

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 168**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2017** **PCT/EP2017/053070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.08.2017** **WO17137601**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2017** **E 17705091 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3414343**

54 Título: **Métodos para evaluar la respuesta al tratamiento de pacientes con TNBC a la quimioterapia neoadyuvante analizando la metilación de CpG**

30 Prioridad:

11.02.2016 EP 16155279

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

06.09.2024

73 Titular/es:

THERAWIS DIAGNOSTICS GMBH (100.0%)
Grillparzerstrasse 14
81675 München, DE

72 Inventor/es:

SCHMITT, MANFRED;
WILHELM, OLAF G. y
NAPIERALSKI, RUDOLF

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 168 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

Métodos para evaluar la respuesta al tratamiento de pacientes con TNBC a la quimioterapia neoadyuvante analizando la metilación de CpG

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de la farmacogenómica y, en particular, a la evaluación de la respuesta de un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC) a la quimioterapia neoadyuvante (NAC) basada en antraciclina mediante el análisis de la metilación de CpG del gen de homeodominio 2 tipo pareado (PITX2).
10 Dependiendo del resultado del análisis, se puede tomar una decisión entre un tratamiento basado en antraciclinas y un tratamiento sin antraciclinas antes de la NAC, optimizando así el plan de tratamiento para cada paciente de forma individual.

Antecedentes de la invención

15 El cáncer de mama es la neoplasia maligna más común en las mujeres, con más de 464,000 nuevos casos diagnosticados en 2012 en Europa (fuente: Cancer Research UK) y con alrededor de 75,000 nuevos casos por año en Alemania (fuente: Informe IACR de la OMS 2014). Los cánceres de mama se clasifican de acuerdo con su tamaño, ubicación y aparición de metástasis. Los métodos de tratamiento incluyen el uso de cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia endocrina, que también se utilizan como terapias adyuvantes de la cirugía.

20 Aproximadamente 70,000 (15 %) pacientes sufrirán el llamado cáncer de mama triple negativo (TNBC). El TNBC se caracteriza por la ausencia de receptor de estrógeno, receptor de progesterona y sobreexpresión/amplificación de HER2. Esta indicación específica de cáncer de mama pertenece al grupo de pacientes de alto riesgo de acuerdo con la clasificación de St. Gallen con muy mal pronóstico y resultado clínico. El mal resultado también se puede atribuir al hecho de que estos pacientes no pueden ser tratados con terapia endocrina o dirigida a HER2.

25 A diferencia de otros tipos de cáncer de mama, el TNBC se trata en un entorno neoadyuvante. El programa de tratamiento neoadyuvante se caracteriza por una biopsia central tomada de la mama para afirmar el diagnóstico histológico seguida de quimioterapia neoadyuvante (NAC). Posteriormente, las pacientes se someterán a una cirugía de mama. El examen patológico de toda la lesión del tumor de mama resecado revelará si el tumor invasivo todavía está presente o no. Si no hay ningún tumor invasivo presente, este resultado se clasifica como remisión patológica completa (pCR). La pCR ha sido reconocida como un criterio de valoración sustituto validado de eficacia para la supervivencia general (OS); sin embargo, solo ~ 30-50 % de los pacientes con TNBC mostrarán pCR después de la quimioterapia neoadyuvante. Si bien los pacientes con TNBC con pCR tienen un buen pronóstico y no necesitan
30 tratamiento sistémico adicional, los pacientes sin pCR podrían beneficiarse de una terapia sistémica adyuvante adicional.

35 Dado que solo existe una oportunidad para que un paciente se someta a terapia neoadyuvante, es de suma importancia elegir la mejor atención para el paciente, que incluya el régimen terapéutico con mayor probabilidad de respuesta en términos de pCR después del tratamiento neoadyuvante y buscar estrategias para la predicción de la respuesta a la quimioterapia antes de la NAC. Para optimizar la selección de opciones de tratamiento, es de crucial importancia contar con un método rápido, específico y sensible para evaluar la respuesta a la terapia.

40 El uso de biomarcadores predictivos es cada vez más relevante en la terapia contra el cáncer, ya que permite una mejor identificación de los pacientes que responderán positivamente a la terapia y de los pacientes que no responden. En el cáncer de mama, los marcadores predictivos pueden determinar los beneficios de la quimioterapia, la terapia endocrina y otros tipos de terapia, como la inmunoterapia (Characiejus. Anticancer Res. 2011; 31:639; Duffy. Clin Chem. 2005; 51:494; van de Vijver. Virchows. Arc. 2014;464:283). Existen muchas ventajas al utilizar un marcador predictivo en la terapia del cáncer. Los biomarcadores predictivos pueden ayudar a mejorar la selección de pacientes y pueden guiar a los médicos a optimizar el plan de tratamiento para cada paciente individualmente, incluyendo una mejor gestión del paciente, minimizando el sufrimiento innecesario por los efectos secundarios de los medicamentos, reduciendo la pérdida de un tiempo precioso mientras se determina si una terapia proporcionará algún beneficio, y una
45 reducción de costes tanto para el paciente como para los sistemas de seguro médico.

Las alteraciones de la metilación del ADN en la región promotora de los genes son un cambio temprano y frecuente en el cáncer, incluido el cáncer de mama.

50 Hace más de 65 años, Mandel y Metais describieron por primera vez su observación de la presencia de ácidos nucleicos extracelulares en humanos (Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. C.R.Acad.Sci.Paris 142, 241-243. 1948) y más de cuatro décadas después se pudo demostrar claramente que se pueden encontrar alteraciones genéticas asociadas a tumores en ácidos nucleicos libres de células aislados de plasma, suero y otros fluidos corporales (Fleischhacker M, Schmidt B. (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—a survey. Biochim Biophys Acta 1775: 181-232; Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. (2010) Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—a critical appraisal of the literature. Clin Chim Acta 411: 1611-1624). Esto incluye
55 alteraciones epigenéticas observadas en diferentes formas de tumores malignos. Una característica distintiva de la cromatina de los mamíferos es la metilación del ADN y se sabe que la metilación de la citosina en el contexto de un

dinucleótido CpG desempeña un papel en la regulación del desarrollo y es importante en procesos biológicos básicos como la embriogénesis y la diferenciación celular. Smith ZD, Meissner A. (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* 14: 204-220; Gibney ER, Nolan CM. (2010) Epigenetics and gene expression. *Heredity* (Edinb) 105: 4-13). Como tal, la metilación no sólo regula la transcripción genética, sino que también desempeña un papel en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, la impronta y la inactivación del cromosoma X. Las alteraciones epigenéticas en oncogenes y genes supresores de tumores son de importancia clave en el desarrollo del cáncer. Suva ML, Riggi N, Bernstein BE. (2013) Reprogramación epigenética en cáncer. *Science* 339: 1567-1570). La ubicuidad de tales cambios epigenéticos en eventos de cáncer a través de la metilación del ADN ha llevado a una variedad de estrategias diagnósticas y terapéuticas innovadoras; Los avances técnicos más recientes han demostrado el gran potencial de los marcadores de metilación del ADN como herramientas valiosas para la toma de decisiones en el tratamiento de pacientes con cáncer (Stefansson y Esteller. *Soy J Pathol.* 2013; 183:1052).

Aunque varios genes alterados por la metilación del ADN se han asociado con la respuesta a la terapia adyuvante en pacientes con cáncer de mama en pequeños estudios exploratorios, actualmente no hay disponible comercialmente ninguna prueba predictiva de metilación del ADN para el cáncer de mama. Esto es notable ya que, a diferencia del ARN y las proteínas, el ADN es un material biológico muy estable que puede extraerse de las mismas muestras de tejido clínico que se someten al análisis del patólogo para el diagnóstico clínico-rutinario de malignidad.

El documento WO 2015/169857 divulga un método para predecir el resultado del tratamiento con antraciclina en un paciente con cáncer de mama, el método comprende analizar una muestra de prueba del paciente para determinar la hipermetilación de al menos el gen INA, en donde la hipermetilación en dicha muestra de prueba indica un pronóstico favorable. Dicho documento enseña que si se detecta hipermetilación en dicha muestra de prueba, se indica un tratamiento con antraciclina como tratamiento adecuado; o si se detecta hipermetilación mínima o nula en dicha muestra de prueba, un tratamiento con antraciclina no está indicado como tratamiento adecuado.

El PITX2 ha sido identificado como resultado de una cooperación transnacional europea dentro del programa marco FP6 y el PathoBiology Group de la EORTC (Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer). El gen PITX2 (homeodominio 2 emparejado) codifica un miembro de la familia homeobox RIEG/PITX, que pertenece a la clase bicoide de proteínas de homeodominio. El PITX2 controla la proliferación celular de manera específica de tejido y participa en la morfogénesis. Durante el desarrollo embrionario, ejerce una función en la expansión de los progenitores musculares y desempeña una función en la localización adecuada de órganos asimétricos como el corazón y el estómago. Como factor de transcripción, PITX2 está fuertemente involucrado en los procesos de desarrollo y funciona como ejecutor principal de la regulación transcripcional de genes diana del desarrollo al interactuar con otras proteínas como HDAC1/3 y P300. El propio PITX2 media la activación/inactivación de genes diana para muchas vías de señalización, como la vía del receptor de estrógeno, la vía WNT/ β -catenina y la vía TGF- β , y regula y es regulada por muchos segundos mensajeros de estas vías, que son distintivamente activos en diferentes subtipos de cáncer de mama.

Se informó que la medición de la metilación del ADN en la región promotora del PITX2 estima la respuesta potencial o el fracaso de un paciente individual con cáncer de mama a la quimioterapia sistémica o la terapia endocrina (Harbeck. *J Clin Oncol.* 2008; 26:5036; Nimmrich. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 111:429).

También se describieron métodos para el pronóstico y/o para la predicción del resultado del tratamiento con estrógenos en pacientes que padecen cáncer de mama con receptores hormonales positivos mediante la determinación del nivel de expresión del PITX2 o las modificaciones genéticas o epigenéticas del ADN genómico asociado con el gen PITX2. Los documentos EP 1 561 821, EP 1 554 407, EP 1 561 821, y EP 2 157 191. El documento WO 2007/039128 divulga la determinación del estado de metilación de CpG de PITX2 en pacientes con trastorno proliferativo celular para predecir el resultado del tratamiento con antraciclina, y Hartmann et al., 2009; *Clin Cancer Res* 15(1):315-323 informan que la hipermetilación del PITX2 y otros genes en pacientes con cáncer de mama con ganglios positivos, receptores de estrógeno positivos y Her-2 negativo se correlaciona con un resultado clínico deficiente de la quimioterapia adyuvante con antraciclinas. Los investigadores enfatizan que un panel de marcadores de cuatro genes es superior en la predicción de resultados en comparación con PITX2 solo. Datos recientes en pacientes con cáncer de mama sin metástasis sugirieron además que el estado de metilación del ADN del PITX2 puede predecir la respuesta a la quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas. En concreto, en WO 2007/039128 El aumento de la metilación del PITX2 se utilizó como marcador predictivo del resultado de un tratamiento adyuvante con antraciclina en una variedad de trastornos de proliferación celular, incluido el cáncer de mama.

