,0 (S2367, Dako, Carpinteria, CA). Aplicou-se depois Bloco de Enzima Endógeno Dual (K4065, En vision™+ Dual Link System-HRP, Dako) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Administrou-se anticorpo monoclonal de coelho anti-VEGFR-2 clone 55B11 (#2479, Cell Signaling Tech., Danvers, MA.) a 1:20 durante 2 horas à temperatura ambiente. O desenvolvimento de sinal com DAB foi conduzido pelo protocolo para o *kit* EnVision+ com pequenas modificações. A contrastação foi completada com hematoxilina QS (H-3404, Vector, Burlingame, CA) seguida por desidratação e cobertura com uma lamela. Como controlos positivos utilizaram-se

secções de placenta humana ou fígado. A omissão do anticorpo primário e a substituição por IgG de coelho (X0936, Dako) serviram como controlos negativos. A pontuação foi conduzida com o método *H-score*, calculada por: $\Sigma(u \times \alpha)$, onde u era a intensidade de coloração (0-3+), e α era a percentagem (0-100) de células de tumor coradas com cada intensidade (ref).

Estatística

As distribuições de evento-tempo foram estimadas utilizando análise de Kaplan-Meier. Avaliou-se a associação do genótipo com os resultados de tempo para evento (PFS & OS) utilizando o método dos perigos proporcionais de Cox. Um nível de significância = 0,017 correspondia a uma taxa global de erro do tipo I de 0,05 para cada polimorfismo, com base na correcção de Bonferroni para comparações múltiplas. Dada uma taxa de falsos positivos de 1,7% para cada comparação, a probabilidade de ocorrer pelo menos um falso positivo entre as 21 comparações era de cerca de 0,3, assumindo que todas as comparações eram independentes. Avaliou-se a associação de genótipo com a RR (definida como resposta completa/resposta parcial vs. doença estável/doença progressiva) e a toxicidade (hipertensão de grau 3/4) utilizando o teste exacto de Fisher com um nível de significância de $p = 0,05$. Estudou-se a associação do genótipo com a expressão utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Para RR e toxicidade, dada uma taxa de falsos positivos de 5% para cada comparação, a probabilidade de ocorrer pelo menos um falso positivo entre as 7 comparações era cerca de 0,3, assumindo que todas as comparações eram independentes. Avaliaram-se as associações da expressão com o resultado tempo para evento (PFS & OS) e RR utilizando o método dos perigos proporcionais de Cox e o teste da soma das ordens de Wilcoxon, respectivamente. Todos os valores de p eram bilaterais.

Relação de genótipo com eficácia

Compararam-se todos os genótipos candidatos (Tabela 1) com a eficácia tanto no braço de controlo (paclitaxel sozinho) como no braço de combinação (paclitaxel e bevacizumab) como avaliado no E2100. Os parâmetros de

eficácia incluíram PFS (ponto final primário de E2100), OS e RR. O genótipo VEGF-2578 AA e os genótipos VEGF-1154 AA previram uma OS favorável (Tabela 2) para pacientes no braço de combinação.

Tabela 2. Relação do genótipo VEGF com a sobrevivência global (OS)

SNP	Comparação de genótipo (OS mediana em meses & frequência)	Razão de perigo	Intervalo de confiança	Valor de p
VEGF-2578	CA (24,4; 42,6%) vs. AA (37,0; 20,8%)	1,78	(98,3% = 0,96, 3,32)	0,026
	CC (22,2; 37,6%) vs. AA (37,0; 21%)	1,70	(98,3% = 0,91, 3,17)	0,043
	CC (22,2; 37,6%) vs. CA (24,4; 42,6%)	0,99	(98,3% = 0,62, 1,58)	0,95
	AA vs. CA+CC	0,58	(95% = 0,36, 0,93)	0,023
VEGF - 1154	GG (22,3; 56,9%) vs. GA (29,8; 38,8%)	1,60	(98,3% = 0,98, 2,60)	0,022
	GG (22,3; 56,95) vs. AA (46,5; 9,4%)	2,69	(98,3% = 1,10, 6,59)	0,008
	GA (29,8; 38,8%) vs. AA (46,5; 9,4%)	1,68	(98,3% = 0,66, 4,30)	0,19
	AA vs. GA vs. GG	0,62	(95% = 0,46, 0,83)	0,001

