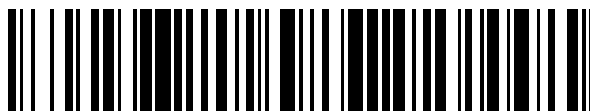


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 035**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2014** **E 14305477 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 2927328**

54 Título: **SSEA4 y ST3GAL2 como biomarcadores de respuesta a fármacos quimioterapéuticos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.12.2018

73 Titular/es:

MILTENYI BIOTEC GMBH (50.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE y
XENTECH (50.0%)

72 Inventor/es:

HARDT, OLAF;
BOSIO, ANDEAS;
ALOIA, ANDREA;
JUDDE, JEAN-GABRIEL;
PETROVA, EVGENIYA;
CAIRO, STEFANO y
DEAS, OLIVIER

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 693 035 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

SSEA4 y ST3GAL2 como biomarcadores de respuesta a fármacos quimioterapéuticos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a métodos para predecir el resultado del tratamiento quimioterapéutico del cáncer en un individuo y biomarcadores para el mismo.

10 Antecedentes de la invención

En el campo de la oncología, los biomarcadores se usan para calcular el pronóstico de una malignidad, predecir tratamientos adecuados, monitorear la progresión de la enfermedad y evaluar el impacto del tratamiento. La gama de biomarcadores usados es extremadamente amplia. Se usan con frecuencia las características morfológicas o histológicas, pero además los marcadores moleculares al nivel de proteína y de ácido nucleico (ADN/ARN).

Mientras que existen marcadores buenos para la mayoría de las terapias dirigidas, para la mayoría de las entidades tumorales existe una ausencia de marcadores que puedan usarse para predecir la respuesta para terapias sistémicas como la quimioterapia. En el cáncer de mama, la quimioterapia se usa predominantemente para la enfermedad en estadio 2-4, y es beneficiosa particularmente en la enfermedad con receptor de estrógeno negativo (ER-, por sus siglas en inglés). Usualmente, se administran en combinaciones varios fármacos, y uno de los tratamientos más comunes es la ciclofosfamida más doxorubicina (Adriamicina®), conocida como A/C. En general, la quimioterapia funciona mediante la destrucción inespecífica de las células de crecimiento rápido/replicación rápida. En el caso de la A/C, la muerte celular se induce al causar daño al ADN durante la replicación. Debido al mecanismo de acción general para la mayoría de los agentes quimioterapéuticos, estos fármacos junto a las células tumorales objetivo dañan, además, a las células normales de crecimiento rápido donde ellos causan efectos secundarios graves como pérdida de cabello o complicaciones hepáticas y gastrointestinales.

El documento WO2013/152301A1 describe el uso de los genes de la vía de biosíntesis de O-glicano (OGBP, por sus siglas en inglés), lo que incluye el ST3GAL2, para determinar el pronóstico de un paciente con cáncer de ovario, en donde un pronóstico favorable comprende una probabilidad aumentada de supervivencia después del tratamiento con quimioterapia primaria.

El documento EP2036988A1 describe biomarcadores para el riesgo de desarrollar cáncer ginecológico recurrente hacia un agente quimioterapéutico. Los genes descritos son AKR1C1, MLPH, ESR1, PGR, COMP, DCN, IGKC, CCL5, FBN1 y/o UBE2C.

Gottschling y otros (2012, European Respiratory Journal 41:656-663) describen niveles altos de SSEA4 en el cáncer de pulmón con recaída y describen el antígeno de superficie como un marcador de mal pronóstico.

Aunque menos del 25 % de los pacientes con cáncer de mama se benefician del tratamiento quimioterapéutico (CLIFFORD A. HUDIS y LUCA GIANNI, The Oncologist 2011;16(suppl 1):1-11), este abordaje sistémico se usa todavía como el tratamiento convencional. Debido a los efectos secundarios graves, sería beneficioso altamente identificar marcadores que puedan usarse para predecir la respuesta a la quimioterapia lo que evitaría el tratamiento de los tumores con resistencia intrínseca.

Breve descripción de la invención

Sorprendentemente, se encontró que el SSEA4 (antígeno embrionario 4 específico de estadio), un sialilglicolípido, y ST3GAL2, la enzima sintetizadora del SSEA4, son biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de respuesta farmacológica en el cáncer.

La expresión de SSEA4 y/o ST3GAL2 en/dentro de las células cancerosas predice el resultado del tratamiento quimioterapéutico de estas células. SSEA4 y/o ST3GAL2 pueden usarse como biomarcadores en un método para predecir la resistencia a la quimioterapia en un individuo con cáncer en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales humano (RCC, por sus siglas en inglés) y cáncer de ovario humano si el biomarcador es SSEA4 y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y si el biomarcador es ST3GAL2 y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicho tratamiento quimioterapéutico son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

60 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Diseño del estudio para el tratamiento quimioterapéutico de xenoinjertos de tumores

65 Tras el injerto estable de los tumores humanos (etapa de pretratamiento, A), los ratones se trataron mediante el uso de un tratamiento convencional de combinación doxorubicina/ciclofosfamida (A/C). Después de la reducción del tumor, se

extrajeron los nódulos residuales (etapa de tumor residual, C). El mismo día, se extrajeron los tumores de ratones no tratados (etapa sin tratamiento, B), los cuales sirvieron como controles directos. Además, se mantuvo un grupo de animales con tumores residuales hasta la recaída de la enfermedad (etapa de rebrote, D).

5 Figura 2: Estrategia de selección de poblaciones representativas para el análisis de marcadores por citometría de flujo de tejido de xenoinjerto tumoral disociado

El tejido tumoral se disoció para obtener una suspensión de células individuales a la vez que se preservaron los epítomos de la superficie celular. La muestra se tiñó para marcadores específicos de ratón para excluir las células de origen murino del análisis, así como también para los candidatos de cribado y se analizó mediante citometría de flujo multiparamétrica. Los dobletes se excluyeron mediante selección de subpoblaciones por FSC-A/FSC-H (A), los restos se excluyeron mediante selección de poblaciones por FSC/SSC (B), las células muertas se excluyeron mediante la exclusión de subpoblaciones con eventos PI⁺ (C), y las células de ratón se excluyeron mediante la selección de subpoblaciones con eventos α -ratón-FITC negativos (D). Cuando se cribaron dos muestras en paralelo, una de las muestras se marcó mediante el uso de un colorante UV, lo que permite la separación posterior de los eventos de cada muestra mediante la selección de subpoblaciones con intensidad de fluorescencia en el canal VioBlue (E-H).

20 Figura 3: Identificación de marcadores de superficie celular regulados diferencialmente durante el tratamiento quimioterapéutico

Los patrones de expresión de marcadores de superficie celular en xenoinjertos de tumores de cuatro pacientes con cáncer de mama independientes, HBCx-6 (A, B), HBCx-10 (C, D), HBCx-14 (E, F) y HBCx-17 (G, H), se analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica en tres puntos temporales, la etapa de tumor residual, la etapa sin tratamiento y la etapa de rebrote. En total, la expresión de 13 marcadores (2 a 9 por modelo de tumor) aumentó (B, D, F, H) y la expresión de 10 marcadores (1 a 5 por modelo de tumor) disminuyó (A, C, E, G) durante la quimioterapia.

Figura 4: Expresión de SSEA4 durante el tratamiento quimioterapéutico de xenoinjertos de tumores

La expresión de SSEA4 durante el tratamiento quimioterapéutico de xenoinjertos de tumores de cuatro pacientes independientes con cáncer de mama, HBCx-6, HBCx-10, HBCx-14 y HBCx-17, se analizó mediante citometría de flujo multiparamétrica en cuatro puntos temporales, la etapa de pretratamiento, la etapa de células tumorales residuales y la etapa sin tratamiento paralela, y la etapa de rebrote. El número de células positivas para SSEA4 se enriqueció significativamente ($p < 0,001$, $n = 8$) tras el tratamiento con A/C en todos los tumores analizados. Además, en tres de cada cuatro modelos tumorales, HBCx-10, HBCx-14 y HBCx-17, la fracción de células positivas se redujo a los niveles basales cuando los tumores recayeron.

*** $p < 0,001$

40 Figura 5: Expresión de SSEA4 en tumores sensibles o resistentes al tratamiento quimioterapéutico

Los tumores que son sensibles ($n = 6$) o resistentes ($n = 4$) al tratamiento con A/C se analizaron para determinar la expresión de SSEA4. Tres de cada cuatro de los modelos tumorales resistentes mostraron porcentajes más altos de células positivas para SSEA4 que todos los seis tumores sensibles. En dos de los modelos tumorales resistentes, casi todas las células expresaron SSEA4.

45 Figura 6: Expresión de SSEA4 en RCC y tejido renal sano

El carcinoma de células renales de células claras (RCC, por sus siglas en inglés), que se mostró resistente intrínsecamente a la quimioterapia en más del 95 % de los pacientes, se investigó para determinar la expresión de SSEA4. El RCC primario así como también el tejido renal sano del mismo paciente se disociaron y analizaron mediante citometría de flujo multiparamétrica. Los dobletes se excluyeron mediante selección de subpoblaciones por FSC-A/FSC-H (A), los restos se excluyeron mediante selección de poblaciones por FSC/SSC (B), las células muertas se excluyeron mediante la exclusión de subpoblaciones con eventos PI⁺ (C), y las células de ratón se excluyeron mediante la selección de subpoblaciones con eventos α -Lin-FITC negativos (D). En cada paciente, se analizó en paralelo el tejido sano y tumoral. Por lo tanto, una de las muestras se marcó mediante el uso de un colorante UV lo que permite la separación posterior de los eventos de cada muestra mediante la selección de subpoblaciones con intensidad de fluorescencia en el canal VioBlue (E-H). En todos los pacientes analizados ($n = 3$), la expresión de SSEA4 aumentó fuertemente en el tejido tumoral y casi todas las células tumorales expresaron este marcador (F-H).

60 * α -Lin-FITC = CD45-FITC, CD31-FITC, CD235a (Glicoforina A)-FITC

Figura 7: Expresión de SSEA4 durante el tratamiento quimioterapéutico de células de cáncer de mama in vitro

65 Líneas celulares que contenían cantidades diferentes de células positivas para SSEA4 se trataron con fármacos quimioterapéuticos in vitro. Una línea celular de tumor primario derivada del modelo HBCx-17 mostró un crecimiento reproducible parcialmente en un fenotipo adherente y en uno en suspensión. Las células cultivadas en suspensión

mostraron una expresión de SSEA4 mayor significativamente ($p = 0,029$) en comparación con las células adherentes (A). Para evaluar la sensibilidad de ambas subpoblaciones al tratamiento quimioterapéutico, se midieron los valores de CI50 ($n = 3$) para fármacos usados comúnmente. Para Cisplatino, Mafosfamida, 5-Fluorouracilo y Adriamicina®, las células en suspensión mostraron valores más altos de CI50, lo que indica un aumento de la resistencia a esos fármacos (B). Para examinar directamente el fenotipo de las células que sobrevivieron al tratamiento, se trató otra línea celular adherente puramente derivada del modelo HBCx-17 con concentraciones crecientes de Mafosfamida (C), 4-Hidroxíciclofosfamida (D) o Adriamicina® (E) ($n = 4$). En todos los casos, la población sobreviviente mostró una fracción mayor significativamente de células positivas para SSEA4.

** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Figura 8: La expresión de SSEA4 indica un fenotipo más mesenquimático

La expresión de SSEA4 se evaluó tras la inducción de EMT. Para inducir una transición mesenquimática, la línea celular epitelial de mama MCF10A se trató con TGF β 1 a concentraciones de 10 y 20 ng/ml. Tras el tratamiento, casi todas las células cambiaron su morfología de un tipo de colonia compactada a una forma fibroblástica alargada (A). La F-actina se tiñó con faloidina para visualizar la arquitectura del citoesqueleto. Los marcadores epiteliales E-cadherina (B) y EpCAM (C) se regularon negativamente, mientras que el marcador mesenquimático Fibronectina (D) se reguló positivamente tras el tratamiento. La fracción de células positivas para SSEA4 se incrementó tras la inducción de EMT (E), lo que verifica que la expresión de SSEA4 indica un fenotipo más mesenquimático.