Por lo tanto, en la actualidad, el aumento de la metilación del gen PITX2 se describió como un marcador potencial para la predicción del resultado de la terapia endocrina en el cáncer de mama con receptores hormonales positivos y la terapia basada en antraciclinas de diversos órdenes de proliferación celular en el entorno adyuvante, por ejemplo, solo después de una cirugía.

Los presentes inventores encontraron ahora por primera vez que la determinación de la expresión del gen PITX2 y/o una secuencia genómica del mismo también es útil para predecir el resultado de la quimioterapia de pacientes con TNBC en el entorno neoadyuvante. El principio es utilizar el estado de metilación del ADN tumoral del marcador de cáncer de mama PITX2 que se obtiene de una biopsia de tejido obtenida durante una biopsia de diagnóstico realizada de forma rutinaria como indicador del resultado clínico. Si bien se informó que la hipermetilación del PITX2 conduce a

un peor pronóstico en pacientes con cáncer de mama con receptor de estrógeno positivo (Harbeck. J Clin Oncol. 2008; 26:5036; Maier. EJC. 2007; 43:1679-1686), los presentes inventores encontraron sorprendentemente que en pacientes con TNBC, la hipometilación del gen PITX2 es indicativa de un resultado clínico deficiente en términos de remisión patológica completa (pCR).

5 Actualmente se utilizan varios regímenes de quimioterapia neoadyuvante (NAC) para el tratamiento del TNBC.

Si bien las combinaciones de antraciclina/taxano (aquí denominadas quimioterapia basada en antraciclina) han mostrado tasas de pCR del 28-41 %, los datos recientes también enfatizan un beneficio para el tratamiento de pacientes con TNBC con regímenes terapéuticos que contienen carboplatino debido a sus propiedades genéticas únicas.

10 Sorprendentemente, los presentes inventores encontraron que el estado de metilación del ADN en el gen PITX2 y, específicamente, la hipometilación del PITX2 podrían predecir específicamente un mal resultado de la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina en pacientes diagnosticados con cáncer de mama triple negativo (TNBC). Esto es esencial porque sólo hay una oportunidad para que un paciente se someta a una terapia neoadyuvante, y la predicción de la respuesta con respecto a la pCR ayudará, por primera vez, a recomendar una terapia basada en antraciclina versus no basada en antraciclina.

15 La presente invención satisface así la necesidad sentida desde hace mucho tiempo de proporcionar un método rápido, específico y sensible para predecir la respuesta de los pacientes con TNBC al tratamiento basado en antraciclina antes de la NAC, que permita seleccionar aquellos pacientes con TNBC que se benefician de dicha terapia. Dado que los regímenes de tratamiento en quimioterapia neoadyuvante no sólo difieren con respecto a la eficacia, sino a menudo con respecto a la toxicidad, dicho método también alentará a los pacientes con TNBC que probablemente respondan a continuar con una terapia seleccionada racionalmente, a pesar de los posibles efectos secundarios tóxicos.

Resumen de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para predecir el resultado de la quimioterapia neoadyuvante de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC) que comprende las etapas:

- 25 a) proporcionar una muestra biológica del sujeto,
- b) determinar la expresión o el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica de PITX2 y/o secuencias reguladoras del mismo dentro de dicha muestra; y
- c) determinar a partir del mismo el resultado de un tratamiento de dicho sujeto.

30 En una realización del primer aspecto, el método comprende además la etapa d) en la que se determina un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto.

En una realización adicional del método de acuerdo con el primer aspecto, la quimioterapia neoadyuvante se basa en antraciclina.

35 En una realización adicional de dicho método, la determinación de la expresión o el estado de metilación del gen y/o la secuencia genómica del PITX2 y/o sus secuencias reguladoras dentro de dicha muestra en la etapa b) se logra mediante el análisis del ADN genómico aislado de la muestra biológica. Dicha expresión se puede establecer al determinar el estado de metilación de uno o más sitios CpG dentro de dicho gen y/o secuencia genómica y/o regiones reguladoras del mismo o determinando la cantidad de ARNm que codifica el PITX2 y/o la cantidad de proteína del PITX2. El estado de metilación de uno o más sitios CpG se puede determinar al convertir, en dicho ADN genómico, o un fragmento del mismo, citosina no metilada en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación (es decir, que no se hibrida con guanina),

40 preferiblemente mediante conversión con bisulfito.

45 En una realización adicional del método de acuerdo con el primer aspecto, la muestra en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en fluidos corporales tales como aspirado de pezón, sangre, suero, plasma, células, estirpes celulares, células sanguíneas, tejido, biopsias de tejido, preferiblemente biopsias de tejido mamario y todas las combinaciones posibles de las mismas, preferiblemente en las que dicha muestra se proporciona en un estado seleccionado del grupo que consiste en estado natural, congelado, liofilizado, conservado, embebido, embebido en parafina, y todas las combinaciones posibles de los mismos, más preferiblemente en las que la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina o una muestra de sangre anticoagulada.

50 En una realización adicional, el método de acuerdo con el primer aspecto comprende poner en contacto ADN genómico aislado de una muestra biológica obtenida del sujeto con al menos un reactivo, o una serie de reactivos que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región diana del ADN genómico, preferiblemente en donde la región objetivo comprende, o se hibrida en condiciones rigurosas con una secuencia de al menos 16 nucleótidos contiguos del gen PITX2 y/o regiones reguladoras del mismo, en donde dichos nucleótidos

contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótido CpG, y mediante el cual se permite, al menos en parte, predecir el resultado del tratamiento con antraciclina de trastornos proliferativos celulares.

En una realización adicional de dicho método, la hipometilación del PITX2 es indicativa de un resultado clínico deficiente. Dicha hipometilación puede ser un grado de metilación del ADN diana de hasta el 95 %, hasta el 90 %, hasta el 80 %, hasta el 70 %, hasta el 60 %, hasta el 50 %, hasta el 40 %, hasta 30 %, hasta 20 % o hasta 10 % menos que un grado de metilación de un control.

En una realización adicional de dicho método, dicha hipometilación puede ser una relación porcentual de metilación (PMR) del ADN diana de menos del 5 % de PMR, menos del 4 % de PMR, menos del 3 % de PMR, menos del 2 % de PMR o menos del 1 % de PMR.

En una realización adicional del método del primer aspecto, la etapa d) puede comprender determinar la quimioterapia neoadyuvante como un régimen de tratamiento adecuado para un sujeto que presenta un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >1 % de PMR, o un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >2 % PMR. Preferiblemente, dicha quimioterapia neoadyuvante es quimioterapia basada en antraciclina.

En una realización adicional del método de acuerdo con el primer aspecto, un criterio de valoración del resultado clínico es la remisión patológica completa (pCR).

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para predecir el resultado de la quimioterapia neoadyuvante en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC), que comprende:

a) aislar ADN genómico de una muestra biológica del sujeto;

b) convertir, en dicho ADN genómico, o un fragmento del mismo, citosina no metilada en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación;

c) amplificar una región del ADN genómico convertido, o del fragmento convertido del mismo, usando al menos dos cebadores, en la que dicha región comprende al menos 16 nucleótidos contiguos del gen PITX2 y/o regiones reguladoras del mismo, en el que dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótidos CpG;

d) detectar la presencia o ausencia o la cantidad de ADN amplificado en la etapa c);

e) determinar, en función de la presencia o ausencia de, o de la cantidad de dicho amplificado, el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica de PITX2; y

f) predecir a partir de dicho estado de metilación el resultado del tratamiento neoadyuvante. En una realización del segundo aspecto, el método comprende además la etapa g) en la que se determina un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto.

En una realización adicional del método de acuerdo con el segundo aspecto, la quimioterapia neoadyuvante se basa en antraciclina.

En una realización del método de acuerdo con el segundo aspecto, al menos dos cebadores usados en la etapa c) comprenden cada uno una secuencia contigua de al menos 16 nucleótidos de longitud que es complementaria o se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 30 y complementos de los mismos.

En una realización adicional de dicho método, el tratamiento neoadyuvante es una quimioterapia basada en antraciclina.

En otra realización más de dicho método, la hipometilación del PITX2 es indicativa de un resultado clínico deficiente. Dicha hipometilación puede ser un grado de metilación del ADN diana de hasta el 95 %, hasta el 90 %, hasta el 80 %, hasta el 70 %, hasta el 60 %, hasta el 50 %, hasta el 40 %, hasta 30 %, hasta 20 % o hasta 10 % menos que un grado de metilación de un control.

En otra realización más de dicho método, dicha hipometilación puede ser una relación porcentual de metilación (PMR) del ADN diana de menos del 5 % de PMR, menos del 4 % de PMR, menos del 3 % de PMR, menos del 2 % de PMR, o menos del 1 % de PMR.

En una realización adicional del método del segundo aspecto, la etapa g) puede comprender determinar la quimioterapia neoadyuvante como un régimen de tratamiento adecuado para un sujeto que presenta un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >1 % de PMR, o un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >2 % PMR. Preferiblemente, dicha quimioterapia neoadyuvante es quimioterapia basada en antraciclina.

En una realización adicional del método de acuerdo con el segundo aspecto, la muestra en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en fluidos corporales tales como aspirado de pezón, sangre, suero, plasma, células, estirpes

celulares, células sanguíneas, tejido, biopsias de tejido, en particular biopsias de tejido mamario y todas las combinaciones posibles de las mismas, preferiblemente en las que dicha muestra se proporciona en un estado seleccionado del grupo que consiste en estado natural, congelado, liofilizado, conservado, embebido, embebido en parafina, y todas las combinaciones posibles de los mismos, más preferiblemente en la que la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina o una muestra de sangre anticoagulada.

En una realización adicional del método de acuerdo con el segundo aspecto, un criterio de valoración del resultado clínico es la remisión patológica completa (pCR).

Figuras

Figura 1: Representación esquemática del flujo de trabajo establecido para evaluar el estado de metilación del ADN del gen promotor PITX2 extraído de tejido tumoral de mama fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE), en lo sucesivo denominado "Prueba PITX2" (ver Ejemplo 3).

Figura 2: Representación esquemática del flujo de trabajo para determinar las variaciones del valor de PMR (heterogeneidad) entre secciones consecutivas de tejido tumoral y la reproducibilidad de los valores de PMR en 12 series de qPCR independientes (consulte el Ejemplo 4).

Figura 3: Representación esquemática del flujo de trabajo para obtener áreas tumorales macrodisseccionadas (ver Ejemplo 5).

Descripción de la invención

Antes de que la presente invención se describa en detalle a continuación, debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, los protocolos y los reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Preferiblemente, los términos utilizados en el presente documento se definen como se describe en "multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. y Kölbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza).

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con realizaciones específicas; sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear realizaciones adicionales. Los diversos ejemplos descritos y las realizaciones preferidas no deben interpretarse como que limitan la presente invención únicamente a las realizaciones descritas explícitamente. Se debe entender que esta descripción respalda y abarca realizaciones que combinan las realizaciones descritas explícitamente con cualquier número de los elementos divulgados y/o preferidos. Además, cualquier permutación y combinación de todos los elementos descritos en esta solicitud debe considerarse divulgada por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto indique lo contrario.