Estes genótipos não previram uma OS melhorada para pacientes no braço de controlo e não previram nem um PFS nem uma RR superiores para qualquer dos braços. Por causa da melhoria significativa para aqueles com o genótipo VEGF-2578

AA, analisámos o genótipo AA em comparação com os genótipos combinados CA e CC em relação à OS e esta comparação demonstrou uma razão de perigo de 0,58 (C.I. a 95%: 0,36, 0,93; $p = 0,023$) em favor do genótipo AA. A comparação de PFS correspondente revelou uma razão de perigo de 0,91 (C.I. a 95%: 0,62, 1,35; $p = 0,65$) em favor do genótipo VEGF-2578 AA. Por causa de um efeito aparente de gene-dose no SNP VEGF-1154, avaliámos um efeito gene-dose e este demonstrou uma razão de perigo de 0,62 (C.I. a 95%: 0,46, 0,83; $p = 0,001$) em favor do genótipo VEGF-1154 AA. Esta mesma análise gene-dose para PFS revelou uma razão de perigo de 0,79 (C.I. a 95%: 0,62, 1,02; $p = 0,07$) em favor do genótipo VEGF-1154 AA (Tabela 3).

Tabela 3. Relação do genótipo de VEGF com a sobrevivência livre de progressão (PFS)

SNP	Comparação de genótipo (PFS mediana em meses)	Razão de perigo	Intervalo de confiança	Valor de p
VEGF-1154	AA (14,1) vs. GA (13,5) vs. GG (10,7)	0,79	(95% = 0,62, 1,02)	0,07

A sobrevivência global mediana para o braço de controlo foi 25,2 meses e 26,7 meses para o braço de combinação. A sobrevivência global para os genótipos VEGF-2578 AA e VEGF-1154 AA no braço de combinação foram significativamente mais longos de 37,0 meses e 46,5 meses, respectivamente.

Combinámos também todos os genótipos de VEGF-2578 e VEGF-1154 e avaliaram-se quanto a uma associação com a sobrevivência global. Existiam 9 combinações possíveis das quais quatro grupos tinham 3 ou menos casos e deste modo foram excluídos da análise. Os restantes 5 grupos foram analisados em relação à sobrevivência (Tabela 4). Quando se comparou o genótipo VEGF-2578/-1154 AA/AA com todos os outros verificou-se uma melhoria estatisticamente significativa na sobrevivência global ($p = 0,041$).

Tabela 4. Comparação de genótipos de VEGF combinados com a sobrevivência global

Genótipos de VEGF-2578/-1154	Sobrevivência global mediana em meses	% de casos	Comparação com outros genótipos combinados
AA/AA	49,7	7,6	P = 0,041
AA/GA	30,2	11,4	p = 0,44
CA/GA	27,1	20,9	p = 0,40
CA/GG	22,5	21,5	p = 0,038
CC/GG	21,7	32,9	p = 0,30
Outros	----	5,7	

Relação do genótipo com a toxicidade (hipertensão de grau 3/4)

Compararam-se todos os genótipos candidatos (Tabela 1) com a toxicidade significativa mais comum, hipertensão de grau 3/4 (por critérios de toxicidade comuns). Mais de 15% de todos os pacientes que receberam bevacizumab no ensaio original experimentaram hipertensão de grau 3/4. Observámos que alelos específicos em VEGF-1498C/T e -634G/C estavam associados a hipertensão de grau 3/4 no braço experimental. Os genótipos VEGF-634CC e VEGF-1498TT estavam fortemente relacionados com menos hipertensão de grau 3/4 (8% e 0%, respectivamente) quando comparados com os genótipos alternativos (Tabela 5). Verificou-se numericamente menos hipertensão no genótipo VEGF-2578CC (12%) quando comparado com os genótipos CA (21%) e AA (22%) mas isto não atingiu significância estatística ($p = 0,32$). Quando se comparou o VEGF-2578CC vs. os genótipos alternativos combinados (CA/AA) verificou-se uma tendência para associação ($p = 0,16$). De um modo similar, o genótipo VEGF-1154GG teve menos hipertensão (14%) em comparação com os genótipos alternativos combinados de GA (22%) e GG (27%) mas isto não atingiu significância estatística ($p = 0,15$).