Figura 9: La expresión de ST3GAL2 se correlaciona con el pronóstico del resultado clínico de las pacientes con cáncer de mama

Debido a la naturaleza del epítipo SSEA4, su expresión no puede controlarse directamente mediante el perfilado de transcriptoma. Por lo tanto, el valor pronóstico de su enzima sintetizadora ST3GAL2 se evaluó mediante el uso de una gran base de datos pública de micromatrices clínicas de tumores de mama de 2.977 pacientes (Gyorffy B y otros, Breast Cancer Res Treatment, 2010 Oct;123(3):725-31.). Cuando se usó el conjunto de datos completo, no se observaron diferencias en el resultado clínico, mientras que se encontraron diferencias significativas altamente ($p < 0,01$) hacia un pronóstico peor para los pacientes que expresaban niveles altos de ST3GAL2 en los pacientes ER-, los pacientes PR- y los pacientes doble negativos con independencia del tratamiento (A). Cuando se centró en pacientes tratados con quimioterapia, se observó una reducción significativa altamente de la supervivencia libre de recaída con independencia del subtipo de tumor ($p < 0,01$, HR 1,91), en pacientes ER- ($p < 0,01$, HR 2,97) y en pacientes doble negativos ($p < 0,01$, HR 3,08) en pacientes que expresaban niveles altos de ST3GAL2 (B). Además, mediante la aplicación de la supervivencia libre de metástasis a distancia como punto final principal, los pacientes tratados con quimioterapia tuvieron un pronóstico peor cuando expresaron niveles altos de ST3GAL2 (C).

Figura 10: La expresión de ST3GAL2 se correlaciona con el pronóstico del resultado clínico de los pacientes con cáncer de ovario

Para evaluar el valor pronóstico de la expresión de ST3GAL2 en una entidad tumoral independiente, se analizó una base de datos de micromatrices clínicas de tumores de ovario pública de 1.464 pacientes (Gyorffy B y otros, Endocrine-Related Cancer. 2012 Abr 10;19(2):197-208.). Cuando se usó el conjunto de datos completo, se observó una diferencia significativa hacia un resultado clínico peor con respecto a la supervivencia libre de progresión ($p < 0,05$), así como también a la supervivencia posterior a la progresión ($p < 0,05$, A). Cuando se centró en los pacientes tratados con quimioterapia, el nivel de significación se incrementó aún más para ambos puntos finales ($p < 0,01$, Figura B).

Descripción detallada de la invención

Inesperadamente, identificamos que SSEA4 y ST3GAL2, la enzima sintetizadora de SSEA4, son biomarcadores para la resistencia a la quimioterapia al cáncer en un individuo. La expresión de SSEA4 y/o ST3GAL2 en/dentro de las células cancerosas puede usarse para la predicción o estimación de la respuesta al tratamiento quimioterapéutico de dichas células en un individuo en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano si el biomarcador es SSEA4 y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano si el biomarcador es ST3GAL2 y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicho tratamiento quimioterapéutico son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona el uso de SSEA4 y/o ST3GAL2 como biomarcadores para evaluar el resultado del tratamiento quimioterapéutico de un cáncer en un individuo en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano si el biomarcador es SSEA4 y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano si el biomarcador es ST3GAL2 y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicho tratamiento quimioterapéutico son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

La evaluación puede ser de valor diagnóstico.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la evaluación del pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia en un individuo con cáncer, el método comprende las etapas de

- a) proporcionar una muestra a analizar
- b) detectar la expresión de SSEA4 en dicha muestra

En donde la expresión de SSEA4 en dicha muestra es indicativa de un mal pronóstico y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Preferentemente, la expresión de SSEA4 en más del 50 % de las células cancerosas de dicha muestra a analizar es indicativa de un mal pronóstico.

Comprensiblemente, el método de la presente descripción permite el pronóstico asociado a la sensibilidad a la quimioterapia (buen pronóstico) en un individuo con cáncer en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) humano y cáncer de ovario humano si el biomarcador es SSEA4 y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicho tratamiento quimioterapéutico son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Este es el caso si solo muy pocas células, preferentemente ninguna célula, de la muestra a analizar presenta el biomarcador SSEA4.

La presencia o expresión de SSEA4 en las células cancerosas puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica adecuado para determinar la presencia o detectar la expresión de un biomarcador en células, tales como la tinción con un anticuerpo o un fragmento de este. Preferentemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los métodos para la tinción de células con anticuerpos o fragmentos de estos se conocen bien en la técnica, tales como citometría de flujo, inmunohistoquímica o inmunocitoquímica.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la evaluación del pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia en un individuo con cáncer, el método comprende las etapas de

- a) proporcionar una muestra a analizar
- b) detectar el nivel de expresión de ST3GAL2 en dicha muestra
- c) comparar el nivel de expresión detectado con respecto a un nivel control
- d) determinar dicho pronóstico en base a la comparación de c)

En donde el nivel control es un nivel control de buen pronóstico y un aumento del nivel de expresión en comparación con el nivel control se determina como un mal pronóstico, y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano, y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Preferentemente, se determina un aumento del nivel de expresión de al menos el 50 % en comparación con el nivel control como indicador de mal pronóstico.

La expresión de ST3GAL2 se determina a nivel de ARNm o nivel de proteína.

Comprensiblemente, se determina un aumento del nivel de expresión de menos de 50 % en comparación con el nivel control como indicador de buen pronóstico. El método de la presente descripción permite el pronóstico asociado a la sensibilidad a la quimioterapia (buen pronóstico) en un individuo que tiene un cáncer, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano, y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Este es el caso si no es detectable un aumento del nivel de expresión de ST3GAL2 entre las células de la muestra a analizar y el nivel control.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para la evaluación del pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia en un individuo con cáncer, el método comprende las etapas de

- a) proporcionar una muestra a analizar
- b) detectar el nivel de actividad de la proteína ST3GAL2 en dicha muestra
- c) comparar el nivel de actividad detectado con un nivel control
- d) determinar dicho pronóstico en base a la comparación de c)

En donde el nivel control es un nivel control de buen pronóstico y un aumento del nivel de actividad en comparación con el nivel control se determina como un mal pronóstico, y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Preferentemente, se determina un aumento del nivel de actividad de al menos el 50 % en comparación con el nivel control como indicador de mal pronóstico.

5 La actividad de la proteína ST3GAL2 se determina en el nivel de proteína.

Comprensiblemente, se determina un aumento del nivel de actividad de menos del 50 % en comparación con el nivel control como indicador de buen pronóstico. El método de la presente descripción permite el pronóstico asociado a la sensibilidad a la quimioterapia (buen pronóstico) en un individuo con cáncer, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano, y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

Este es el caso si no es detectable un aumento del nivel de actividad de ST3GAL2 entre las células de la muestra a analizar y el nivel control.

15 El tratamiento quimioterapéutico comprende la aplicación de fármacos quimioterapéuticos que son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN. Con mayor preferencia, dicho tratamiento quimioterapéutico comprende la aplicación de fármacos quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consiste en cisplatino, mafosfamida, fluorouracilo/5-FU, doxorrubicina y docetaxel. Con la máxima preferencia, dicho tratamiento quimioterapéutico comprende la aplicación de la combinación de los fármacos quimioterapéuticos doxorrubicina/ciclofosfamida (A/C).

25 SSEA4 y/o ST3GAL2 son biomarcadores de pronóstico significativos que indican la resistencia de las células cancerosas a la quimioterapia en un individuo, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales humano (RCC) y cáncer de ovario humano si el biomarcador es SSEA4 y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano si el biomarcador es ST3GAL2 y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicho tratamiento quimioterapéutico son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.

30 Preferentemente, SSEA4 y/o ST3GAL2 son biomarcadores de pronóstico significativos asociados a la resistencia a la quimioterapia en un individuo que tiene cáncer de mama humano. Con mayor preferencia, SSEA4 y/o ST3GAL2 son biomarcadores de pronóstico significativos que indican resistencia a la quimioterapia en un individuo con cáncer de mama humano del subtipo "cáncer de mama triple negativo".

35 La expresión del gen ST3GAL2 puede determinarse a nivel de ácido nucleico, mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como el análisis de hibridación de transferencia de Northern, los ensayos de PCR basados en la transcripción inversa, las micromatrices de ARN o las micromatrices de ADN. Además, la expresión puede determinarse a nivel de proteína, es decir, mediante la medición del nivel del polipéptido codificado por el gen ST3GAL2, o la actividad biológica de este (la síntesis de SSEA4). Dichos métodos se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, inmunoensayos tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencia de Western, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, ensayos basados en el recambio de sustrato o micromatrices de proteínas.

40 Dado que SSEA4 es un sialilglicolípido, la presencia de SSEA4 no puede medirse directamente al nivel de ácido nucleico.

45 Definiciones

A menos que se especifique de cualquier otra manera, los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

50 En la presente descripción, el término "pronóstico" se refiere a un pronóstico del posible resultado asociado al éxito de un tratamiento quimioterapéutico de un cáncer en un individuo. En consecuencia, un pronóstico menos favorable, negativo y malo se define por una resistencia de las células cancerosas al tratamiento quimioterapéutico, lo que da como resultado un término de supervivencia o una tasa de supervivencia más baja después del tratamiento del individuo. A la inversa, un pronóstico positivo, favorable o bueno se define por la sensibilidad de las células cancerosas al tratamiento quimioterapéutico, lo resulta en un término de supervivencia o tasa de supervivencia después del tratamiento elevada. Por lo tanto, un predictor de "mal pronóstico" se asocia con un riesgo mayor de que un individuo que padece un cáncer es o será resistente a la quimioterapia aplicada para el tratamiento de dicho cáncer. Por lo tanto, "buen pronóstico" predice una probabilidad buena de que un paciente que padece un cáncer es o será sensible a la quimioterapia aplicada para el tratamiento de dicho cáncer.

65 Los términos "evaluar el pronóstico" o "evaluar el resultado" se refieren a la capacidad de predecir, pronosticar o correlacionar una detección o medición dada con un resultado futuro asociado con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico del cáncer del paciente.

El presente método para la evaluación del pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia de un cáncer en un individuo se destina, entre otros, a usarse clínicamente para tomar decisiones concernientes a las modalidades de tratamiento, lo que incluye la intervención quimioterapéutica, y los criterios de diagnóstico, tales como la estadificación de la enfermedad.

El término "resistencia a la quimioterapia" significa que algunas de las células cancerosas de la muestra a analizar (al menos una célula) se resiste al efecto deseado del tratamiento quimioterapéutico.

El término "sensibilidad al tratamiento quimioterapéutico" significa que las células cancerosas de la muestra a analizar son sensibles al efecto deseado del tratamiento quimioterapéutico.

La muestra usada para el presente método es una muestra biológica, preferentemente es una muestra derivada de un individuo que comprende tejido tumoral o células cancerosas. La muestra puede obtenerse de un individuo (paciente) en diversos puntos temporales, lo que incluye antes, durante y/o después del tratamiento quimioterapéutico. Preferentemente, la muestra a analizar en el presente método se obtiene antes del tratamiento quimioterapéutico. Preferentemente, la muestra a analizar comprende una suspensión de células individuales que comprende al menos 1 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 % de células cancerosas. El tejido tumoral para la muestra a analizar puede generarse invasivamente a partir de un individuo que padece cáncer y el tejido tumoral puede disociarse en una suspensión celular mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el tejido tumoral se disocia con el Kit de Disociación de Tumor humano en combinación con el disociador gentleMACS (ambos de Miltenyi Biotec GmbH). Después de la disociación, las células se resuspenden en un tampón para la citometría de flujo. Otros métodos para la generación de la muestra están disponibles en la técnica y más abajo se proporcionan ejemplos adicionales. Como alternativa al análisis de citometría de flujo, puede usarse inmunohistoquímica o inmunocitoquímica para la detección de la expresión de SSEA4 y/o ST3GAL2 con o sin disociación previa del tejido.

Preferentemente, estas células son viables. Pero, estas células pueden ser también células fijadas que pueden usarse para la extracción posterior de ácidos nucleicos o proteínas. La invención se ilustra principalmente mediante el aislamiento de tejido tumoral humano que se ha implantado en ratones. Sin embargo, abarca el aislamiento del tejido tumoral en general, por ejemplo, directamente de pacientes humanos que padecen de un cáncer.