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se debe entender que la palabra "comprende" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende" implican la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas pero sin la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Tal como se utiliza en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes en plural, a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Descripción detallada de la invención

La caracterización de un cáncer en términos de predicción del resultado del tratamiento permite al médico tomar una decisión informada sobre un régimen terapéutico con compensaciones apropiadas de riesgo y beneficio para el paciente.

De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona métodos para predecir el resultado de la quimioterapia neoadyuvante de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC).

Sujeto

El término "sujeto" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un individuo, tal como un ser humano, un primate no humano (por ejemplo, chimpancés y otras especies de simios y monos); animales de granja, tales como aves, peces, vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio, incluidos roedores, como ratones, ratas y cobayas. El término no denota una edad o sexo en particular. En un significado particular, el sujeto es un mamífero. En un significado preferido, el sujeto es un ser humano.

Resultado

El término “predecir el resultado de la quimioterapia neoadyuvante”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere al resultado esperado de la enfermedad cancerosa en respuesta a dicho tratamiento y generalmente se relaciona con la evaluación de su estado de desarrollo, progresión o regresión, y/o el pronóstico del curso del cáncer en el futuro. La predicción del efecto del tratamiento se puede realizar utilizando cualquier criterio de evaluación utilizado en oncología y conocido por el experto en la técnica. Generalmente, el efecto del tratamiento se puede evaluar determinando el tamaño del tumor y/o el número de células cancerosas. Como entenderán los expertos en la materia, dicha evaluación normalmente puede no ser correcta para el 100 % de los pacientes, aunque preferentemente sí lo es. El término, sin embargo, requiere que se pueda hacer una predicción correcta para una parte estadísticamente significativa de los sujetos. El experto en la técnica puede determinar fácilmente si una parte es estadísticamente significativa utilizando varias herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación de valores p, prueba t de Student, prueba de Mann-Whitney, etc. Los detalles se proporcionan en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %. Los valores de p son preferiblemente 0.05, 0.01 o 0.005.

Remisión patológica completa (pCR)

En una realización preferida de la presente invención, un criterio de valoración del resultado clínico es la remisión patológica completa (pCR). El examen patológico de toda la lesión del tumor de mama resecado revelará si el tumor invasivo todavía está presente o no. Más específicamente, la pCR se define como la ausencia de cáncer invasivo residual mediante evaluación histológica (tinción de hematoxilina-eosina) de la muestra de mama resecada completa y de todos los ganglios linfáticos regionales de los que se tomaron muestras, después de completar la terapia sistémica neoadyuvante (es decir, ypT0/Tis ypN0 en el sistema de estadificación actual del AJCC). Si no hay ningún tumor invasivo presente, este resultado se clasifica como remisión patológica completa (pCR). pCR es un criterio de valoración aceptado por la EMA y la FDA (Guidance for Industry, Pathological Complete Response in Neoadjuvant Treatment of High-Risk Early-Stage Breast Cancer: Use as an Endpoint to Support Accelerated Approval. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), October 2014 Clinical/Medical).

La remisión patológica completa (pCR) se puede clasificar en cuatro etapas diferentes de acuerdo con Sinn et al. (Sinn HP, Schmid H, Junkermann H, Huober J, Leppien G, Kaufmann M, Bastert G, Otto HF. Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 1994 Oct; 54(10):552-8), como se muestra en tabla 1 abajo:

Tabla 1: Clasificación de pCR de acuerdo con Sinn et al.

pCR de acuerdo con Sinn:	Respuesta a la quimioterapia neoadyuvante:
Sinn 0-1	Ninguna respuesta
Sinn 2	En gran parte libre de tumores
Sinn 3	Libre de tumor pero con carcinoma in situ presente
Sinn 4	Remisión patológica completa (sin tumor invasivo presente, sin carcinoma in situ presente y sin células tumorales invasivas presentes en los ganglios linfáticos axilares)

La pCR ha sido reconocida como un criterio de valoración sustituto validado de eficacia para la supervivencia general (OS), sin embargo, solo ~30-50 % de los pacientes con TNBC mostrarán pCR después de la quimioterapia neoadyuvante (NAC). Si bien los pacientes con TNBC con pCR tienen un buen pronóstico y no necesitan tratamiento sistémico adicional, los pacientes sin pCR podrían beneficiarse de una terapia sistémica adyuvante adicional.

Cáncer de mama triple negativo (TNBC)

Los términos “cáncer de mama triple negativo” y “TNBC”, tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a cualquier cáncer de mama que no exprese o sobreexpresen los genes del receptor de estrógeno (ER), del receptor de progesterona (PR) o HER2 de acuerdo con las pautas clínicas establecidas en la Sociedad estadounidense de oncólogos clínicos para la evaluación inmunohistoquímica del estado de expresión de ER/PR y HER2 y directrices clínicas para TNBC (Oakman C1, Viale G, Di Leo A.; Management of triple negative breast cancer. *Breast.* 2010 Oct; 19(5):312-21.).

La falta de expresión o sobreexpresión genética definida anteriormente significa que el crecimiento del cáncer no está respaldado por las hormonas estrógeno y progesterona, ni por la presencia de demasiados receptores HER2. Por lo

tanto, el cáncer de mama triple negativo no responde a la terapia hormonal (como el tamoxifeno o los inhibidores de la aromatasas) ni a las terapias dirigidas a los receptores HER2, como Herceptina (nombre genérico: trastuzumab). También por esta razón, esta indicación específica de cáncer de mama pertenece al grupo de pacientes de alto riesgo de acuerdo con la clasificación de St. Gallen con muy mal pronóstico y resultado clínico. Sin embargo, se pueden usar otros medicamentos para tratar el cáncer de mama triple negativo. A diferencia de otros tipos de cáncer de mama, el TNBC se trata con quimioterapia neoadyuvante.

Quimioterapia neoadyuvante (NAC)

En el contexto de la presente invención, el término "quimioterapia neoadyuvante" o "NAC" se refiere a un tratamiento administrado como primera etapa para reducir un tumor antes de administrar el tratamiento principal, que normalmente es cirugía. Ejemplos de terapia neoadyuvante incluyen quimioterapia, radioterapia y terapia hormonal. Es un tipo de terapia de inducción.

En el presente contexto, dicha quimioterapia neoadyuvante se basa preferentemente en antraciclinas. Las antraciclinas son un gran grupo de compuestos sintetizados por diferentes especies de *Streptomyces*. Poseen actividad antibiótica y tienen efectos citotóxicos sobre las células eucariotas. Todas las antraciclinas tienen una estructura de anillo de tetrahidronaftacenediona unida mediante un enlace glicosídico a una molécula de azúcar; la diversidad estructural de las antraciclinas se genera mediante modificaciones de la estructura principal que incluyen una gran cantidad de cadenas laterales diferentes. Las antraciclinas tienen una excelente actividad antineoplásica en entornos metastásicos, neoadyuvantes y adyuvantes y se utilizan en el tratamiento de diversos tumores hematopoyéticos y sólidos. Aunque su mecanismo de acción quimioterapéutica no está claro, implica intercalación de ADN no covalente, formación de aductos de ADN covalente, envenenamiento por topoisomerasa II (topo II) y efectos de los radicales libres sobre las membranas celulares y el ADN.

En el presente contexto, la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina comprende preferiblemente la administración de al menos una antraciclina, que puede seleccionarse del grupo que consiste en mitoxantrona, doxorubicina, aclarrubicina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina y combinaciones de las mismas.

En una realización, la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina comprende administrar a un sujeto al menos una antraciclina seleccionada del grupo mencionado anteriormente en combinación con un compuesto de platino, que puede seleccionarse entre cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino, triplatino, lipoplatino y combinaciones de los mismos. Normalmente, la al menos una antraciclina y el compuesto de platino se administran al sujeto de manera secuencial.

En una realización preferida, el sujeto recibe quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina durante un período de 24 semanas. Dentro de este período de tiempo, el sujeto puede recibir cuatro ciclos de tratamiento con antraciclina seguidos de 12 semanas de tratamiento con carboplatino.

Sin embargo, la utilidad clínica de las antraciclinas es limitada debido a las toxicidades agudas y crónicas, en particular cardiotoxicidad, mielosupresión, náuseas, vómitos y alopecia.

La insuficiencia cardíaca después del tratamiento con antraciclinas es un problema clínico importante en el tratamiento del cáncer. El establecimiento de predictores del resultado del tratamiento con antraciclinas permitiría la identificación y exclusión de individuos que no se beneficiarían de dicho tratamiento y, por lo tanto, aumentaría la seguridad del tratamiento con antraciclinas. Además, al determinar qué pacientes se beneficiarían del tratamiento con antraciclina, pero en los que dicho resultado previsto es subóptimo, se puede recomendar a los pacientes para tratamientos quimioterapéuticos u otros tratamientos adicionales.

Esto es particularmente esencial en el tratamiento del TNBC porque solo hay una oportunidad para que un paciente se someta a una terapia neoadyuvante. La predicción de la respuesta con respecto a la pRC después del tratamiento neoadyuvante ayudaría a recomendar el tratamiento con antraciclinas versus el tratamiento sin antraciclinas.

De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad sentida desde hace mucho tiempo en la técnica de determinar qué pacientes afectados por TNBC se beneficiarán del tratamiento basado en antraciclina en el entorno neoadyuvante.

Métodos de la invención

Esta necesidad ha sido satisfecha ahora con los métodos de acuerdo con el primer y segundo aspecto de la invención. Dicho método del primer aspecto comprende: a) proporcionar una muestra biológica del sujeto, b) determinar la expresión o el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica del PITX2 y/o secuencias reguladoras del mismo dentro de dicha muestra; y c) determinar a partir del mismo el resultado de un tratamiento de dicho sujeto.

El método del segundo aspecto comprende: a) aislar ADN genómico de una muestra biológica tomada de un sujeto; b) convertir, en dicho ADN genómico, o un fragmento del mismo, citosina no metilada en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación; c) amplificar una región del ADN genómico convertido, o del fragmento convertido del mismo, usando al menos dos cebadores, en el que dicha región comprende al menos 16 nucleótidos contiguos del gen PITX2 y/o regiones reguladoras del mismo,

en el que dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótidos CpG; d) detectar la presencia o ausencia o la cantidad de ADN amplificado en la etapa c); determinar, en base a la presencia o ausencia de, o en la cantidad de dicho amplificado, el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica del PITX2; y e) predecir a partir de dicho estado de metilación el resultado del tratamiento neoadyuvante.

5 Muestra biológica

El término “muestra” o “muestra biológica” como se usa en el presente documento se refiere a material biológico obtenido de un sujeto y preferiblemente comprende ADN genómico de todos los cromosomas, preferiblemente ADN genómico que cubre todo el genoma. La muestra comprende, si un sujeto tiene cáncer, células del cáncer o ADN genómico libre (incluido el ADN diana) de células cancerosas, preferiblemente ADN genómico circulante de células cancerosas. Puede derivarse de cualquier tejido o fluido biológico adecuado tal como aspirado de pezón, sangre, suero, plasma; células, estirpes celulares, células sanguíneas, tejidos, biopsias de tejidos y todas las combinaciones posibles de los mismos. Preferiblemente, dicha muestra biológica se proporciona en un estado seleccionado del grupo que consiste en estado natural, congelado, liofilizado, conservado, embebido, embebido en parafina y todas las combinaciones posibles de los mismos. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para obtener muestras de un sujeto. En una realización preferida, la muestra es una biopsia de tumor o una muestra líquida. La biopsia del tumor es preferiblemente una muestra de tejido embebida en parafina y la muestra líquida es preferiblemente una muestra de sangre anticoagulada.