Tabela 5. Relação do genótipo VEGF com hipertensão de grau 3/4

Polimorfismo de um único nucleótido	% de hipertensão de grau 3/4 & (valor absoluto/percentagem) por genótipo	valor de p
VEGF-634	CC = 0% (n = 27; 15,3%) vs. GC = 22% (n = 82; 46,3%) vs. GG = 19% (n = 68; 38,4%)	0,013
	CC vs. GC+GG	0,005
VEGF-1498	TT = 8% (n = 60; 33,9%) vs. CT = 22% (n = 82; 46,3%) vs. CC = 23% (n = 35; 19,8%)	0,056
	TT vs. CC+CT	0,022

Relação do genótipo com a expressão (IHC)

Compararam-se todos os genótipos candidatos (Tabela 1) com a expressão de tumor primário (avaliada por IHC) para ambos os VEGF e VEGFR-2. Avaliou-se o grau de expressão de VEGF pelo *VEGF-inv score* que variou de 0 a 100 (com base na percentagem de células invasivas com coloração de VEGF citoplásmico). O grau de expressão de VEGFR-2 foi avaliado por um *H-score* que podia variar de 0 (nenhuma expressão detectada) até 300 (100% das células tinham expressão máxima 3+). Compararam-se os genótipos com a expressão de VEGF para todo o grupo e não se determinaram quaisquer associações estatisticamente significativas. Para o genótipo VEGF-2578 verificou-se uma tendência para uma associação entre genótipo e VEGF-inv score. A pontuação média para o genótipo AA foi inferior (AA = 48 (desvio padrão = 40)) quando comparado com os genótipos alternativos (CA = 54 (desvio padrão = 37) e CC = 61 (desvio padrão = 37)) mas isto não atingiu significância estatística ($p = 0,08$). O genótipo VEGF-1154AA teve também uma expressão média mais baixa (AA = 42 (desvio padrão = 40)) do que os genótipos alternativos (GA = 53 (desvio padrão = 38) e GG = 58 (desvio padrão = 37)) mas isto também não atingiu significância estatística ($p = 0,13$). Nenhum genótipo se correlacionaram com a expressão de VEGFR-2.

Relação da expressão de VEGF e VEGFR-2 com o desfecho clínico

Comparou-se a expressão de tumor primário (avaliada por IHC) com o desfecho no E2100 (RR, PFS e OS). Não se verificou qualquer associação estatisticamente significativa entre a expressão quer de VEGF quer de VEGFR-2 com o desfecho. Isto foi verdade quando se avaliou o braço de controlo, o braço de combinação, ou todo o grupo.

Lisboa, 2011-11-23

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prever se um paciente está ou não em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF, compreendendo rastrear uma amostra isolada a partir do referido paciente em relação a um polimorfismo genómico em VEGF (-1498C/T), onde o paciente está em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF se o genótipo correspondente compreende VEGF (-1498C).

2. Método para prever se um paciente está ou não em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF, compreendendo rastrear uma amostra isolada a partir do referido paciente em relação a um polimorfismo genómico em VEGF (-634G/C), onde o paciente está em risco acrescido de hipertensão associada a tratamento com um antagonista de VEGF se o genótipo correspondente compreende VEGF (-634G).

3. Método da reivindicação 1 ou 2, onde o referido antagonista de VEGF é um anticorpo anti-VEGF.

4. Método da reivindicação 3, onde o referido anticorpo anti-VEGF é bevacizumab.

5. Método da reivindicação 1 ou 2, onde o referido paciente está a ser tratado de cancro com um antagonista de VEGF.

6. Método da reivindicação 5, onde o referido paciente está adicionalmente a ser tratado com uma composição antineoplásica.

7. Método da reivindicação 5, onde o referido cancro é cancro da mama.

8. Método da reivindicação 5, onde o referido antagonista de VEGF é um anticorpo anti-VEGF.

9. Método da reivindicação 8, onde o referido anticorpo anti-VEGF é bevacizumab.

10. Método da reivindicação 8, onde o referido paciente está adicionalmente a ser tratado com uma composição antineoplásica.

Lisboa, 2011-11-23