Todos los métodos disponibles en la técnica para "detectar la expresión", "detectar el nivel de expresión" o "detectar el nivel de actividad" de biomarcadores se abarcan en la presente descripción. La expresión de un biomarcador de la invención puede detectarse a nivel de ácido nucleico o a nivel de proteína (ambos para ST3GAL2) o a nivel de glicolípidos (SSEA4). Por "detección de expresión", "detección del nivel de expresión" o "detección del nivel de actividad" se pretende determinar la cantidad o la presencia de un biomarcador. Por lo tanto, "detección de expresión", "detección del nivel de expresión" o "detección del nivel de actividad" abarca los casos donde se determina que un biomarcador no se expresa, no se expresa detectablemente, se expresa a un nivel bajo, se expresa a un nivel normal, o se sobreexpresa. Para determinar la sobreexpresión, la muestra a analizar puede compararse con una muestra correspondiente que se origina a partir de una persona sana o de un tejido sano del mismo paciente. Es decir, el nivel "normal" de expresión es el nivel de expresión del biomarcador en, por ejemplo, una muestra de tejido mamario de un individuo no afectado por cáncer de mama o región no infiltrada por el tejido tumoral (nivel control). Dicha muestra puede presentarse en una forma estandarizada. En algunas modalidades, la determinación de la (sobre)expresión de biomarcadores no requiere comparación entre la muestra a analizar y una muestra correspondiente (nivel control). Por ejemplo, la detección de la expresión de un biomarcador tal como el SSEA4, indicativo de un pronóstico de resistencia al tratamiento quimioterapéutico de un cáncer en un individuo, puede precluir la necesidad de comparación con una muestra correspondiente (nivel control) que, por ejemplo, se origina de una persona sana o tejido sano de un paciente. Los métodos para la "detección de expresión", "detección del nivel de expresión" o "detección del nivel de actividad" de los biomarcadores de la invención comprenden cualesquiera métodos que determinen la cantidad o la presencia de los biomarcadores ya sea a nivel de ácido nucleico o a nivel de proteína o a nivel de glicolípidos. Dichos métodos se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, transferencias de Western, transferencias de Northern, transferencias de Southern, ELISA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica, técnicas de hibridación de ácidos nucleicos, métodos de transcripción inversa de ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos. Los métodos para detectar el nivel de actividad de las proteínas también se conocen bien en la técnica, tales como ELISA o ensayos basados en el recambio de sustrato.

Un "nivel control" normal es un perfil de expresión de biomarcadores tal como el gen ST3GAL2, que se encuentra típicamente en una población celular de un individuo que se sabe que no padece cáncer o en tejido sano de un paciente. Un aumento en el nivel de expresión del biomarcador, tal como el gen ST3GAL2, en una muestra a analizar de un individuo que padece un cáncer (paciente) en comparación con la expresión de una muestra control normal, indica una probabilidad elevada de resistencia a la quimioterapia (mal pronóstico) para el cáncer.

Por ejemplo, un aumento en los niveles de expresión de ST3GAL2 de al menos 10 %, al menos 25 %, al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 100 % o más indica el mal pronóstico.

La diferencia entre los niveles de expresión de la muestra a analizar de un paciente y el nivel control puede normalizarse al nivel de expresión de los ácidos nucleicos controles, por ejemplo, los genes de mantenimiento, cuyos niveles de expresión se sabe que no difieren en dependencia del estado canceroso o no canceroso de la célula. Los genes control ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, beta-actina, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa y proteína ribosomal P1.

Para el método de evaluación del pronóstico asociado a la resistencia o sensibilidad a la quimioterapia en un individuo que tiene un cáncer mediante el uso del biomarcador SSEA4, en general, la presencia de SSEA4 en las células cancerosas en la muestra a analizar indica la resistencia de estas células a la quimioterapia. A un umbral de 50 % o más de células entre la fracción de células cancerosas en la muestra que porta el SSEA4 en la superficie celular, la predicción de resistencia contra la quimioterapia para la malignidad específica en investigación es extremadamente mala (ver ejemplo 2).

El término "tumor" se conoce médicamente como neoplasia. No todos los tumores son cancerosos: los tumores benignos no invaden los tejidos vecinos y no se diseminan por todo el cuerpo.

El término "cáncer" se conoce médicamente como neoplasia maligna. El cáncer es un grupo amplio de enfermedades que involucran el crecimiento celular no regulado. En el cáncer, las células se dividen y crecen descontroladamente, forman tumores malignos e invaden las partes cercanas del cuerpo. Además, el cáncer puede diseminarse a partes más distantes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Existen más de 200 cánceres conocidos diferentes que afectan a los humanos.

Los términos "quimioterapia" o "tratamiento quimioterapéutico" se refieren al tratamiento del cáncer (células cancerosas) con uno o más fármacos antineoplásicos citotóxicos ("agentes quimioterapéuticos" o "fármacos quimioterapéuticos") como parte de un régimen estandarizado. La quimioterapia puede administrarse con una intención curativa o puede tener como objetivo prolongar la vida o aliviar los síntomas. A menudo se usa junto con otros tratamientos para el cáncer, tales como radioterapia, cirugía y/o terapia de hipertermia. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales actúan mediante la destrucción de las células que se dividen rápidamente, una de las propiedades principales de la mayoría de las células cancerosas. Esto significa que la quimioterapia daña además las células que se dividen rápidamente en circunstancias normales: células en la médula ósea, tracto digestivo y folículos pilosos. Esto resulta en los efectos secundarios más comunes de la quimioterapia: mielosupresión (disminución de la producción de células sanguíneas, por lo tanto también inmunosupresión), mucositis (inflamación del revestimiento del tracto digestivo) y alopecia (pérdida del cabello).

Algunos fármacos contra el cáncer más nuevos (por ejemplo, diversos anticuerpos monoclonales) no son citotóxicos indiscriminadamente, sino que mas bien se dirigen a proteínas que se expresan anormalmente en las células cancerosas y que son esenciales para su crecimiento. Dichos tratamientos con frecuencia se denominan "terapia dirigida" (a diferencia de la quimioterapia clásica) y con frecuencia se usan conjuntamente con los agentes quimioterapéuticos tradicionales en los regímenes de tratamiento antineoplásico.

Los tipos de fármacos quimioterapéuticos clásicos a los que se refieren los términos "fármacos quimioterapéuticos" y "quimioterapia", como se usa en la presente, son:

Agentes alquilantes: Los agentes alquilantes son el grupo más antiguo de quimioterapéuticos en uso hoy en día. Se llaman así debido a su capacidad para alquilar muchas moléculas, lo que incluye las proteínas, el ARN y el ADN. Esta capacidad para unirse covalentemente al ADN o ARN a través de su grupo alquilo es la causa principal de sus efectos contra el cáncer. Esto conduce a una forma de muerte celular programada llamada apoptosis. Los agentes alquilantes funcionarán en cualquier punto del ciclo celular y, por lo tanto, se conocen como fármacos independientes del ciclo celular. Por esta razón, el efecto sobre la célula depende de la dosis; la fracción de células que mueren es proporcional directamente a la dosis de fármaco. Los subtipos de agentes alquilantes son las mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, tetrazinas, aziridinas, cisplatino y derivados, y agentes alquilantes no clásicos. Las mostazas nitrogenadas incluyen mecloretamina, ciclofosfamida, melfalán, clorambucilo, ifosfamida y busulfán. Las nitrosoureas incluyen N-nitroso-N-metilurea (MNU), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y semustina (MeCCNU), fotemustina y estreptozotocina. Las tetrazinas incluyen dacarbazina, mitozolomida y temozolomida. Las aziridinas incluyen tiotepa, micomicina y diaziquona (AZQ). El cisplatino y sus derivados incluyen cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Ellos deterioran la función celular mediante la formación de enlaces covalentes con los grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo y fosfato en moléculas importantes biológicamente. Los agentes alquilantes no clásicos incluyen procarbazina y hexametilmelamina. La mafosfamida es un agente alquilante oxazafosforina (similar a la ciclofosfamida) que se investiga como fármaco quimioterapéutico.

Antimetabolitos: Los términos "antimetabolitos" e "inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN", como se usan en la presente descripción, tienen un significado intercambiable y se definen como un grupo de moléculas que impiden la síntesis de ADN y ARN. Muchos de ellos tienen una estructura similar a las unidades estructurales de ADN y ARN. Los antimetabolitos se parecen a nucleobases o nucleósidos, pero tienen grupos químicos alterados. Estos fármacos ejercen su efecto ya sea mediante el bloqueo de las enzimas requeridas para la síntesis de ADN o mediante su incorporación al ADN o ARN. Mediante la inhibición de las enzimas involucradas en la síntesis de ADN, estos impiden la mitosis porque el ADN no puede duplicarse a sí mismo. Además, después de la incorporación errónea de las moléculas

en el ADN, puede producirse daño en el ADN y se induce la muerte celular programada (apoptosis). A diferencia de los agentes alquilantes, los antimetabolitos son dependientes del ciclo celular. Esto significa que sólo funcionan durante una parte específica del ciclo celular, en este caso la fase S (la fase de síntesis del ADN). Por esta razón, a una determinada dosis, se produce el efecto meseta y proporcionalmente no se produce más muerte celular con el aumento de las dosis.

Los subtipos de los antimetabolitos son los antifolatos, fluoropirimidinas, análogos de desoxinucleósidos y tiopurinas. Los antifolatos incluyen metotrexato y pemetrexed. Las fluoropirimidinas incluyen fluorouracilo y capecitabina. El fluorouracilo es un análogo de nucleobases que se metaboliza en las células para formar al menos dos productos activos: 5-fluorouridina monofosfato (FUMP) y 5-fluoro-2'-deoxiuridina 5'-fosfato (FdUMP). La FUMP se incorpora al ARN y la FdUMP inhibe la enzima timidilato sintasa; ambas conducen a la muerte celular. La capecitabina es un profármaco de 5-fluorouracilo que se descompone en las células para producir el fármaco activo. Los análogos de desoxinucleósidos incluyen citarabina, gemcitabina, decitabina, vidaza, fludarabina, nelarabina, cladribina, clofarabina y pentostatina. Las tiopurinas incluyen tioguanina y mercaptopurina.

Agentes antimicrotúbulos: Los agentes antimicrotúbulos son productos químicos derivados de plantas que bloquean la división celular al impedir la función de los microtúbulos. Los alcaloides de la vinca y los taxanos son los dos grupos principales de agentes antimicrotúbulos. Los alcaloides de la vinca impiden la formación de los microtúbulos, mientras que los taxanos impiden el desmontaje de los microtúbulos. Al hacer esto, impiden que las células cancerosas completen la mitosis. Después de esto, se produce la detención del ciclo celular, lo cual induce la muerte celular programada (apoptosis). Los alcaloides de la vinca se derivan del bígaro de Madagascar, *Catharanthus roseus*. Los taxanos son fármacos naturales y semisintéticos. El primer fármaco de su clase, paclitaxel, se extrajo originalmente del árbol de tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia*. Ahora, este fármaco y otro de esta clase, docetaxel, se producen semisintéticamente a partir de un químico que se encuentra en la corteza de otro árbol de tejo: *Taxus baccata*. Estos fármacos promueven la estabilidad de los microtúbulos, lo que impide su desmontaje. Docetaxel ejerce su efecto durante la fase S.

Inhibidores de la topoisomerasa: Los inhibidores de la topoisomerasa son fármacos que afectan la actividad de dos enzimas: topoisomerasa I y topoisomerasa II. Cuando la hélice bicatenaria del ADN se desenrolla, por ejemplo, durante la replicación o traslación del ADN, el ADN adyacente sin abrir se tensa (superenrolla), como cuando se abre la mitad de una cuerda torcida. El estrés causado por este efecto se ayuda en parte por las enzimas topoisomerasas. Estas producen roturas monocatenarias o bicatenarias en el ADN, lo que reduce la tensión en la cadena de ADN. Esto permite que se produzca el desenrollamiento normal del ADN durante la replicación o la traducción. La inhibición de la topoisomerasa I o II interfiere con ambos procesos. Dos inhibidores de la topoisomerasa I, el irinotecán y el topotecán, se derivan semisintéticamente de la camptotecina, la cual se obtiene del árbol ornamental chino *Camptotheca acuminata*. Los fármacos que tienen como objetivo a la topoisomerasa II pueden dividirse en dos grupos. Los venenos de la topoisomerasa II causan niveles elevados de enzimas unidas al ADN. Esto impide la replicación y traducción del ADN, causa roturas de la cadena de ADN y conduce a la muerte celular programada (apoptosis). Estos agentes incluyen etopósido, doxorubicina, mitoxantrona y tenipósido. El segundo grupo, los inhibidores catalíticos, son fármacos que bloquean la actividad de la topoisomerasa II y, por lo tanto, impiden la síntesis y traducción del ADN porque el ADN no puede desenrollarse correctamente. Este grupo incluye novobiocina, merbarona y aclarrubicina.

Antibióticos citotóxicos: Los antibióticos citotóxicos son un grupo variado de fármacos que tienen diversos mecanismos de acción. El grupo incluye las antraciclinas y otros fármacos, lo que incluye actinomicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina. La doxorubicina y la daunorrubicina fueron las dos primeras antraciclinas, y se obtuvieron a partir de la bacteria *Streptomyces peucetius*. Los derivados de estos compuestos incluyen epirubicina e idarrubicina. Otros fármacos usados clínicamente en el grupo de la antraciclina son pirarubicina, aclarrubicina y mitoxantrona. Los mecanismos de las antraciclinas incluyen el intercalamiento del ADN (inserción de moléculas entre las dos cadenas de ADN), la generación de radicales libres altamente reactivos que dañan las moléculas intercelulares, y la inhibición de la topoisomerasa. La actinomicina es una molécula compleja que intercala el ADN e impide la síntesis de ARN. La bleomicina, un glucopéptido aislado de *Streptomyces verticillus*, también intercala el ADN, pero produce radicales libres que dañan el ADN. Esto se produce cuando la bleomicina se une a un ión metálico, se reduce químicamente y reacciona con el oxígeno. La mitomicina es un antibiótico citotóxico con la capacidad de alquilar el ADN.