Factor de transcripción de homeodominio 2 (PITX2)

Dentro de dicha muestra biológica se determina la expresión o estado de metilación del gen y/o secuencia genómica de PITX2 y/o secuencias reguladoras del mismo. La determinación de la expresión puede realizarse mediante la determinación del estado de metilación de uno o más CpG. De forma alternativa, o adicional, la determinación de la expresión puede realizarse mediante la determinación de la cantidad de ARNm que codifica PITX2 o la cantidad de proteína PITX2. En una realización preferida, dicha expresión se determina mediante análisis de ADN genómico aislado de la muestra biológica.

25 ADN genómico

El término “ADN genómico” como se usa en el presente documento se refiere a ADN cromosómico y se usa para distinguirlo del ADN en sentido. Como tal, incluye exones, intrones y secuencias reguladoras, en particular promotores, que pertenecen a un gen. El ADN genómico puede aislarse mediante cualquier medio estándar en la técnica, incluido el uso de kits disponibles comercialmente. Brevemente, cuando el ADN de interés está encapsulado en/mediante una membrana celular, la muestra biológica debe romperse y lisarse por medios enzimáticos, químicos o mecánicos. En caso de que el ADN se extraiga de un tejido incluido en parafina y fijado con formalina, se requieren etapas de desparafinación y desreticulación. Estas etapas se pueden realizar como se conoce comúnmente en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de un kit de proveedores comerciales de acuerdo con los protocolos del proveedor (por ejemplo, kit de tejido QiaAmp DNA FFPE de Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Luego, la solución de ADN puede eliminarse de proteínas y otros contaminantes, por ejemplo, mediante digestión con proteinasa K. Luego se recupera el ADN genómico de la solución. Esto se puede llevar a cabo mediante una variedad de métodos que incluyen saladura, extracción orgánica o unión del ADN a un soporte en fase sólida. La elección del método se verá afectada por varios factores, incluidos el tiempo, los gastos y la cantidad requerida de ADN.

En el presente contexto, el término “ADN genómico” se refiere preferiblemente a secuencias genómicas de o dentro del gen PITX2 y variantes tratadas del mismo como se muestran en Tabla 2 y Tabla 3 abajo.

Análisis de metilación

En una realización preferida, determinar la expresión del gen y/o secuencia genómica del PITX2 y/o secuencias reguladoras del mismo comprende determinar el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica del PITX2. Se prefiere particularmente que se analice el estado de metilación de los dinucleótidos CpG dentro de la secuencia genómica de dicho gen de acuerdo con la Tabla 2 (SEQ ID NO: 1) o en sus derivados convertidos con bisulfito (SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13). Más preferiblemente, se analiza el estado de metilación de los dinucleótidos CpG dentro de las regiones ricas en CpG del gen PITX2 con SEQ ID NO: 2 o en derivados convertidos con bisulfito del mismo (SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 14), o dentro de las regiones ricas en CpG del gen PITX2 con SEQ ID NO: 3 o en derivados convertidos con bisulfito del mismo (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15), incluso más preferiblemente dentro de las regiones ricas en CpG del gen PITX2 con SEQ ID NO: 16 o en derivados convertidos con bisulfito del mismo (SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 28), y más preferiblemente dentro de las regiones ricas en CpG del gen PITX2 con SEQ ID NO: 17 o en derivados convertidos con bisulfito del mismo (SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29) o dentro de las regiones ricas en CpG del gen PITX2 con SEQ ID NO: 18 o en derivados convertidos con bisulfito del mismo (SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 30) son analizados (ver Tabla 3).

En el presente contexto, las secuencias genómicas con SEQ ID NO: 1 a 3 y 16 a 18 o las secuencias convertidas con bisulfito con SEQ ID NO: 4 a 15 y 19 a 30 correspondientes a los mismos también se denominarán “ADN diana”.

Tabla 2: Secuencia genómica del gen PITX2 y variantes del mismo convertidas con bisulfito

Gen	Número de acceso	Genómica de SEQ ID NO:	Secuencia metilada pretratada (en sentido)	Secuencia metilada pretratada (antisentido)	Secuencia no metilada pretratada	Secuencia no metilada pretratada
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	(en sentido) SEQ ID NO:	(antisentido) SEQ ID NO:
PITX2	NM 002658	1	4	7	10	13

Tabla 3: Regiones ricas en CpG preferidas del PITX2 y variantes convertidas con bisulfito de las mismas

Gen	Genómica SEQ ID NO:	Secuencia metilada pretratada (en sentido) SEQ ID NO:	Secuencia metilada pretratada (antisentido) SEQ ID NO:	Secuencia sin metilar pretratada (en sentido) SEQ ID NO:	Secuencia sin metilar pretratada (antisentido) SEQ ID NO:
PITX2	2	5	8	11	14
PITX2	3	6	9	12	15
PITX2	16	19	22	25	28
PITX2	17	20	23	26	29
PITX2	18	21	24	27	30

5 Metilación del ADN

El término "metilación" o "metilación del ADN" como se usa en el presente documento se refiere a un proceso bioquímico que implica la adición de un grupo metilo a los nucleótidos de ADN de citosina o adenina. La metilación del ADN en la posición 5 de la citosina, especialmente en las regiones promotoras, puede tener el efecto de reducir la expresión genética y se ha encontrado en todos los vertebrados examinados. En células adultas no gametas, la metilación del ADN ocurre típicamente en un sitio CpG.

Dinucleótidos CpG

El término "sitio CpG" o "dinucleótido CpG", como se usa en el presente documento, se refiere a regiones de ADN en las que un nucleótido de citosina aparece junto a un nucleótido de guanina en la secuencia lineal de bases a lo largo de su longitud. "CpG" es la abreviatura de "C-fosfato-G", es decir, citosina y guanina separadas por un solo fosfato; El fosfato une dos nucleósidos cualesquiera en el ADN. La notación "CpG" se utiliza para distinguir esta secuencia lineal del emparejamiento de bases CG de citosina y guanina. Las citosinas en los dinucleótidos CpG se pueden metilar para formar 5-metilcitosina. El término "sitio CpG" o "sitio CpG de ADN genómico" también se usa con respecto al sitio de un sitio CpG anterior (no metilado) en el ADN en el que el C no metilado del sitio CpG se convirtió en otro como se describe en el presente documento (por ejemplo, por bisulfito a uracilo). La aplicación proporciona en la Tabla 2 y la Tabla 3 la secuencia genómica de cada región de ADN relevante así como las secuencias convertidas con bisulfito de cada cadena convertida. En el presente documento, las secuencias convertidas con bisulfito también se denominan "secuencias tratadas" o "secuencias pretratadas". La Tabla 3 proporciona específicamente regiones ricas en CpG del gen PITX2 y variantes tratadas del mismo. Los sitios CpG mencionados son siempre los sitios CpG de la secuencia genómica, incluso si la secuencia convertida ya no contiene estos sitios CpG debido a la conversión.

En la técnica se conocen métodos adecuados para cuantificar la metilación de CpG en ADN genómico. En el contexto de la presente invención, la metilación dentro del gen PITX2 y/o regiones reguladoras o promotoras del mismo puede analizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en los documentos WO 2007/03128 y en la Patente de Estados Unidos No. 6,265,171 de Herman.

Conversión de ADN

Brevemente, determinar el estado de metilación de CpG dentro del gen PITX2 requiere, en una primera etapa, convertir, en el ADN genómico, o un fragmento del mismo, la citosina no metilada en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación.

El término “hibridación”, cuando se utiliza con respecto a un oligonucleótido, debe entenderse como un enlace de un oligonucleótido a una secuencia complementaria a lo largo de las líneas de los pares de bases de Watson-Crick en la muestra de ADN, formando una estructura dúplex, en condiciones moderadas o condiciones de hibridación rigurosas. Cuando se usa con respecto a un único nucleótido o base, se refiere a la unión de acuerdo con los pares de bases Watson-Crick, por ejemplo, C-G, A-T y A-U. Las condiciones de hibridación rigurosas implican la hibridación a 68 °C en 5x SSC/solución de Denhardt 5x/1.0 % SDS y el lavado en 0.2 x SSC/0.1 % SDS a temperatura ambiente, o implican el equivalente reconocido en la técnica de los mismos (por ejemplo, condiciones en las que la hibridación se lleva a cabo a 60 °C en 2.5 x tampón SSC, seguido de varias etapas de lavado a 37 °C en una concentración baja de tampón, y permanece estable). Las condiciones moderadas implican lavar en 3x SSC a 42 °C, o su equivalente reconocido en la técnica. Los parámetros de concentración de sal y temperatura se pueden variar para lograr el nivel óptimo de identidad entre la sonda y el ácido nucleico diana. En la técnica se encuentran disponibles directrices con respecto a tales condiciones, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.) en la Unidad 2.10.

La frase “convertir, en dicho ADN genómico, o un fragmento del mismo, citosina no metilada en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación”, como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso de tratamiento químico al ADN de tal manera que todas o sustancialmente todas las bases de citosina no metiladas se conviertan en bases de uracilo, u otra base que sea diferente a la citosina en términos de comportamiento de emparejamiento de bases, es decir, que no se hibride con guanina, mientras que las bases 5-metilcitosina permanecen sin cambios. La conversión de bases de citosina sin metilar, pero no metiladas, dentro de la muestra de ADN se realiza con un agente de conversión. El término “agente de conversión” como se usa en el presente documento se refiere a un reactivo capaz de convertir una citosina no metilada en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación. El agente de conversión es preferiblemente un bisulfito tal como disulfito o sulfito de hidrógeno. La reacción se realiza de acuerdo con procedimientos estándar (Frommer et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1827-31; Olek, 1996, *Nucleic Acids Res* 24:5064-6; EP 1394172). También es posible realizar la conversión enzimáticamente, por ejemplo, mediante el uso de citidina desaminasas específicas de metilación. Lo más preferiblemente, el agente de conversión es bisulfito o bisulfito de sodio.

La invención divulgada proporciona secuencias de ácidos nucleicos tratadas, derivadas de las secuencias genómicas SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18, en el que el tratamiento es adecuado para convertir al menos una base de citosina no metilada de la secuencia de ADN genómico en uracilo u otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de hibridación. Las secuencias genómicas en cuestión pueden comprender una o más posiciones CpG metiladas consecutivas o aleatorias.

Amplificación de ADN

En la siguiente etapa, se amplifica una región del ADN genómico convertido, o una región de un fragmento convertido del mismo, preferiblemente de una manera dependiente de la metilación.

El término “amplificar” o “generar un amplicón” como se usa en el presente documento se refiere a un aumento en el número de copias del ácido nucleico diana y su secuencia complementaria, o particularmente una región del mismo. La amplificación se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica. La amplificación de ácido nucleico incluye métodos que requieren múltiples ciclos durante el proceso de amplificación o método que se realizan a una única temperatura. Las técnicas de ciclado se ejemplifican mediante métodos que requieren termociclado. Los métodos que requieren termociclado incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que es bien conocida en la técnica. La PCR incluye la desnaturalización de un ADN bicatenario en ADN monocatenario mediante desnaturalización térmica, hibridación de un cebador con los ADN monocatenarios; y sintetizar una cadena complementaria a partir del cebador. La amplificación isotérmica es una amplificación realizada a una única temperatura o en el que el aspecto principal del proceso de amplificación se realiza a una única temperatura. En el proceso de PCR, el producto de la reacción se calienta para separar las dos cadenas de modo que otro cebador pueda unirse a la plantilla. Por el contrario, las técnicas isotérmicas se basan en una polimerasa que desplaza las cadenas para separar las dos cadenas de una doble cadena y volver a copiar la plantilla. Las técnicas isotérmicas pueden clasificarse en métodos que se basan en la sustitución de un cebador para iniciar una copia reiterativa de la plantilla y aquellos que se basan en la reutilización continua o una nueva síntesis de una única molécula de cebador. Los métodos que se basan en la sustitución del cebador incluyen la amplificación dependiente de helicasa (HDA), la amplificación dependiente de exonucleasa, la amplificación de polimerasa recombinasa (RPA) y la amplificación mediada por bucle (LAMP). Los métodos que se basan en la reutilización continua o la nueva síntesis de una única molécula cebadora incluyen la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación basada en ácidos nucleicos (NASBA y TMA).

PCR específica de metilación

La amplificación se realiza preferiblemente mediante PCR específica de metilación mediante el uso de oligonucleótidos cebadores específicos de metilación o, en una realización alternativa, mediante el uso de oligonucleótidos cebadores que no son específicos de metilación, pero específicos del ADN convertido con bisulfito (es decir, se hibridan sólo con

el ADN convertido cubriendo al menos un C convertido). Este último método ha sido descrito en el documento WO 2007/03128.

Oligonucleótidos cebadores

El término "oligonucleótido cebador" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de oligonucleótido monocatenario sustancialmente complementaria a una secuencia de ácido nucleico que se busca copiar (la plantilla) y sirve como punto de partida para la síntesis de un producto de extensión del cebador. "Sustancialmente complementario" significa que un oligonucleótido cebador no necesita reflejar la secuencia exacta del molde y puede comprender desemparejamientos y/o espaciadores, siempre que todavía sea capaz de hibridarse y servir como punto de partida para la extensión bajo la hibridación elegida y condiciones de extensión (por ejemplo, de un ciclo de PCR).

El término "desemparejamiento", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un desemparejamiento de pares de bases en el ADN, más específicamente un par de bases que es incapaz de formar interacciones de pares de bases normales (es decir, distintas de "A" con "T" o "U", o "G" con "C").

El término "espaciador" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula espaciadora no nucleotídica, que aumenta, cuando se unen dos nucleótidos, la distancia entre los dos nucleótidos hasta aproximadamente la distancia de un nucleótido (es decir, la distancia que estarían separados los dos nucleótidos si estaban unidos por un tercer nucleótido). Ejemplos no limitantes de espaciadores son inosina, d-uracilo, bases halogenadas, Amino-dT, C3, C12, Spacer 9, Spacer 18 y dSpacer).

Oligonucleótidos cebadores específicos de metilación

En una realización del método, el estado de metilación de posiciones CpG preseleccionadas dentro de una o más de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18, puede detectarse mediante el uso de oligonucleótidos cebadores específicos de metilación. Esta técnica (MSP) ha sido descrita en la Patente de Estados Unidos No. 6,265,171 de Herman.

El uso de cebadores específicos del estado de metilación para la amplificación de ADN tratado con bisulfito permite la diferenciación entre ácidos nucleicos metilados y no metilados. Los pares de cebadores de MSP contienen al menos un cebador que se hibrida con un dinucleótido CpG tratado con bisulfito. Por tanto, la secuencia de dichos cebadores comprende al menos un dinucleótido CpG, TpG o CpA. Los cebadores MSP específicos para ADN no metilado contienen una "T" en la posición 3' de la posición C en el CpG. Preferiblemente, por lo tanto, se requiere que la secuencia de bases de dichos cebadores comprenda una secuencia que tenga una longitud de al menos 18 nucleótidos que se hibrida con una secuencia de ácido nucleico pretratada de acuerdo con la SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 24 y secuencias complementarias a las mismas, o a una secuencia de ácido nucleico pretratada de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 25 a SEQ ID NO: 30 y secuencias complementarias a las mismas, en el que la secuencia de bases de dichos oligómeros comprende al menos un dinucleótido CpG, tpG o Cpa. En esta realización del método de acuerdo con la invención se prefiere particularmente que los cebadores MSP comprendan entre 2 y 4 dinucleótidos CpG, tpG o Cpa. Se prefiere además que dichos dinucleótidos estén ubicados dentro de la mitad 3' del cebador, por ejemplo, en el que un cebador tiene 18 bases de longitud, los dinucleótidos especificados están ubicados dentro de las primeras 9 bases del extremo 3' de la molécula. Además de los dinucleótidos CpG, tpG o Cpa, se prefiere además que dichos cebadores comprendan además varias bases convertidas con bisulfito (es decir, citosina convertida en timina, o en la cadena de hibridación, guanina convertida en adenosina). En otra realización preferida, dichos cebadores están diseñados para que comprendan no más de 2 bases de citosina o guanina. La PCR específica de metilación (MSP) es un ensayo de metilación bien conocido en la técnica y fue descrito por Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:9821-9826, 1996. En una realización más preferida, la etapa de amplificar comprende una PCR en tiempo real como se describe en EP 1 561 821 B1, en particular MethyLight™. En el contexto de la presente invención, el término "MethyLight™" se refiere a un ensayo de metilación que comprende cuatro oligonucleótidos, es decir, dos oligonucleótidos cebadores no específicos de metilación y dos sondas de oligonucleótidos que se hibridan competitivamente con el sitio de unión. Los dos cebadores no específicos de metilación se utilizan para amplificar un segmento del ADN genómico tratado que contiene un sitio de unión a una sonda de oligonucleótido variable de metilación.

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "sitio de unión de sonda de oligonucleótido variable" se refiere al sitio de unión de dos sondas de oligonucleótido marcadas con fluorescencia diferencial, que detectan el estado completamente metilado o completamente no metilado de uno o más motivos CpG cubiertos por la secuencia de las respectivas sondas.

Preferiblemente, dichos dos cebadores de PCR no específicos de metilación son oligonucleótidos con SEQ-ID NO: 31 y SEQ-ID NO: 32.

Después de la amplificación no específica de metilación de la región diana, el estado de metilación de PITX2 se determina mediante detección específica de metilación utilizando dos sondas oligonucleotídicas diferentes que se hibridan competitivamente con el sitio de unión.

En el contexto de la presente invención, el término “estado de metilación” se refiere al grado de metilación presente en un ácido nucleico de interés. Esto puede expresarse en términos absolutos o relativos, es decir, como porcentaje u otro valor numérico o en comparación con otro tejido y puede describirse como hipermetilado, hipometilado o con un estado de metilación significativamente similar o idéntico.

Las dos sondas de oligonucleótidos utilizadas en el presente ensayo de metilación se hibridan competitivamente con el sitio de unión, una específica para la versión metilada del sitio de unión y la otra específica para la versión no metilada del sitio de unión. De acuerdo con lo anterior, una de las sondas comprende un CpG en la posición variable de metilación (es decir, se hibrida con sitios tratados con bisulfito metilado) y la otra comprende una TpG en dicha posición (es decir, se hibrida con sitios tratados con bisulfito no metilado). Cada especie de sonda está marcada con un tinte indicador fluorescente 5' y un tinte extintor 3' en los que los oligonucleótidos CpG y TpG están marcados con tintes diferentes.

En una realización preferida, dichas sondas oligonucleótidas son oligonucleótidos con SEQ-ID NO: 33 y SEQ-ID NO: 34. Dicho tinte indicador fluorescente 5' puede ser cualquier tinte indicador fluorescente 5' conocido en la técnica y se selecciona particularmente entre 6-carboxifluoresceína (FAM). El tinte extintor 3' puede ser cualquier tinte extintor 3' conocido en la técnica y se selecciona particularmente entre 5-carboxitetrametilrodamina (TAMRA).

En una realización particularmente preferida, el estado de metilación de PITX2 se determina mediante la técnica de PCR en tiempo real basada en fluorescencia reconocida en la técnica descrita por Eads et al., Cancer Res. 59:2302-2306, 1999.

En una realización preferida de la invención, la región amplificada del gen PITX2 o fragmento del mismo tiene al menos 16 bases de nucleótidos contiguas de longitud de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18, en el que dicha secuencia comprende al menos un dinucleótido CpG y secuencias complementarias del mismo, para las cuales se va a determinar la cantidad de metilación. Las secuencias de SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 30 proporcionan versiones modificadas de origen no natural del ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18, en el que la modificación de cada secuencia genómica da como resultado la síntesis de un ácido nucleico que tiene una secuencia que es única y distinta de dicha secuencia genómica como sigue. Para cada ADN genómico de cadena en sentido, por ejemplo, SEQ ID NO: 1, se divulgan dos versiones convertidas. Una primera versión en la que “C” es “T”, pero “CpG” sigue siendo “CpG” (es decir, corresponde al caso en el que, para la secuencia genómica, todos los residuos “C” de las secuencias de dinucleótidos CpG están metilados y, por tanto, no se convierten); una segunda versión divulga el complemento de la secuencia de ADN genómico divulgada (es decir, cadena antisentido), en la que “C” es “T”, pero “CpG” sigue siendo “CpG” (es decir, corresponde al caso en el que, para todos los residuos “C” de las secuencias de dinucleótidos CpG están metiladas y, por tanto, no se convierten). Las secuencias convertidas 'no metiladas' de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18 corresponden a SEQ ID NO: 10 a SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 25 a SEQ ID NO: 30, en el que “C” se convierte en “T” para todos los residuos “C”, incluidos los de las secuencias de dinucleótidos “CpG” (es decir, corresponde al caso en el que, para las secuencias genómicas, todos los residuos “C” de las secuencias de dinucleótidos CpG son no metiladas). Las cadenas complementarias se construyen in silico a partir de secuencias de ADN metiladas y no metiladas químicamente convertidas (SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18), que representa productos de PCR complementados después de la primera etapa de amplificación (es decir, secuencia complementaria de cadena en sentido completamente metilada convertida químicamente). Las secuencias convertidas 'complementarias' de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18 corresponden a SEQ ID NO: 7 a SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 13 a SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 22 a SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 28 a SEQ ID NO: 30.

Los cebadores específicos de metilación particularmente adecuados para su uso en la determinación del estado de metilación de PITX2 se proporcionan en Tabla 4 a continuación.