La quimioterapia combinada implica tratar a un paciente con varios fármacos diferentes simultáneamente. Los fármacos difieren en su mecanismo y efectos secundarios. La mayor ventaja es minimizar las posibilidades de que se desarrolle resistencia a cualquier agente. Además, los fármacos a menudo pueden usarse en dosis más bajas, lo que reduce la toxicidad. Un ejemplo prominente es la combinación de doxorubicina y ciclofosfamida (A/C).

La "resistencia a la quimioterapia" se produce cuando el tratamiento no inhibe o destruye las células cancerosas, al menos a la concentración aplicada. En otras palabras, las células cancerosas resisten los efectos de la quimioterapia. El término "sensibilidad a la quimioterapia" tiene un significado correspondiente.

El término "biomarcador" o "marcador" se difunde mucho en la técnica y puede denotar ampliamente una molécula biológica y/o una porción detectable de esta (por ejemplo, un ácido nucleico, un péptido o un lípido tal como un glicolípido) cuya evaluación cualitativa y/o cuantitativa en un individuo es predictiva o informativa (por ejemplo, predictiva, diagnóstica y/o pronóstica) con respecto a uno o más aspectos del fenotipo y/o genotipo del individuo, tal como, por ejemplo, con respecto al estado del individuo. Por ejemplo, el biomarcador es predictivo o informativo con

respecto al resultado del tratamiento quimioterapéutico de un cáncer en un individuo. Se expresa un biomarcador ("expresión del biomarcador") si el biomarcador es detectable con métodos conocidos en la técnica. Por lo tanto, la expresión de biomarcadores abarca no solo la expresión a nivel de ácido nucleico (ADN y/o ARN) y a nivel de proteína, sino también la expresión (presencia) de otras estructuras biológicas en o dentro de las células, tales como los glicolípidos o la actividad de una proteína.

Como se usa en la presente descripción, los términos "paciente" e "individuo" se usan de manera intercambiable para referirse a un animal. Preferentemente, el individuo es un mamífero tal como ratón, rata, vaca, cerdo, cabra, gallina, perro, mono o humano. Con mayor preferencia, el individuo es un ser humano.

El término "etiqueta" como se usa en la presente descripción se refiere al acoplamiento del fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de este, a otras moléculas, por ejemplo, partículas, enzimas o fragmentos de enzimas (para la detección basada en enzimas de la unión a anticuerpos), fluoróforos, haptenos como la biotina, o superficies más grandes, tales como placas de cultivo y placas de microtitulación. En algunos casos, el acoplamiento resulta en la inmovilización directa del fragmento de unión a antígeno, por ejemplo, si el fragmento de unión a antígeno se acopla a una superficie más grande de una placa de cultivo. En otros casos este acoplamiento

resulta en la inmovilización indirecta, por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno acoplado directa o indirectamente (a través de, por ejemplo, biotina) a una perla magnética se inmoviliza si dicha perla se retiene en un campo magnético. En otros casos, el acoplamiento del fragmento de unión a antígeno a otras moléculas no resulta en una inmovilización directa o indirecta, pero permite el enriquecimiento, la separación, el aislamiento y la detección de células de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, si el fragmento de unión a antígeno se acopla a un fluoróforo, lo cual permite después discriminar entre células marcadas y células no marcadas, por ejemplo, a través de métodos de citometría de flujo, como FACS sorting, o microscopía de fluorescencia.

El término "fragmento de unión a antígeno" como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier resto que se une preferentemente a la molécula objetivo deseada de la célula, es decir, el antígeno.

El término "resto" comprende, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El término "anticuerpo", como se usa en la presente descripción, se refiere a anticuerpos policlonales o monoclonales, los cuales pueden generarse mediante métodos que se conocen bien por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede ser de cualquier especie, por ejemplo, murino, de rata, oveja y humano. Para fines terapéuticos, si van a usarse fragmentos de unión a antígeno no humanos, estos pueden humanizarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Además, los anticuerpos pueden ser anticuerpos modificados (por ejemplo, oligómeros, anticuerpos reducidos, oxidados y marcados).

El término "anticuerpo" comprende tanto moléculas intactas como fragmentos de anticuerpos, tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv y anticuerpos de cadena sencilla. Adicionalmente, el término "fragmento de unión al antígeno" incluye cualquier resto diferente de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen preferentemente a la molécula objetivo deseada de la célula. Los restos adecuados incluyen, sin limitación, oligonucleótidos conocidos como aptámeros que se unen a moléculas objetivo deseadas, carbohidratos, lectinas o cualquier otra proteína de unión a antígeno (por ejemplo, interacción receptor-ligando). El enlace (acoplamiento) entre el anticuerpo y la etiqueta o partícula puede ser covalente o no covalente. Un enlace covalente puede ser, por ejemplo, el enlace a grupos carboxilo en perlas de poliestireno, o a grupos NH₂ o SH₂ en perlas modificadas. Un enlace no covalente es, por ejemplo, a través de biotina-avidina o una partícula acoplada a fluoróforo unida al anticuerpo antifluoróforo. Los métodos para acoplar anticuerpos a partículas, fluoróforos, haptenos como la biotina o superficies más grandes, tales como placas de cultivo, se conocen bien por los expertos en la técnica.

Modalidades

En una modalidad de la presente descripción, se logra una muestra a analizar mediante una biopsia, por ejemplo, una biopsia por punción, un aspirado con aguja fina, o una extirpación quirúrgica del tumor o partes del tumor. Después, la muestra se procesa por disociación a una suspensión de células individuales para medir la expresión de SSEA4 o ST3GAL2 o la actividad de ST3GAL2. Como una alternativa, la muestra se fija y puede o no usarse para preparar secciones, por ejemplo, secciones fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE, por sus siglas en inglés), antes de medir la expresión de SSEA4 o ST3GAL2. Como una alternativa, la muestra se lisa directamente para aislar ácidos nucleicos o proteínas a partir de la muestra para medir la expresión de SSEA4 o ST3GAL2. En todos los casos, el procesamiento de la muestra puede o no puede contener una etapa de separación de células, por ejemplo, por citometría de flujo de clasificación magnética. La separación celular o el enriquecimiento celular de células cancerosas puede realizarse mediante el uso de fragmentos de unión a antígeno (anticuerpos) contra marcadores tumorales tales como EPCAM, CD34, CD99, CD117, CA15-3, MUC16, MUC1, ErbB2/HER2, PSMA o MCSP.

En una modalidad de la presente descripción, se proporciona una muestra a analizar de un paciente que padece un cáncer, es decir, cáncer de mama humano. La determinación de la presencia (expresión) de SSEA4 en la muestra de prueba se realiza mediante el uso de un fragmento de unión a antígeno, tal como un anticuerpo monoclonal contra

SSEA4, el cual se marca con una etiqueta tal como un fluoróforo. La presencia (detección) de SSEA4 en las células de la muestra a analizar, determinada, por ejemplo, por citometría de flujo o microscopía de fluorescencia, es indicativa de un mal pronóstico asociado con la resistencia a la quimioterapia, es decir, el cáncer de mama del paciente es resistente al tratamiento quimioterapéutico, tal como A/C.

5

En una modalidad, la muestra de prueba indica que más del 50 % de las células cancerosas expresan SSEA4. En tal caso, el paciente tiene un riesgo alto de que el tumor sea resistente a la quimioterapia.

10

En una modalidad de la presente descripción, se proporciona una muestra a analizar de un paciente que padece un cáncer, es decir, RCC. La detección del nivel de expresión (a nivel de proteína) de ST3GAL2 en la muestra de prueba se realiza mediante el uso de un fragmento de unión a antígeno tal como un anticuerpo monoclonal contra ST3GAL2, el cual se marca con una etiqueta tal como un fluoróforo. Las células de la muestra se permeabilizan y se marcan con el anticuerpo anti-ST3GAL2. Las células de un individuo que no padece ningún cáncer se usan como células de referencia. Como una alternativa, el tejido sano del paciente se usa como referencia. Además, estas células son permeabilizadas y marcadas con el anticuerpo anti-ST3GAL2. El nivel de expresión de ST3GAL2 en estas células de referencia se usa como nivel control. Un aumento del nivel de expresión (nivel de proteína) de ST3GAL2 en las células de la muestra a analizar en comparación con el nivel de expresión (nivel de proteína) de ST3GAL2 de las células de referencia (nivel control), determinado, por ejemplo, por citometría de flujo, es indicativo de un mal pronóstico, es decir, el RCC del paciente es resistente al tratamiento quimioterapéutico, tal como A/C.

20

En una modalidad, la muestra de prueba indica un aumento del nivel de expresión (nivel de proteína) de ST3GAL2 de las células cancerosas en más del 50 % en comparación con el nivel control (células de referencia). En tal caso, el paciente tiene un riesgo alto de que el tumor sea resistente a la quimioterapia.

25

En una modalidad de la presente descripción, se proporciona una muestra a analizar de un paciente que padece un cáncer, es decir, cáncer de ovario. La detección del nivel de expresión (en el nivel de ácido nucleico) de ST3GAL2 en la muestra de prueba se realiza, por ejemplo, mediante el uso de análisis de hibridación de transferencia de Northern, ensayos de PCR basados en transcripción inversa, micromatrices de ARN o micromatrices de ADN. Las células de la muestra se lisan y los ácidos nucleicos, por ejemplo, ARNm o ARN total, se aíslan. En algunos ensayos, esta etapa de aislamiento puede no ser necesaria, por ejemplo, PCR directa sobre las células lisadas. Las células de un individuo que no padece ningún cáncer se usan como células de referencia. Como una alternativa, el tejido sano del paciente se usa como referencia y los ácidos nucleicos, por ejemplo, ARNm o ARN total, se aíslan. En algunos ensayos, esta etapa de aislamiento puede no ser necesaria, por ejemplo, PCR directa sobre las células lisadas. El nivel de expresión de ST3GAL2 en estas células de referencia se usa como nivel control. Un aumento del nivel de expresión (nivel de ácido nucleico) de ST3GAL2 en las células de la muestra a analizar en comparación con el nivel de expresión (nivel de ácido nucleico) de ST3GAL2 de las células de referencia (nivel control), determinado, por ejemplo, por PCR, es indicativo de un mal pronóstico, es decir, el cáncer de ovario del paciente es resistente al tratamiento quimioterapéutico, tal como A/C.

40

En una modalidad, la muestra de prueba indica un aumento del nivel de expresión (nivel de ácido nucleico) de ST3GAL2 de las células cancerosas en más del 50 % en comparación con el nivel control (células de referencia). En tal caso, el paciente tiene un riesgo alto de que el tumor sea resistente a la quimioterapia.

45

En una modalidad de la presente descripción, se proporciona una muestra a analizar de un paciente que padece un cáncer, es decir, cáncer de mama. La detección del nivel de expresión (en el nivel de lípidos o proteínas) de SSEA4 o ST3GAL2 en la muestra de prueba se realiza, por ejemplo, mediante el uso de análisis de hibridación de transferencia de Western, ELISA, o micromatrices de proteínas. Las células de la muestra se lisan y las proteínas se aíslan. En algunos ensayos, esta etapa de aislamiento puede no ser necesaria, por ejemplo, análisis directo de las células lisadas. Las células de un individuo que no padece ningún cáncer se usan como células de referencia. Como una alternativa, el tejido sano del paciente se usa como referencia y las proteínas se aíslan. En algunos ensayos, esta etapa de aislamiento puede no ser necesaria, por ejemplo, análisis directo de las células lisadas. El nivel de expresión de SSEA4 o ST3GAL2 en estas células de referencia se usa como nivel control. Un aumento del nivel de expresión de SSEA4 o ST3GAL2 en las células de la muestra a analizar en comparación con el nivel de expresión de SSEA4 o ST3GAL2 de las células de referencia (nivel control), determinado por ejemplo, por ELISA, es indicativo de un mal pronóstico, es decir, el cáncer de mama del paciente es resistente al tratamiento quimioterapéutico tal como A/C.

55

En una modalidad, la muestra de prueba indica un aumento del nivel de expresión de SSEA4 o ST3GAL2 de las células cancerosas de más del 50 % en comparación con el nivel control (células de referencia). En tal caso, el paciente tiene un riesgo alto de que el tumor sea resistente a la quimioterapia.