Tabla 4: Cebadores y amplificadores específicos de metilación para uso en análisis de metilación de PITX2

Gene	Cebador directo de la SEQ ID NO:	Cebador inverso de la SEQ ID NO:	Sonda metilada de la SEQ ID NO:	Sonda no metilada de la SEQ ID NO:	Amplificación genómica de la SEQ ID NO:	Amplificación de la secuencia completamente metilada pretratada de la SEQ ID NO:	Amplificación de la secuencia completamente no metilada pretratada de la SEQ ID NO:
PITX2	31	32	33	34	35	36	37

Los oligonucleótidos cebador y sonda de acuerdo con la SEQ ID NO: 31 a SEQ ID NO: 34 particularmente se hibridan en las posiciones de nucleótidos 10990 a 11011 (SEQ ID NO: 31), 10874 a 10887 (SEQ ID NO: 32), 10951 a 10970 (SEQ ID NO: 33) y 10944 a 10970 (SEQ ID NO: 34) de SEQ ID NO: 1, respectivamente. Más particularmente, tres sitios CpG en el intervalo de nucleótidos de 10952 a 10967 de SEQ ID NO: 1 pueden detectarse mediante el uso de los cebadores y sondas mencionados en la Tabla 4.

Oligonucleótidos cebadores inespecíficos de metilación

En una realización alternativa, el estado de metilación de posiciones CpG preseleccionadas dentro de una o más de las secuencias de ácido nucleico seleccionadas del grupo que comprende SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18 se analiza utilizando cebadores que no son específicos de la metilación, pero específicos del ADN convertido con bisulfito (es decir, se hibridan sólo con el ADN convertido cubriendo al menos un C convertido). En este caso, la especificidad de la metilación se logra mediante el uso de oligonucleótidos bloqueadores específicos de la metilación, que se hibridan específicamente con sitios CpG convertidos o no convertidos y, de este modo, terminan la polimerización por PCR. En esta realización alternativa, la etapa de amplificar comprende una PCR en tiempo real como se divulga en WO 2007/03128, en particular HeavyMetil™. En el contexto de la presente invención, el término "HeavyMetil™" se refiere a un ensayo de metilación que comprende sondas de bloqueo específicas de metilación que cubren posiciones CpG entre los cebadores de amplificación.

Específicamente, un "oligonucleótido bloqueador" o "sonda bloqueadora" puede ser un bloqueador que impide la extensión del cebador situado en la dirección ascendente del oligonucleótido bloqueador. Comprende nucleósidos/nucleótidos que tienen una cadena principal resistente a la actividad nucleasa 5' de la polimerasa. Esto se puede lograr, por ejemplo, al comprender ácido nucleico peptídico (PNA), ácido nucleico bloqueado (LNA), morfolino, ácido nucleico de glicol (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA), ácidos nucleicos puenteados (BNA), N3'-Oligómeros de fosforamido (NP) de P5', oligonucleótidos unidos a aglutinantes de surcos menores (oligonucleótidos unidos a MGB), oligómeros de fosforotioato (PS), oligómeros de alquilfosfonato CrC₄, fosforamidatos, oligonucleótidos de β-fosfodiéster, oligonucleótidos de α-fosfodiéster o una combinación de los mismos. Alternativamente, puede ser un oligonucleótido no extensible con un sitio de unión en la cadena sencilla de ADN que se superpone con el sitio de unión de un oligonucleótido cebador. Cuando el bloqueador se une, el cebador no puede unirse y, por lo tanto, no se genera el amplicón. Cuando el bloqueador no está unido, el sitio de unión del cebador es accesible y se genera el amplicón. Para dicho bloqueador superpuesto, es preferible que la afinidad del bloqueador sea mayor que la afinidad del cebador por el ADN. Además, un oligonucleótido bloqueador no puede actuar por sí solo como cebador (es decir, no puede extenderse mediante una polimerasa) debido a un extremo 3' no extensible.

En una realización preferida, se usa un conjunto de al menos dos oligonucleótidos cebadores para amplificar secuencias de ADN de una de las SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 30 y secuencias complementarias de las mismas, o segmentos de las mismas.

En una realización particularmente preferida, dichos al menos dos cebadores comprenden cada uno una secuencia contigua de al menos 18 nucleótidos de longitud que es complementaria o se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 30 y secuencias complementarias de las mismas, o segmentos de las mismas.

Los cebadores no específicos de metilación particulares para su uso en la determinación del estado de metilación de PITX2 se enumeran en la Tabla 5.

Tabla 5: Cebadores y amplificadores no específicos de metilación para uso en análisis de metilación de PITX2

Gene	Cebador directo de la SEQ ID NO:	Cebador inverso de la SEQ ID NO:	Amplificación genómica de la SEQ ID NO:	Amplificación de la secuencia metilada pretratada (en sentido) de la SEQ ID NO:	Amplificación de la secuencia metilada pretratada (antisentido) de la SEQ ID NO:	Amplificación de la secuencia no metilada pretratada (en sentido) de la SEQ ID NO:	Amplificación de la secuencia no metilada pretratada (antisentido) de la SEQ ID NO:
PITX2	38	40	42	44	46	48	50
PITX2	39	41	43	45	47	49	51

El producto de amplificación resultante se aísla y se usa como plantilla para determinar el estado de metilación de al menos un dinucleótido CpG.

De acuerdo con lo anterior, en una siguiente etapa, se determina el estado de metilación del ADN diana, basándose en la presencia o ausencia de, o en la cantidad de, dicho amplificado.

En el contexto de la presente invención, el término "estado de metilación" se refiere al grado de metilación presente en un ácido nucleico de interés. Esto puede expresarse en términos absolutos o relativos, es decir, como porcentaje u otro valor numérico o en comparación con otro tejido y puede describirse como hipermetilado, hipometilado o con un estado de metilación significativamente similar o idéntico.

El estado de metilación del ADN diana se puede determinar mediante uno o más métodos tomados del grupo que consiste en análisis de hibridación de oligonucleótidos, Ms-SnuPE, secuenciación, sondas de detección en tiempo real y análisis de matrices de oligonucleótidos. Estos métodos pueden realizarse como se conoce comúnmente en la técnica y/o como se divulga en WO 2007/03128.

- 5 En una realización particularmente preferida, el estado de metilación de PITX2 se determina mediante PCR cuantitativa en tiempo real (QM-PCR) como se describe por Harbeck et al. 2008; J Clin Oncol; 26:5036-5042 o como en patente EP1561821 B1.

- 10 En una realización preferida, el estado de metilación se determina usando oligonucleótidos que detectan el estado de metilación de citosina dentro del ADN genómico o pretratado, e acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 30. Se prefiere particularmente que dichos oligonucleótidos comprendan una secuencia de ácido nucleico que tenga una longitud de al menos nueve nucleótidos que se hibrida, en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas (como se define aquí anteriormente), con una secuencia de ácido nucleico tratada de acuerdo con SEQ ID NO: 4 a SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 19 a SEQ ID NO: 30 y/o secuencias complementarias a las mismas, o a una secuencia genómica de acuerdo con SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 16 a SEQ ID NO: 18 y/o secuencias complementarias de las mismas. Lo más preferiblemente, los oligonucleótidos de detección para determinar el estado de metilación de PITX2 se seleccionan de SEQ ID NO: 52 a SEQ ID NO: 71.

Valor predictivo de la hipometilación de PITX2

- 20 A partir del estado de metilación determinado por cualquiera de los métodos aquí descritos o mencionados, se puede predecir el resultado del tratamiento neoadyuvante de un paciente con TNBC. Específicamente, se descubrió que la hipometilación de PITX2 es indicativa de un resultado clínico deficiente de la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas.

- 25 El término "resultado clínico deficiente" como se utiliza en el presente documento significa la ausencia de remisión patológica completa (pCR), es decir, la presencia de cáncer invasivo residual después de completar la terapia sistémica neoadyuvante. Si bien los pacientes con TNBC con pCR tienen un buen pronóstico y no necesitan tratamiento sistémico adicional, los pacientes sin pCR podrían beneficiarse de una terapia sistémica adyuvante adicional.

Preferiblemente, el término "resultado clínico deficiente" como se usa en el presente documento se refiere a pCR 0-1 de acuerdo con Sinn et al. (ver tabla 1).

- 30 El término "hipometilación" como se usa en el presente documento se refiere a un patrón o estado de metilación aberrante (es decir, la presencia o ausencia de metilación de uno o más nucleótidos), en el que uno o más nucleótidos, preferiblemente C(s) de un sitio(s) CpG, no están metilados en comparación con un control.

- 35 En una realización, dicho control puede ser el mismo ADN genómico de una célula no cancerosa del paciente o de un sujeto que no sufre o ha padecido el cáncer por el que se trata al paciente, preferiblemente cualquier cáncer (control sano). En particular, puede referirse a una presencia disminuida de 5-mCyt en uno o una pluralidad de dinucleótidos CpG dentro de una secuencia de ADN comprendida en una muestra biológica, en relación con la cantidad de 5-mCyt encontrada en los dinucleótidos CpG correspondientes dentro de una muestra de ADN de control sano.

- 40 En una realización alternativa, el término "control", como se usa en el presente documento, puede referirse a una muestra de referencia que comprende ADN de control con una concentración de ADN conocida y un estado de metilación diana conocido. En esta realización alternativa, el ADN de control es preferiblemente, pero no necesariamente, ADN humano que está metilado artificialmente, preferiblemente sustancialmente completamente metilado. Preferiblemente, dicha metilación artificial se logra utilizando ADN-metiltransferasas. El propio ADN puede ser, por ejemplo, ADN de estirpe celular, ADN plasmídico, ADN artificial o combinaciones/mezclas de los mismos. El ADN genómico sustancialmente completamente metilado es preferiblemente ADN, particularmente ADN genómico, que tiene todos o sustancialmente todos los sitios CpG metilados. "Prácticamente todos" a este respecto significa al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.5 % o 99.9 %. Se prefiere que la metilación de todos o sustancialmente todos los sitios CpG se logre tratando el ADN con una CpG metiltransferasa de una manera que proporcione la metilación de todos o sustancialmente todos los sitios CpG.

- 50 En una realización preferida, el término "hipometilación" como se usa en el presente documento se refiere a un grado de metilación del ADN diana de hasta el 95 %, hasta el 90 %, hasta el 80 %, hasta el 70 %, hasta el 60 %, hasta un 50 %, hasta un 40 %, hasta un 30 %, hasta un 20 % o hasta un 10 % menos que un grado de metilación de un control como se define en el presente documento.

- 55 En una realización preferida adicional, el término "hipometilación" como se usa en el presente documento se refiere a una relación porcentual de metilación (PMR) del ADN diana de menos del 5 % de PMR, menos del 4 % de PMR o menos del 3 % de PMR y, preferiblemente, de menos del 2 % de PMR, o menos del 1 % de PMR. Dicha relación porcentual de metilación (PMR) puede determinarse mediante transformación de datos de valores de CT obtenidos de PCR cuantitativa específica de metilación y un método $2^{\text{exp} \Delta \text{CT}}$ modificado para un sistema de sonda dúplex, con calibración interna y estandarización de acuerdo con la siguiente fórmula:

PMR (pocillo de muestra):

$$1/(1 + 2^{\exp(CT_{\text{met.}} - CT_{\text{sin met.}})}).$$

MV PMR (duplicado de muestra): (PMR (pocillo de muestra 1) + PMR (pocillo de muestra 2))/2 Error (absoluto): STDEV MV PMR (duplicado de muestra).

5 met. = marcado metilada

sin met. = marcado sin metilar

PMR = Relación porcentual de metilación

MV PMR (duplicado de muestra): Valor medio de los valores de PMR calculados para cada pocillo por separado en el duplicado del ensayo técnico de una muestra.

10 CT = Umbral del ciclo. Número de ciclo de PCR, en el que la señal fluorescente del tinte indicador llega a un ensayo umbral específico. Para un análisis más detallado, se estableció el valor medio y STDEV de las réplicas técnicas (n = 2).

STDEV = Desviación estándar del valor medio PMR para las réplicas técnicas.

15 Se incluyen mezclas de plásmidos de referencia de control (entrada de 2500 copias por pocillo: 1: 1 mezcla en el caso de REF50) que contienen la secuencia completamente metilada y completamente no metilada convertida con bisulfito que se va a amplificar mediante el ensayo se pueden usar para la cuantificación absoluta de copias metiladas y sin metilar del promotor del gen PITX2 en una muestra de acuerdo con la siguiente fórmula:

Número de copia metilada (muestra):

$$1250/(2^{\exp(CT_{\text{muestra met}} - CT_{\text{met REF50}})}).$$

20 Número de copia sin metilar (muestra):

$$1250/(2^{\exp(CT_{\text{muestra sin met}} - CT_{\text{sin met REF50}})}).$$

CT_{met REF50}: Valor CT de la señal metilada de la muestra de referencia 50 (1250 copias metiladas y 1250 no metiladas ingresadas por pocillo de ensayo).

25 CT_{sin met REF50}: Valor CT de la señal no metilada de la muestra de referencia 50 (1250 copias metiladas y 1250 no metiladas ingresadas por pocillo de ensayo).

30 El término "hipometilación de PITX2" como se usa en el presente documento se refiere a hipometilación del gen y/o secuencia genómica del factor de transcripción de homeodominio 2 (PITX2) y/o secuencias reguladoras del mismo y, preferiblemente, a hipometilación de uno o más sitios CpG dentro de dicho gen y/o secuencia genómica y/o regiones reguladoras, preferiblemente dentro de la región genómica con SEQ ID NO: 1, más preferiblemente dentro de la región genómica con SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 y lo más preferiblemente dentro de la región genómica con SEQ ID NO: 2.

Selección de terapia

35 Dependiendo del estado de metilación determinado por cualquiera de los métodos aquí descritos o mencionados, se puede determinar un régimen de tratamiento adecuado para un paciente que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC). Si bien se recomienda la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas en ausencia de hipometilación de PITX2, se debe seleccionar una terapia alternativa no basada en antraciclinas para pacientes con TNBC que muestren dicha hipometilación.

40 En una realización preferida, la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina se selecciona para pacientes que exhiben un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >1 % de PMR y, preferiblemente, para pacientes que exhiben un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >2 % de PMR.

Ejemplo 1

Se realizó un análisis retrospectivo de 120 muestras de tumores de pacientes con cáncer de mama triple negativo tratados en el entorno neoadyuvante con terapia basada en antraciclina y se determinó el valor de corte óptimo del estado de metilación de PITX2 para predecir la pCR en pacientes con TNBC.

45 Ejemplo 2

Además, se llevó a cabo un ensayo clínico prospectivo para respaldar los resultados del análisis retrospectivo. Este estudio ha determinado prospectivamente la eficacia diagnóstica de la “prueba PITX2” para predecir la pCR para la terapia combinada basada en antraciclina. El estudio prospectivo se describió de la siguiente manera:

Título

- 5 Ensayo prospectivo para predecir la eficacia de quimioterapia neoadyuvante basada en platino por BRCAness y PITX2 en pacientes con cáncer de mama triple negativo (ensayo P⁴)

Diseño del estudio

- 10 A excepción de algunas biopsias de tejido obtenidas durante una biopsia de diagnóstico realizada de forma rutinaria y tres muestras de sangre tomadas, los pacientes con TNBC fueron tratados de acuerdo con el estándar de atención. El estándar de atención para estos pacientes consiste en 24 semanas de NAC (4 ciclos de EC, seguidos de 12 semanas de carboplatino), seguido de cirugía primaria. Posteriormente, los pacientes sin pCR recibieron tratamiento adyuvante adicional con 12 x paclitaxel semanalmente mientras que los pacientes con pCR fueron sometidos a vigilancia activa. La cirugía primaria se consideró el final de la parte activa del estudio, mientras que el seguimiento se realizó durante 3 años para determinar la supervivencia libre de enfermedad (DFS) y la supervivencia general (OS).

- 15 Muestreo de tejido y sangre

Tejido: Se recogieron biopsias centrales previas al tratamiento, se fijaron con formalina y se incluyeron en parafina (FFPE). Se proporcionaron muestras de tejido tumoral FFPE para su evaluación mediante las pruebas PITX2 y MI,PA. Se proporcionaron instrucciones detalladas a todos los sitios para permitir un muestreo y procesamiento consistentes de los tejidos.

- 20 Sangre: Se tomaron muestras de sangre con EDTA anticoagulada en tres momentos para analizar el ADN en circulación libre para determinar el estado de metilación de PITX2.

Prueba de diagnóstico PITX2

- 25 El estado de metilación de la región promotora del gen PITX2 se determinó como se describe por Harbeck et al. 2008; J Clin Oncol; 26:5036-5042. Para ello, se tomaron muestras de tejido FFPE y se enviaron a un laboratorio central para evaluar el estado de metilación del ADN. El laboratorio central realizó extracción de ADN, conversión con bisulfito y PCR cuantitativa en tiempo real específica de metilación. Las puntuaciones de metilación del PITX2 (“Prueba PITX2”) se calcularon y clasificaron como PITX2 alto o PITX2 bajo de acuerdo con un punto de corte predefinido.

Definición y evaluación de PCR

- 30 La pCR se definió como la ausencia de cáncer invasivo residual mediante evaluación histológica (tinción de hematoxilina-eosina) de la muestra de mama resecada completa y de todos los ganglios linfáticos regionales de los que se tomaron muestras, luego de completar la terapia sistémica neoadyuvante (es decir, ypT0/Tis ypN0 en el sistema estadificación actual del AJCC). Los patólogos locales y un patólogo central evaluaron las secciones histológicas de los bloques tumorales FFPE para determinar la respuesta patológica.

Objetivos

- 35 Objetivo primario

- Emplear la prueba PITX2 como prueba de biomarcadores para la predicción de pCR en pacientes con TNBC después de la terapia con NAC EC/carboplatino (la tasa de pCR del PITX2-bajo es ≤ 20 % en comparación con PITX2-alto es ≥ 50 %)

Objetivos secundarios

- 40 • Determinar el BRCAness en muestras de tumores FFPE como marcador predictivo de pCR en pacientes con TNBC después del tratamiento con EC/carboplatino (la tasa de pCR de los pacientes con BRCAness positivo es ≥ 20 % mayor en comparación con los pacientes con BRCAness negativo)
- 45 • Determinar la eficacia diagnóstica (sensibilidad, especificidad, precisión, PPV y NPV) de la puntuación de la prueba PITX2 determinada en muestras de tumores FFPE para predecir la pCR en pacientes con TNBC después de NAC
- 45 • Determine la puntuación de la prueba PITX2 en muestras de tumores FFPE para predecir el resultado del paciente (DFS/OS)
- Determinar la correlación de los factores clínico-patológicos (estadio, grado nuclear, estado nodal, grado de remisión patológica de acuerdo con Sinn, edad, programa de tratamiento) con la puntuación de la prueba PITX2 obtenida mediante la prueba PITX2
- 50 • Determinar la correlación de factores clínico-patológicos (estadio, grado nuclear, estado nodal, grado de remisión patológica de acuerdo con Sinn, edad, esquema de tratamiento) con BRCAness como prueba predictiva.

Objetivos exploratorios

- Determinar la correlación de PITX2 cuantificado en muestras de tumores FFPE con PITX2 cuantificado a partir de ADN circulante en sangre.

Población de pacientes

Criterios de inclusión principales

1. Femenino
2. ≥18 años al momento del consentimiento informado por escrito
3. Consentimiento informado por escrito para proporcionar muestras de biomarcadores, datos clínico-patológicos y cumplir con un seguimiento de 60 meses.
4. Pacientes con TNBC no metastásico confirmado histológicamente (HER2 negativo mediante tinción FISH o IHC 0 o 1+, 2+ (sin embargo, solo si FISH es negativo), ER y PR negativo de acuerdo con evaluación inmunohistoquímica local, <10 % de células reactivas)
5. Indicación de quimioterapia primaria, sistémica y neoadyuvante.

Metodología estadística

Cálculo del tamaño de la muestra

- 15 El objetivo principal del estudio fue determinar la eficacia diagnóstica al comparar la tasa de pCR en pacientes con PITX2 bajo de <20 % con la tasa de pCR en pacientes con PITX2 alto de >50 %. Además, se asumió que la prevalencia de pacientes con niveles bajos de PITX2 será aproximadamente del 33 %. Con base en estos supuestos, utilizando una potencia del 90 % y un nivel de significancia del 5 % (bilateral), se determinó que el tamaño total de la muestra era de aproximadamente 200 pacientes.

- 20 Análisis estadístico:

Objetivos principales: El objetivo principal del estudio fue determinar la eficacia diagnóstica al comparar la tasa de pCR en pacientes con PITX2 bajo con la tasa de pCR en pacientes con PITX2 alto. Esta comparación se realizará con la prueba de Chi-cuadrado. Además, se aplicó un análisis de regresión logística para identificar variables que también están asociadas con la tasa de pCR. Los cálculos se realizan utilizando el software PASS 11.

- 25 Objetivos secundarios: Para la determinación de BRCAness como marcador predictivo de pCR en pacientes con TNBC después de un tratamiento con CE/carboplatino (la tasa de pCR de pacientes con BRCAness positivo es ≥20 % mayor en comparación con los pacientes con BRCAness negativo), se requiere un tamaño de muestra de aproximadamente 200 pacientes utilizando un poder del 90 % y un nivel de significancia del 5 % (bilateral). El potencial predictivo de la puntuación de la prueba PITX2 se probó mediante análisis de Kaplan Meier que muestran la OS y la DFS para
- 30 pacientes con PITX2 alto y PITX2 bajo. Se incluyeron factores clínico-patológicos (estadio, grado nuclear, estado ganglionar, grado de remisión patológica de acuerdo con Sinn, edad, programa de tratamiento) como covariables para probar si la metilación del ADN del PITX2 agrega información predictiva y/o pronóstica estadísticamente independiente. Para ello, se aplicaron modelos proporcionales multivariantes de Cox para calcular los índices de riesgo y sus intervalos de confianza del 95 %.

- 35 Ejemplo 3

Se estableció un ensayo para evaluar el estado de metilación del ADN del gen promotor PITX2 extraído de tejido tumoral de mama fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE) (en el presente documento denominado "prueba PITX2").