60

En una modalidad de la presente descripción, se proporciona una muestra a analizar de un paciente que padece un cáncer, es decir, cáncer de mama. La detección del nivel de actividad de ST3GAL2 en la muestra de prueba se realiza, por ejemplo, por ELISA o ensayos de recambio de sustrato. Las células de la muestra se lisan y las proteínas se aíslan. En algunos ensayos, esta etapa de aislamiento puede no ser necesaria, por ejemplo, análisis directo de las células lisadas. Las células de un individuo que no padece ningún cáncer se usan como células de referencia. Como una alternativa, el tejido sano del paciente se usa como referencia y las proteínas se aíslan. En algunos ensayos, esta etapa

65

de aislamiento puede no ser necesaria, por ejemplo, análisis directo de las células lisadas. El nivel de actividad de ST3GAL2 en estas células de referencia se usa como nivel control. Un aumento del nivel de actividad de ST3GAL2 en las células de la muestra a analizar en comparación con el nivel de actividad de ST3GAL2 de las células de referencia (nivel control), determinado, por ejemplo, por ELISA, es indicativo de un mal pronóstico, es decir, el cáncer de mama del paciente es resistente al tratamiento quimioterapéutico, tal como A/C.

En una modalidad, la muestra de prueba indica un aumento del nivel de actividad de ST3GAL2 de las células cancerosas de más del 50 % en comparación con el nivel control (células de referencia). En tal caso, el paciente tiene un riesgo alto de que el tumor sea resistente a la quimioterapia.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se destinan a una explicación más detallada de la invención pero sin restringir la invención a estos ejemplos.

Ejemplo 1: La expresión de 23 marcadores de superficie celular en xenoinjertos de cáncer de mama derivados de pacientes se afecta por el tratamiento quimioterapéutico

Se realizó un cribado de anticuerpos para identificar nuevos biomarcadores de superficie celular para subpoblaciones de cáncer de mama que muestran un aumento de la resistencia al tratamiento quimioterapéutico. El cribado se basó en una biblioteca de 45 anticuerpos dirigidos contra proteínas de superficie humanas (Tabla 1).

Estos candidatos a anticuerpos se han seleccionado en base a nuestra experiencia para expresarse en subpoblaciones de células tumorales. Se injertaron piezas de tejido de tumor de mama derivado del paciente en una cohorte de ratones (50 a 100 animales por modelo de tumor). Se demostró que estos modelos tumorales conservan la morfología, las características moleculares y el perfil de respuesta farmacológica de los tumores originales del paciente (Marangoni y otros, Clin Cancer Res 13, 3989 - 3998 (2007)). Tras el establecimiento estable de los tumores (etapa de pretratamiento), indicado por volúmenes de tumor de 150-350 mm³, comenzamos el tratamiento mediante el uso de una combinación de doxorubicina/ciclofosfamida (A/C) de cuidado estándar. Después de que el tumor se redujo a volúmenes de 14 - 63 mm³, se extirparon los nódulos (etapa de tumores residuales). El mismo día, se extirparon los tumores de los ratones no tratados (etapa sin tratamiento) para servir como controles directos. Además, se mantuvo un grupo de animales con tumores residuales hasta que la enfermedad recayó a volúmenes similares a los de la etapa de pretratamiento (etapa de rebrote, Figura 1). Después de extirpar los tumores en los puntos temporales específicos, el tejido se disoció suavemente para obtener una suspensión de células individuales mientras se preservaban los epítomos de la superficie celular para excluir un sesgo inducido por el protocolo. Subsecuentemente, la muestra se tiñó para los marcadores específicos de ratón para excluir las células de origen murino del análisis, así como también para los candidatos de cribado y se analizó mediante citometría de flujo multiparamétrica (Figura 2). Los tumores de cuatro pacientes con cáncer de mama diferentes se analizaron independientemente. En total, la expresión de 13 marcadores (2 a 9 por modelo de tumor) se enriqueció y la expresión de 10 marcadores (1 a 5 por modelo de tumor) disminuyó durante la quimioterapia (Figura 3). Interesantemente, el 87 % (20 de 23) de estos marcadores regresó a su nivel de expresión basal como se observó en la etapa sin tratamiento tras la regresión de la enfermedad (etapa de rebrote, Figura 3).

Tabla 1: Anticuerpos usados para el abordaje del cribado

Antígeno	Clon	Vendedor	Título
AN2/MCSP	1E6.4	Miltenyi Biotec	1:11
ABCB5	IgG de conejo policlonal	Bioss	1:50
CaSR	IgG de conejo policlonal	Enzo Life Science	1:50
CD9	M-L13	BD Biosciences	1:11
CD10	97C5	Miltenyi Biotec	1:11
CD15/SSEA1	VIMC6	Miltenyi Biotec	1:11
CD20	LT20	Miltenyi Biotec	1:11
CD24	32D12	Miltenyi Biotec	1:11
CD26	FR 10-11G9	Miltenyi Biotec	1:11
CD34	AC136	Miltenyi Biotec	1:11
CD38	IB6	Miltenyi Biotec	1:11

	CD44	DB105	Miltenyi Biotec	1:11
	CD49a	TS/27	BioLegend	1:20
5	CD49b	Y418	eBioscience	1:20
	CD49c	ASC-1	BioLegend	1:20
	CD49d	MZ18-24A9	Miltenyi Biotec	1:11
10	CD49e	NKI-SAM1	Miltenyi Biotec	1:11
	CD49f	GoH3	Miltenyi Biotec	1:11
	CD61	Y2/51	Miltenyi Biotec	1:11
15	CD66 (a,c,d,e)	TET2	Miltenyi Biotec	1:11
	CD71	AC102	Miltenyi Biotec	1:11
	CD90	DG3	Miltenyi Biotec	1:11
20	CD105 (Endoglin)	43A4E1	Miltenyi Biotec	1:11
	CD117	AC126	Miltenyi Biotec	1:11
	CD122	Tu27	BioLegend	1:11
25	CD133/1	W6B3C1	Miltenyi Biotec	1:11
	CD133/2	293C3	Miltenyi Biotec	1:11
	CD138	B-B4	Miltenyi Biotec	1:11
	CD146	541-10B2	Miltenyi Biotec	1:11
30	CD166	3A6	BioLegend	1:6
	CD271 (Receptor NGF)	ME20.4-1.H4	Miltenyi Biotec	1:11
	CD309 (KDR/VEGF-R2)	ES8-20E6	Miltenyi Biotec	1:11
35	CD324 (Ecad)	67A4	Miltenyi Biotec	1:11
	CD325 (Ncad)	8C11	eBioscience	1:11
	CD326 (EpCAM)	HEA-125	Miltenyi Biotec	1:11
40	CD338 (ABCG2)	5D3	BD Biosciences	1:20
	CD340 (Her2/neu)	24D2	BioLegend	1:20
	DRD5	IgG de conejo policlonal	Bioss	1:100
45	Lgr5 DA03	DA03	Miltenyi Biotec	1:11
	ROR1	2A2	Miltenyi Biotec	1:11
	Sca1	D7	Miltenyi Biotec	1:11
50	SSEA4	REA101	Miltenyi Biotec	1:11
	TGFbetaR	IgG de cabra policlonal	BD Biosciences	1:11
	TRA-1-60	REA157	Miltenyi Biotec	1:11
55	TRA-1-81	REA246	Miltenyi Biotec	1:11

El porcentaje de células que expresan CD146 se redujo en tres de cada cuatro modelos tumorales, lo que indica que es la subpoblación más sensible atacada durante el tratamiento de A/C. Sorprendentemente, identificamos una subpoblación de células tumorales que expresan el antígeno embrionario 4 específico de estadio (SSEA4) que se enriqueció fuertemente durante el tratamiento quimioterapéutico en todos los modelos tumorales analizados. Tanto CD44 como CD133, para los cuales ya se ha descrito una correlación con un fenotipo de células madre cancerosas y resistencia a fármacos, solo mostraron enriquecimiento en uno de los cuatro modelos.

Ejemplo 2: SSEA4 es un marcador para células resistentes al tratamiento quimioterapéutico

Para investigar más a fondo la importancia de la expresión de SSEA4 durante el tratamiento del cáncer de mama, repetimos el análisis de este marcador en tres de los modelos tumorales. Además, incluimos la etapa de pretratamiento

en el análisis para excluir cualquier cambio que pudiera inducirse por el punto temporal o el tamaño global del tumor. El número de células positivas para SSEA4 se enriqueció significativamente ($p < 0,001$, $n = 8$) tras el tratamiento con A/C en todos los tumores analizados (Figura 4). Además, en tres de cada cuatro modelos tumorales, la fracción de células positivas se redujo a los niveles basales después de que el tratamiento se detuvo y los tumores recayeron. En el modelo de tumor HBCx-17 observamos una sensibilidad reducida intrínseca para el tratamiento con A/C en 19 animales y un tumor que no respondió en absoluto al tratamiento. Interesantemente, la cantidad de células positivas para SSEA4 aumentó en estos tumores más resistentes (42,2 %) y totalmente resistentes (98,5 %) en comparación con los tumores sensibles (36,8 %) en la etapa de rebrote (datos no mostrados). Para evaluar si la resistencia intrínseca conocida de otros modelos tumorales se correlaciona también con la frecuencia de la población de células tumorales positivas para SSEA4, comparamos tumores de pacientes que son sensibles ($n = 6$) o resistentes ($n = 4$) al tratamiento con A/C. Sorprendentemente, tres de los cuatro modelos tumorales resistentes mostraron porcentajes más altos de células positivas para SSEA4 que todos los seis tumores sensibles (Figura 5). En dos de los modelos tumorales resistentes, casi todas las células expresaron SSEA4. Para evaluar si esta observación se limita al cáncer de mama o puede ser más general, analizamos el carcinoma de células renales de células claras (RCC), una entidad tumoral independiente que se muestra resistente intrínsecamente a la quimioterapia en más del 95 % de los pacientes (Cohen, Herbert T.; McGovern, Francis J. (2005), *New England Journal of Medicine* 353 (23): 2477-90). El RCC primario así como también el tejido renal sano del mismo paciente se disoció y se analizó para determinar la expresión de SSEA4. Sorprendentemente, en todos los pacientes analizados ($n = 3$), la expresión de SSEA4 aumentó fuertemente en el tejido tumoral, casi todas las células tumorales expresaron este marcador (Figura 6).

Para investigar más a fondo si las células que sobreviven a la quimioterapia regulan negativamente el SSEA4 durante el tratamiento o si las células ya positivas muestran un aumento de la resistencia intrínseca, tratamos líneas celulares que muestran fracciones variables de células positivas para SSEA4 con fármacos quimioterapéuticos *in vitro*. Una línea de células tumorales primarias derivada del modelo HBCx-17 mostró un crecimiento reproducible parcialmente en un fenotipo adherente y en uno en suspensión. Interesantemente, las células que crecieron en suspensión mostraron una expresión mayor de SSEA4 en comparación con las células adherentes (Figura 7). Para evaluar la sensibilidad de ambas subpoblaciones al tratamiento quimioterapéutico, determinamos los valores de CI50 ($n = 3$) para ocho fármacos usados comúnmente (Figura 7 y datos no mostrados). Para cinco de estos, cisplatino, mafosfamida, 5-fluorouracilo, doxorubicina y docetaxel, las células de la suspensión mostraron valores más altos de CI50, lo que indica un aumento de la resistencia a esos fármacos. Uno de los fármacos, etopósido, no mostró diferencias, y para dos moléculas, topotecán e irinotecán, se observaron valores de CI50 disminuidos de las células en suspensión. Etopósido, topotecán e irinotecán inhiben las enzimas topoisomerasa I y II, lo que causa por lo tanto roturas de ADN bicatenario. Por lo tanto, las células positivas para SSEA4 parecen ser más resistentes a los inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN, pero igual o menos resistentes a los inhibidores de la topoisomerasa.

Para examinar directamente el fenotipo de las células que sobrevivieron al tratamiento, otra línea celular adherente derivada puramente del modelo HBCx-17 se trató con concentraciones crecientes de mafosfamida, 4-hidroxíciclofosfamida o adriamicina® ($n = 4$). En todos los casos, la población sobreviviente mostró una fracción mayor significativamente de células positivas para SSEA4 (Figura 7).

Ejemplo 3: La expresión de SSEA4 indica un fenotipo mesenquimático

Los resultados del análisis de ARNm y de miARN indican claramente que la expresión de SSEA4 se correlaciona con un fenotipo más mesenquimático. Como se demostró que la EMT se correlaciona con la resistencia al fármaco (Ganapati V. Hegde y otros, *PLOS ONE* 2012, 7(10):e45647), quisimos examinar si aumenta además la expresión de SSEA4 tras la inducción de EMT. Para inducir una transición mesenquimática, la línea celular epitelial de mama MCF10A se trató con TGFβ1 a concentraciones de 10 y 20 ng/ml. Tras el tratamiento, casi todas las células cambiaron su morfología de un tipo de colonia compactada a una forma fibroblástica alargada (Figura 8). Marcadores clave de EMT conocidos anteriormente, como EpCAM, E-cadherina, vimentina y fibronectina, se regularon como se esperaba, lo que demuestra la eficiencia de la inducción de EMT mediante el uso de nuestro método (Figura 8 y datos no mostrados). Además, también se incrementó fuertemente el potencial invasivo de las células tratadas (datos no mostrados). Sorprendentemente, la fracción de células positivas para SSEA4 aumentó tras la inducción de EMT, lo que verifica la correlación entre la expresión de SSEA4 y un fenotipo más mesenquimático (Figura 8).

Ejemplo 4: SSEA4 y/o ST3GAL2 son marcadores de pronóstico significativos altamente en pacientes con cáncer de mama

Ya están disponibles enormes colecciones de datos de expresión génica con resultados clínicos emparejados de pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, debido a la naturaleza del epítipo SSEA4, su expresión no puede controlarse directamente mediante el perfilado del transcriptoma. Por lo tanto, evaluamos el valor pronóstico de su enzima sintetizadora ST3GAL2 en una gran base de datos pública de micromatrices clínicas de tumores de ovario de 2,977 pacientes (Gyorffy B y otros, *Breast Cancer Res Treatment*, 2010 Oct;123(3):725-31.). Cuando se usó el conjunto de datos completo, no se observaron diferencias en el resultado clínico, mientras que se encontraron diferencias significativas altamente ($p < 0,01$) hacia un pronóstico peor para los pacientes que expresan niveles altos de ST3GAL2 en los pacientes ER-, los pacientes PR- y los pacientes doble negativos con independencia del tratamiento (Figura 9). Cuando se centró en pacientes tratados con quimioterapia, se observó una reducción significativa altamente de la

supervivencia libre de recaída con independencia del subtipo de tumor ($p < 0,01$, HR 1,91), en pacientes RE- ($p < 0,01$, HR 2,97) y en pacientes doble negativos ($p < 0,01$, HR 3,08) (Figura 9). Esto apoya firmemente la importancia de SSEA4 y ST3GAL2 como marcadores de diagnóstico para predecir la resistencia a la quimioterapia y el resultado en todos los subtipos principales de cáncer de mama. No solo cuando se aplica la supervivencia libre de recaída como un punto final, sino también para la supervivencia libre de metástasis a distancia, los pacientes que expresan niveles altos de ST3GAL2 tuvieron un peor pronóstico, lo que indica un papel de la subpoblación positiva para SSEA4 también durante la metástasis (Figura 9).

Ejemplo 5: SSEA4/ST3GAL2 es un marcador de pronóstico significativo e indica resistencia a la quimioterapia en otras entidades tumorales

Para evaluar si esta observación se limita al cáncer de mama o puede ser más general, analizamos además el valor pronóstico de ST3GAL2 en una gran base de datos pública de micromatrices clínicas de tumores de ovario de 1,464 pacientes (Gyorffy B y otros, Endocrine-Related Cancer. 2012 Abr 10;19(2):197-208.). Ya al usar el conjunto de datos completo, se observó una diferencia significativa hacia un resultado clínico peor con respecto a la supervivencia libre de progresión ($p < 0,05$), así como también a la supervivencia posterior a la progresión ($p < 0,05$, Figura 10). Cuando se centró en pacientes tratados con quimioterapia, de nuevo el nivel de significación se aumentó fuertemente para ambos puntos finales ($p < 0,01$, Figura 10), lo que indica que el uso de SSEA4 y ST3GAL2 como marcadores de diagnóstico puede no limitarse al cáncer de mama.

Reivindicaciones

- 1 El uso de los biomarcadores SSEA4 y/o ST3GAL2 para evaluar el resultado del tratamiento quimioterapéutico de un cáncer en un individuo, en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario humano si el biomarcador es SSEA4 y en donde dicho cáncer es cáncer de mama humano si el biomarcador es ST3GAL2 y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicho tratamiento quimioterapéutico son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.
- 2 Un método para evaluar el pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia en un individuo que tiene un cáncer, el método comprende detectar la expresión de SSEA4 en una muestra de prueba del individuo en donde la expresión de SSEA4 en la muestra de prueba es indicativa de un mal pronóstico, y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano, carcinoma de células renales (RCC) y cáncer de ovario humano, y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.
- 3 El método de conformidad con la reivindicación 2, en donde la expresión de SSEA4 en más del 50 % de las células cancerosas de dicha muestra es indicativa de un mal pronóstico.
- 4 El método de conformidad con la reivindicación 2 o 3, en donde la expresión de SSEA4 se determina mediante la tinción con un anticuerpo o fragmento de este.
- 5 Un método para evaluar el pronóstico asociado a la resistencia a la quimioterapia en un individuo que tiene un cáncer, el método comprende a) detectar la expresión o el nivel de actividad de ST3GAL2 en una muestra del individuo b) comparar la expresión o el nivel de actividad detectada con un nivel control c) determinar dicho pronóstico en base a la comparación de b) en donde el nivel control es un nivel control de buen pronóstico y un aumento de la expresión o nivel de actividad en comparación con el nivel control se determina como mal pronóstico y en donde dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama humano y cáncer de ovario humano, y en donde los fármacos quimioterapéuticos usados en dicha quimioterapia son inhibidores de la síntesis y transcripción del ADN.
- 6 El método de conformidad con la reivindicación 5, en donde dicho aumento es al menos del 50 % en comparación con dicho nivel control.
- 7 El método de conformidad con la reivindicación 5 o 6, en donde dicha expresión de ST3Gal2 se determina a nivel de ARNm o nivel de proteína.
- 8 El método de conformidad con la reivindicación 5 o 6, en donde dicha actividad de la proteína ST3Gal2 se determina a nivel de proteína.

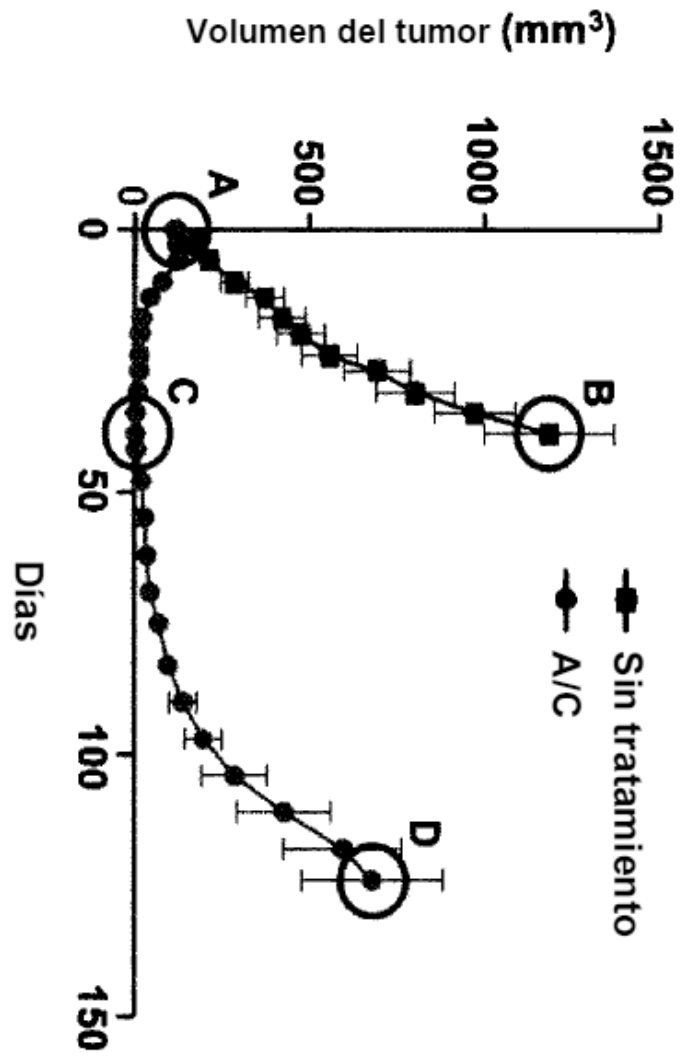


Figura 1

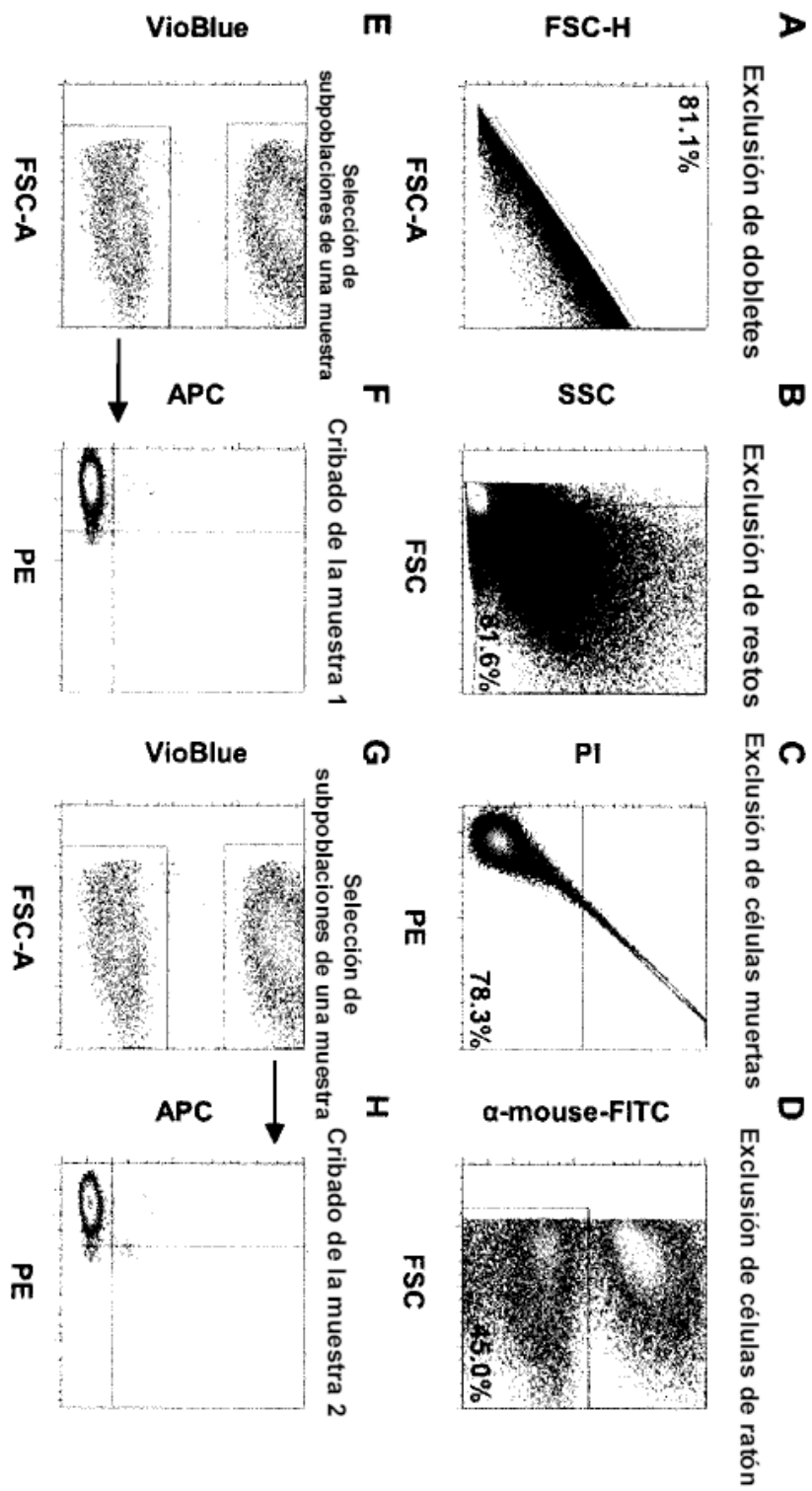


Figura 2

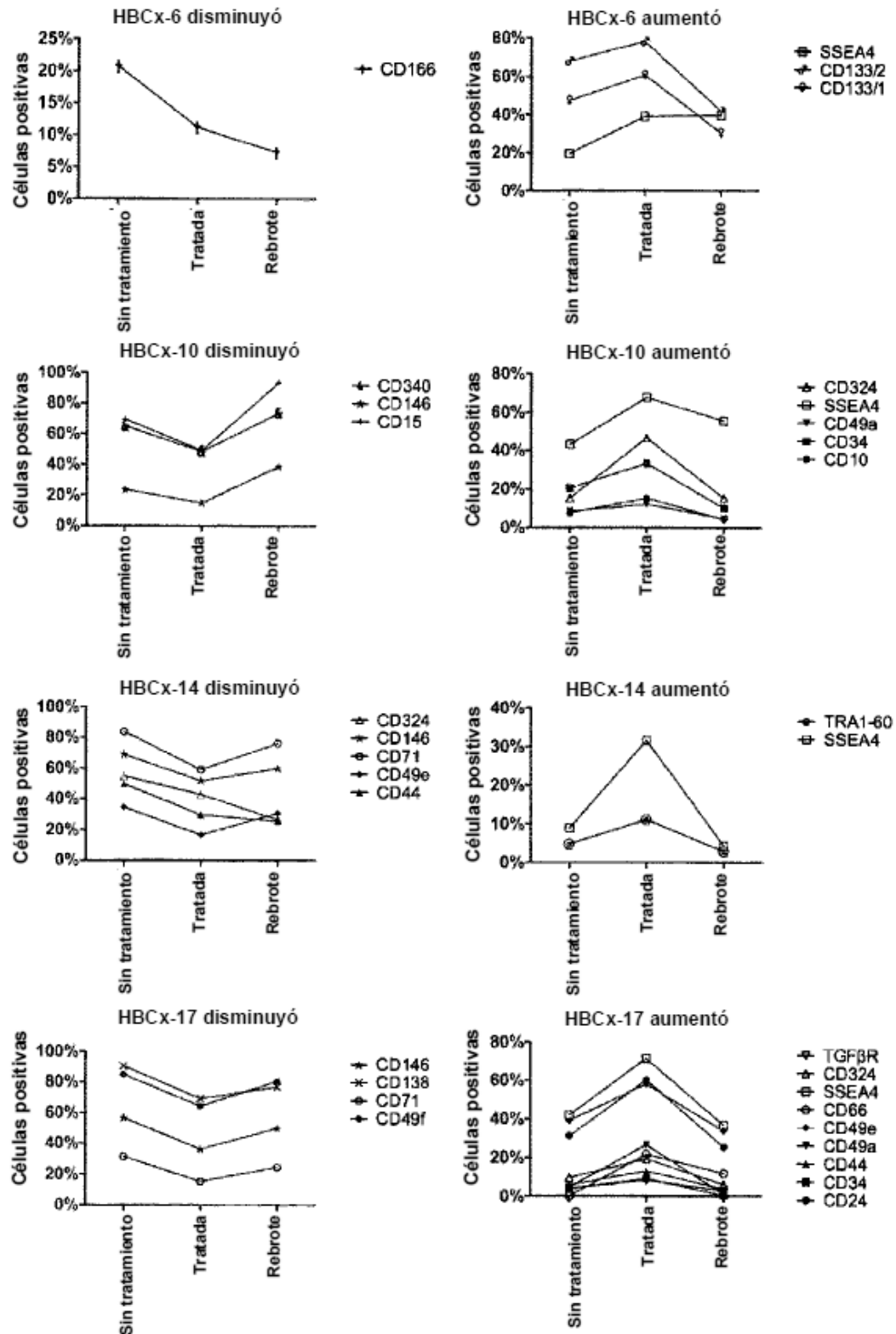


Figura 3

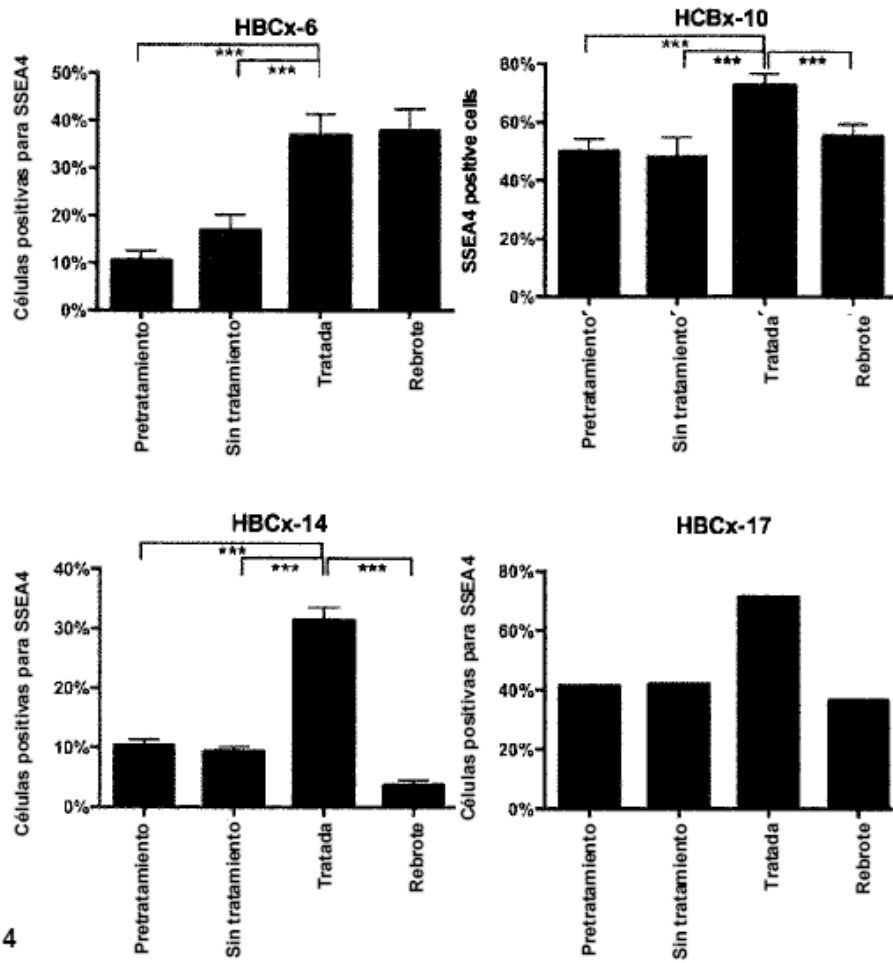


Figura 4

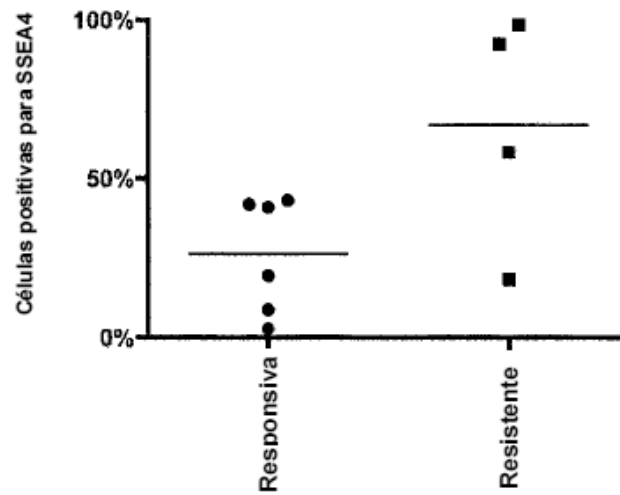


Figura 5

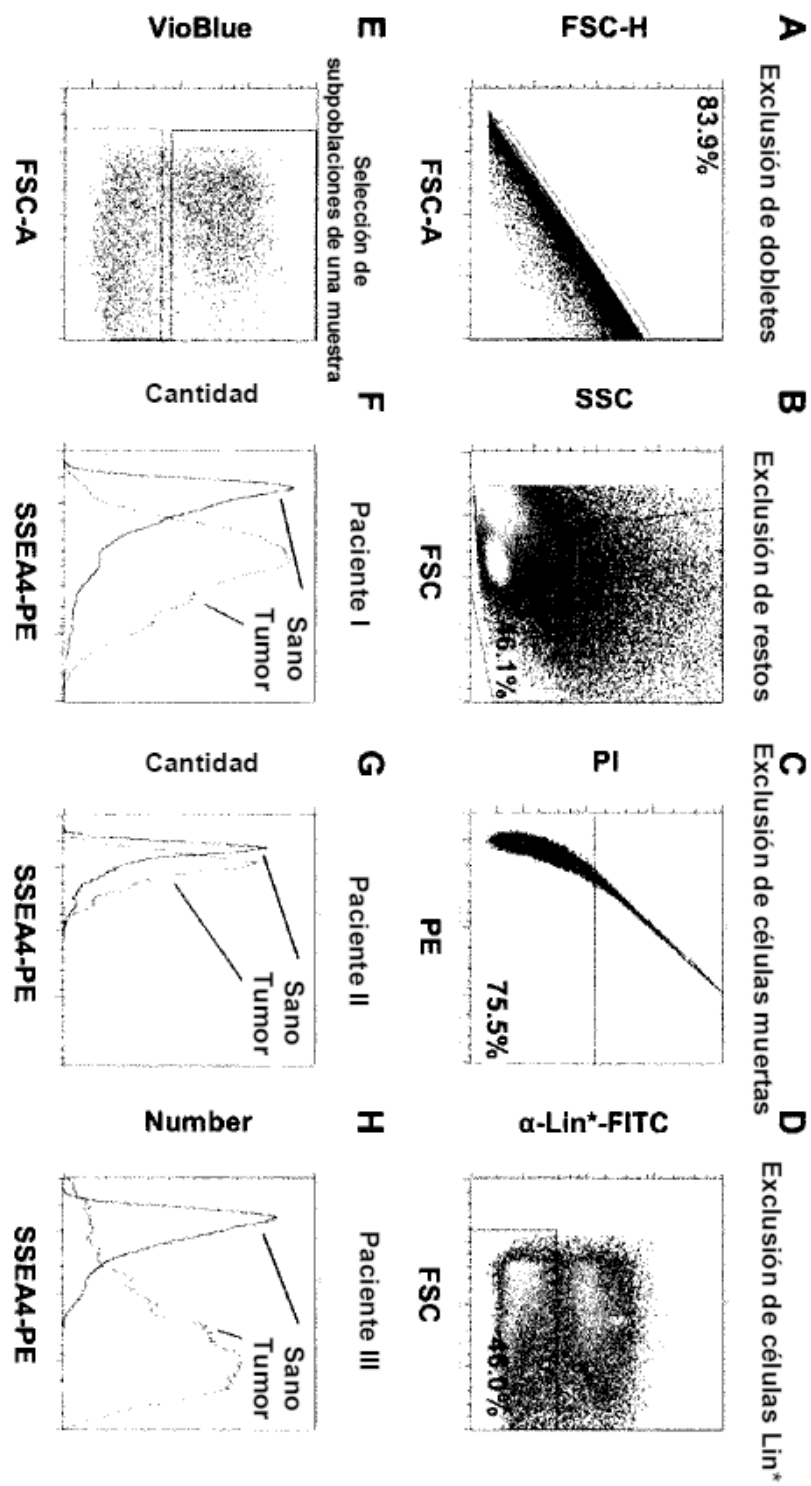


Figura 6

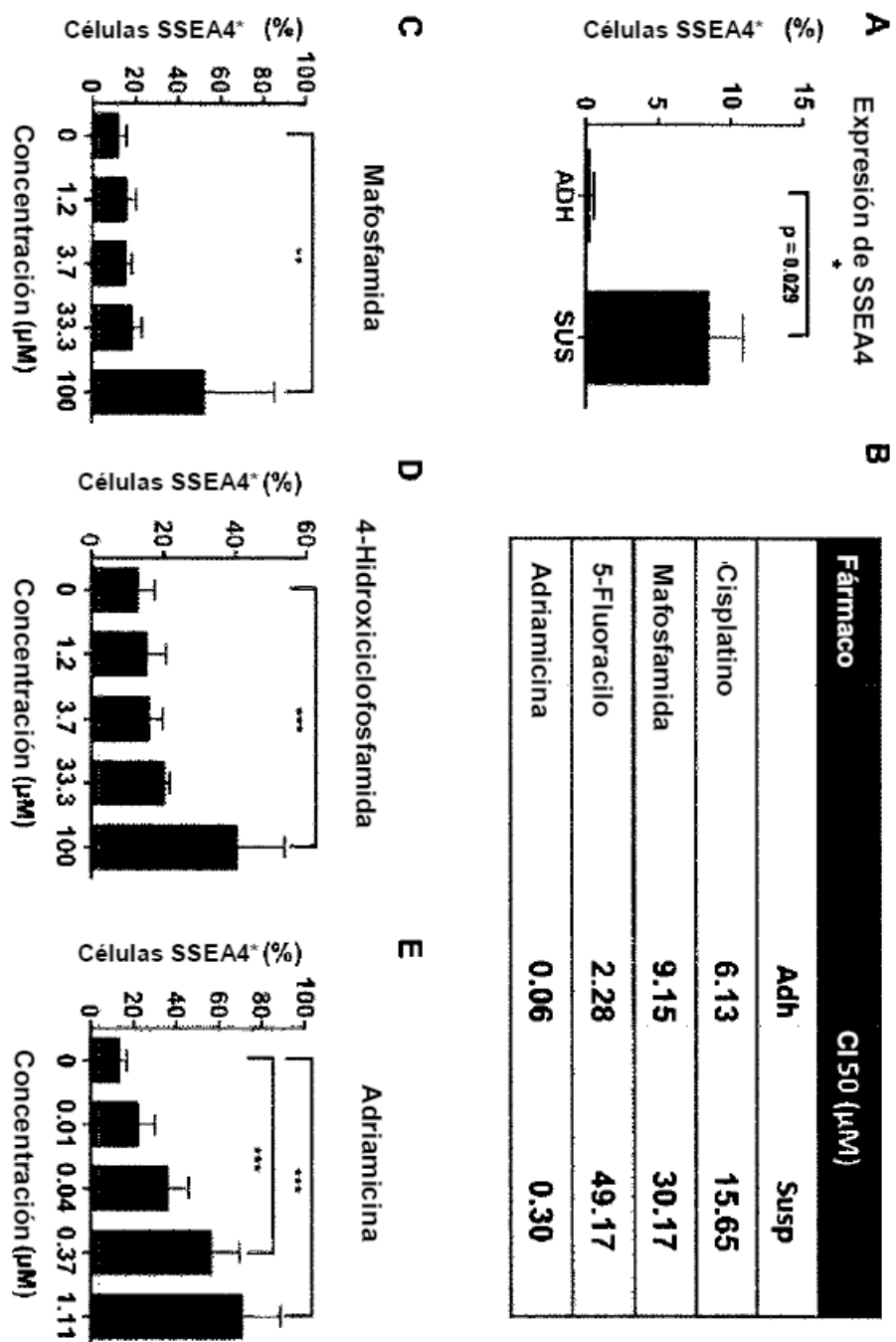


Figura 7

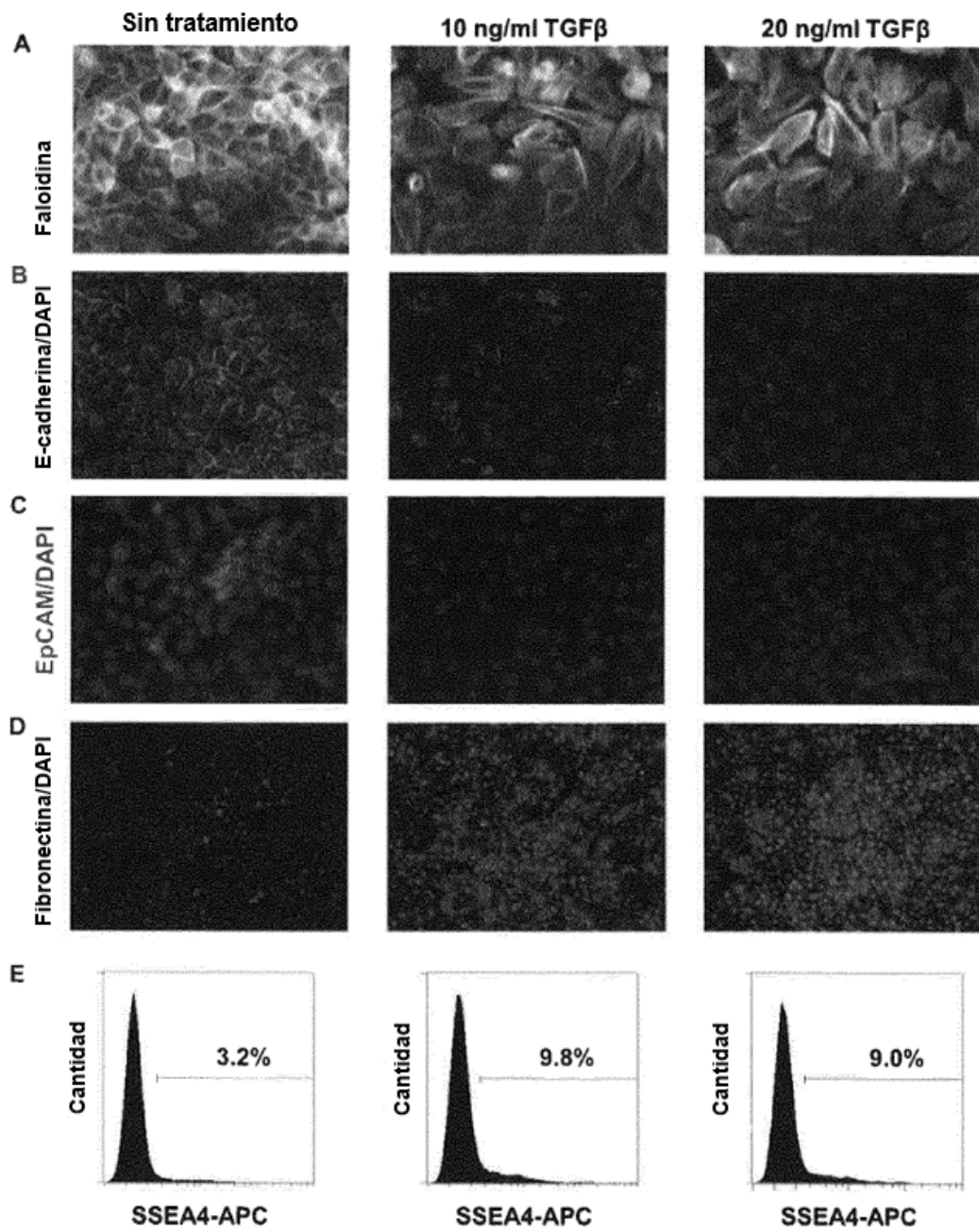


Figura 8

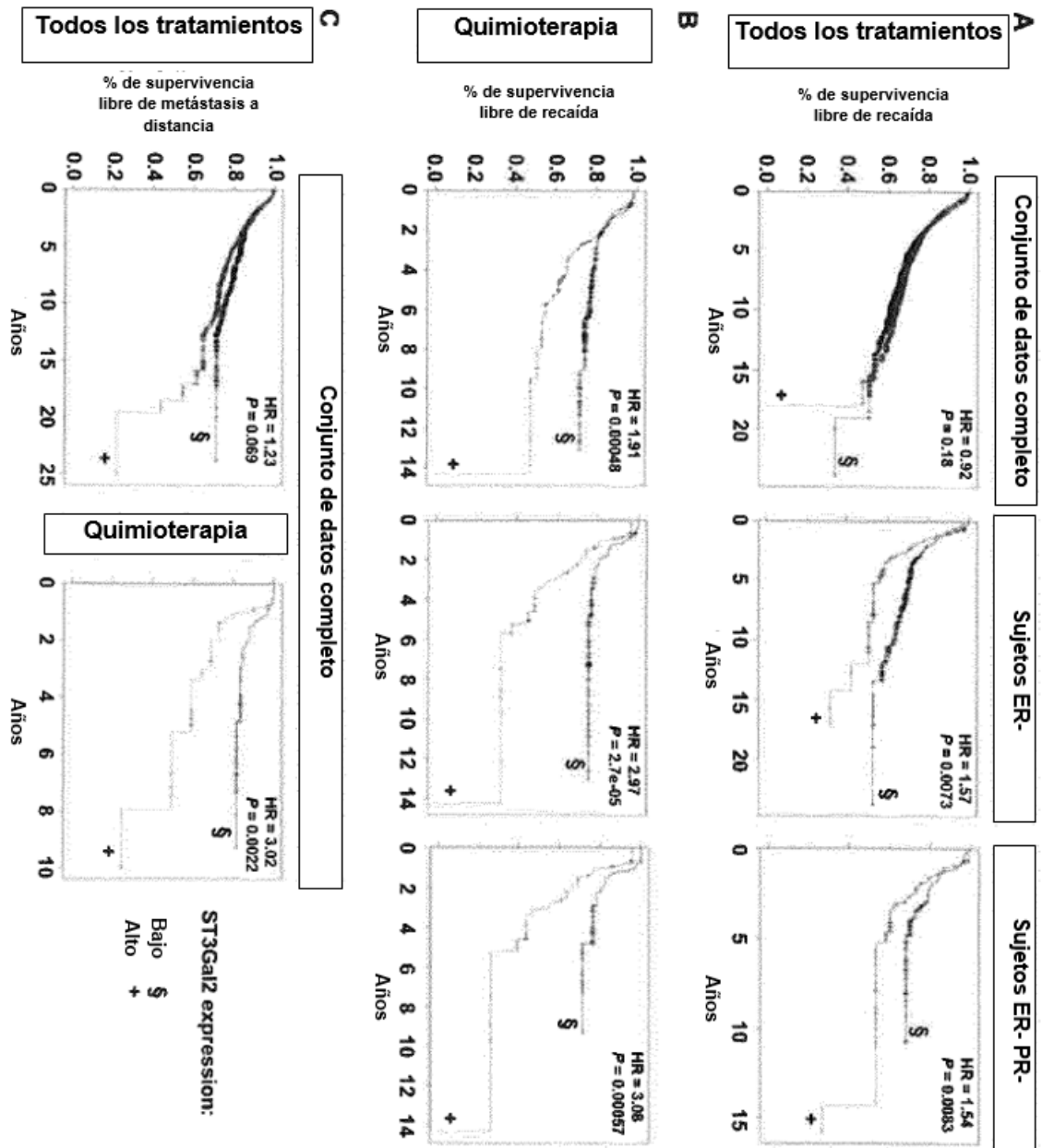


Figura 9

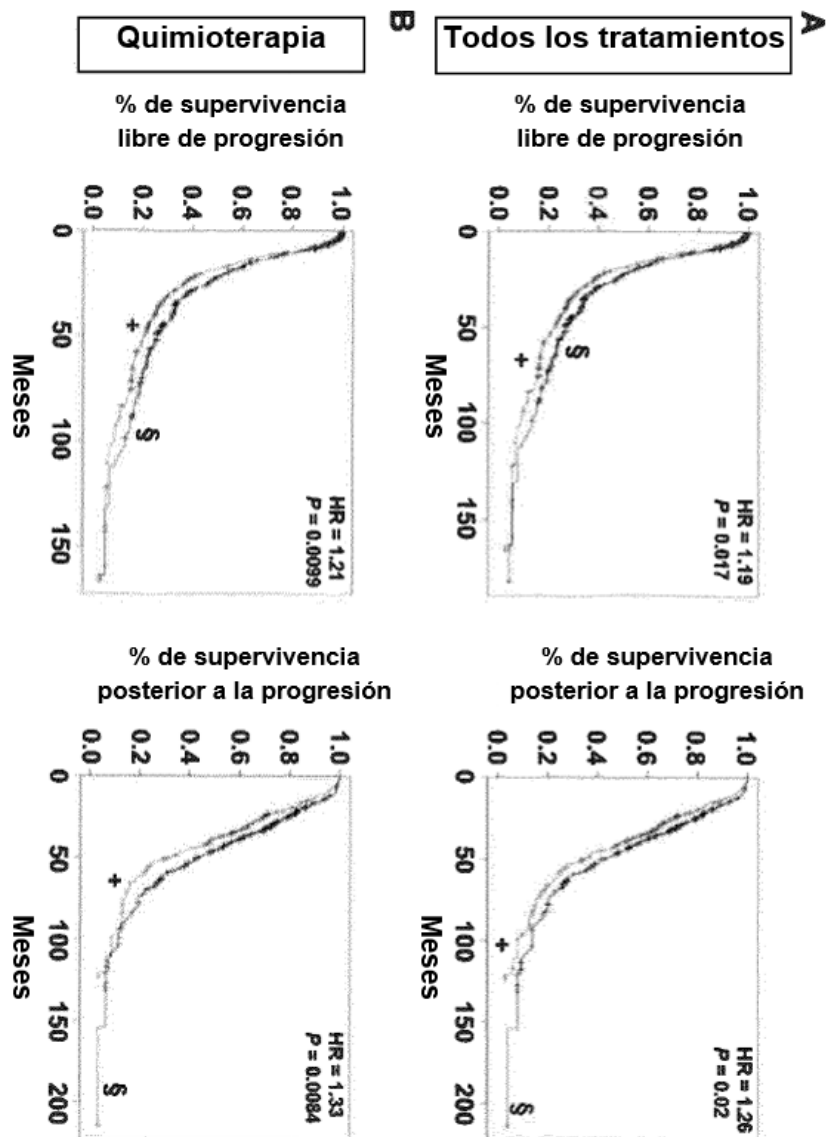


Figura 10

Expresión de ST3Gal2:

Bajo +
Alto \$