- 40 La prueba PITX2 predice la respuesta a la terapia en pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) tratados con terapia sistémica contra el cáncer en el entorno (neo)adyuvante. En resumen, comprende la extracción de ADN a partir de secciones de biopsia central fijadas con formalina e incluidas en parafina (5 µm con una superficie total de 30-600 mm², 1-2 secciones, QIAamp DSP^{CE} Kit DNA FFPE, Qiagen, Hilden), determinación de concentración mediante medición de OD (QiaXpert, Qiagen Hilden), conversión de bisulfito (Epitect Fast Bisulfite Kit, Qiagen, Hilden, opcional con etapa de limpieza semiautomático en QIAcube, Qiagen, Hilden) y análisis semicuantitativo del estado de metilación
- 45 del ADN en la región promotora del gen PITX2 mediante PCR cuantitativa en tiempo real con sondas Taqman marcadas dualmente específicas para el estado metilado y no metilado de 3 CpG en el gen promotor del PITX2 en el Rotorgene Q 5- Plataforma plex HRM (Qiagen, Hilden) que utiliza el software Rotorgene Q para el análisis de datos. Se proporciona una descripción general del flujo de trabajo de la prueba PITX2 en Figura 1. En concreto, esta prueba se realizó de la siguiente manera:

- 50 Aislamiento de ADN de tejido de cáncer de mama fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE)

Se cortaron secciones de 1 a 2 x 5 µm con una superficie total de 30-600 mm² a partir de bloques de tejido tumoral FFPE de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Kit de FFPE de ADN de QIAamp DSP^{CE}). Opcionalmente, se ha realizado una macrodissección de las muestras de tumores incluidas en parafina para enriquecer el contenido de células tumorales en la muestra de extracción. El material FFPE se transfirió a un tubo de reacción de 1.5 ml libre de nucleasas y se realizó la desparafinación usando xileno y etanol. Posteriormente, se realizó una etapa de digestión con proteinasa K durante la noche, se desmodificaron los entrecruzamientos con formalina mediante una etapa de desreticulación a 90 °C durante 1 hora y el ADN se purificó de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Determinación de OD del ADN extraído.

Se determinó la concentración de ADN y se controló la calidad del ADN mediante análisis espectrofotométrico de las relaciones OD 260/280 y OD 230/260 utilizando un espectrofotómetro QIAxpert UV/VIS.

Conversión de bisulfito

Para el análisis cuantitativo específico de metilación, la conversión con bisulfito del ADN extraído se realizó utilizando el kit Epitect Fast Bisulfito de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Específicamente, se agregaron 120-1000 ng (cantidad de entrada recomendada de 400 ng) de solución de ADN a un tubo de reacción de PCR de 200 µl (por ejemplo, Eppendorf PCR-Tube) y se ajustó a un volumen final de 40 µl con agua libre de nucleasas.

Se añadieron 85 µl de solución de bisulfito seguidos inmediatamente de 15 µl de tampón DNA-Protect (color verde), se cerró inmediatamente la tapa y posteriormente se agitó en vórtice hasta que se obtuvo una mezcla de reacción de color azul homogénea. La conversión con bisulfito del ADN estuvo mediada por el siguiente programa térmico en un termociclador estándar (por ejemplo, Eppendorf PCR Cycler):

- 5 min, 95 °C (1. Etapa desnaturalizante)
- 10 min, 60 °C (incubación)
- 5 min, 95 °C (2. Etapa desnaturalizante)
- 10 min, 60 °C (incubación)
- infinito, 20 °C (almacenamiento)

La limpieza de la muestra siguió las instrucciones manuales o se realizó de forma semiautomática en la plataforma QIAcube.

PCR cuantitativa específica de metilación (qMS-PCR, MethyLight)

Para el marcador PITX2 un sistema de reacción MethyLight™ se estableció un sistema de reacción basado en sondas de hidrólisis marcadas con fluorescencia (para más detalles, consulte la patente europea EP 1 561 821). El sistema MethyLight™ contiene dos sondas marcadas con fluorescencia diferente (tintes fluorescentes FAM y HEX más Quencher, por ejemplo con TAMRA o BHQ1), específicas para el estado metilado (etiqueta FAM) y no metilado (etiqueta HEX) de los sitios CpG predictivos de respuesta clínica en el gen PITX2. Como control de referencia, se incluyeron como controles positivos 2500 copias de plásmidos que contenían la secuencia completamente metilada y completamente no metilada convertida con bisulfito para ser amplificada por el ensayo (Referencia 50 con una relación met:sin met 1: 1 y Referencia 10 con una relación met:sin met 1:9), así como ADN genómico como control negativo y no se utilizaron controles plantilla. La evaluación de cada muestra se realizó en duplicados técnicos o reacciones individuales en un volumen de reacción de 20 µl, de la siguiente manera: 1x mezcla de reacción: 10 µl de mezcla maestra para PCR de sonda Quantinova (2x, Qiagen, Hilden); 2 µl de mezcla maestra de cebador y sonda 10x que contiene sonda metilada y no metilada (2 µM) y ambos cebadores (6 µM); 5 µl de ADNbis (hasta 30-250 ng); 3 µl de H₂O hasta 20 µl de volumen final. Las concentraciones de reacción final de cebadores y sondas fueron 600 nM y 200 nM. Se pipetearon 15 µl de la mezcla maestra (que contiene cebadores y sondas, qPCR Mastermix y agua) en tiras de 4 tapas para su análisis en la plataforma Rotorgene qPCR (Qiagen, Hilden) y se agregaron 5 µl de ADN convertido con bisulfito o muestras de control, las tiras selladas y qPCR realizada de acuerdo con el siguiente protocolo:

Se utilizó una plantilla de protocolo qPCR estándar (plantilla qPCR PITX2) con 2 tintes indicadores (canal verde (FAM) y canal amarillo (HEX)) con el software Rotor Gene Q 2.3.1. No se utilizó ningún tinte de referencia interno. La compensación de ganancia automática en la muestra Pos 1 se realizó antes del comienzo de 1ª adquisición de señal de fluorescencia en el ciclo 1 de qPCR para optimizar el ajuste de ganancia para ambos tintes indicadores. La detección del estado de metilación respectivo se realizó en el modo de filtro del canal verde (estado metilado; 516 nm) y del canal amarillo (estado no metilado; 555 nm). El programa de PCR térmica contenía una etapa de activación de la polimerasa durante 2 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos con 5 segundos, 95 °C (etapa de desnaturalización) y 5 segundos, 60 °C (etapa de hibridación y elongación). La lectura de la señal de fluorescencia sigue en cada final del ciclo.

Análisis de los datos

Los valores de umbral del ciclo (CT) se determinaron automáticamente para cada marcador por separado mediante el software Rotor Gene Q Software 2.3.1. (compensación dinámica del pozo, corrección de línea de base adaptativa para los ciclos 2-10, configuración de umbral para el canal verde: 0.058 y para el canal amarillo: 0.015) mediante el

transcurso de la lectura de la señal fluorescente durante el programa del ciclo de PCR e incluyendo la corrección adaptativa de la línea de base. La transformación de datos de los valores de CT en valores de relación porcentual de metilación (PMR) se ve facilitada por un método $2^{\exp \Delta CT}$ modificado para un sistema de sonda dúplex, con calibración interna y estandarización de acuerdo con la siguiente fórmula:

5 PMR (pocillo de muestra):

$$1/(1 + 2^{\exp(CT_{\text{met.}} - CT_{\text{sin met.}})}).$$

MV PMR (duplicado de muestra):

$$(PMR (\text{pocillo de muestra 1}) + PMR (\text{pocillo de muestra 2}))/2$$

Error (absoluto): STDEV MV PMR (duplicado de muestra).

10 met. = marcado metilada

sin met. = marcado sin metilar

PMR = Relación porcentual de metilación

MV PMR (duplicado de muestra): Valor medio de los valores de PMR calculados para cada pocillo por separado en el duplicado del ensayo técnico de una muestra.

15 CT = Umbral del ciclo. Número de ciclo de PCR, en el que la señal fluorescente del tinte indicador alcanza un umbral específico del ensayo. Para un análisis más detallado, se estableció el valor medio y STDEV de las réplicas técnicas (n = 2).

STDEV = Desviación estándar del valor medio PMR para las réplicas técnicas.

20 Control de calidad del rendimiento del ensayo: El valor CT de al menos una señal de sonda del sistema dúplex debía ser < 31.5.

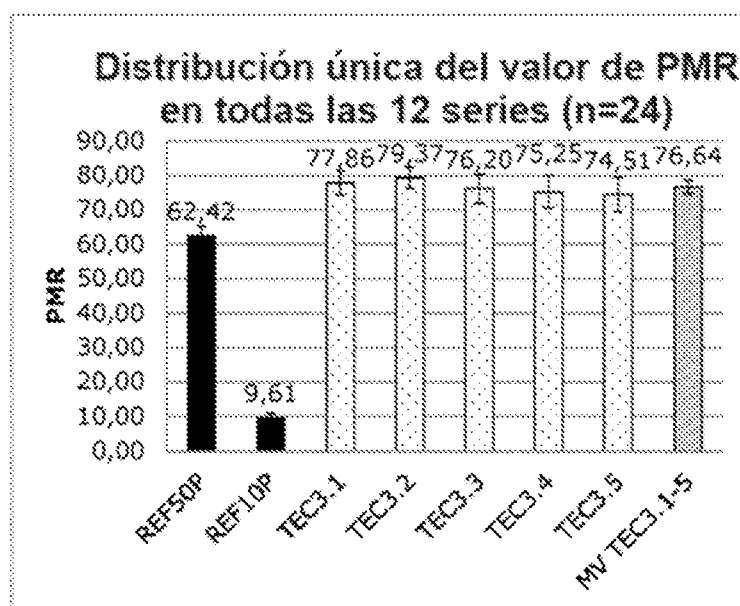
Ejemplo 4

Además, se determinaron las variaciones del valor de PMR (heterogeneidad) entre secciones consecutivas de tejido tumoral y se evaluó la reproducibilidad de los valores de PMR en 12 series de qPCR independientes.

25 Por lo tanto, se obtuvieron cinco secciones de tejido de 5 µm de espesor cada una de un bloque de tumor FFPE de una paciente con cáncer de mama (TEC3). Se extrajo ADN de estas secciones de tejido, se convirtió con bisulfito y se determinó PMR (%) en 12 series de qPCR independientes realizadas por duplicado de acuerdo con el ensayo descrito en el Ejemplo 3 anterior (ver Figura 1). Se proporciona una descripción general de este flujo de trabajo en la Figura 2.

Resultados

30 Los valores medios de los análisis de 24 PMR para cada una de las 5 secciones de tejido se muestran en el siguiente gráfico:



REF50P/10P: Mezclas de plásmidos de referencia (met:sin met 1:1 y 1:9)

Los valores medios y las desviaciones estándar de las 12 series de qPCR (diseño idéntico al gráfico anterior), así como los valores máximo y mínimo (REF50P y REF10P son referencias en el ensayo) se dan en la Tabla 6 abajo:

5

Tabla 6

Muestra	MV todo	STDEV todos	CV todos	Máximo	Mínimo
REF50P	62.42	2.91	4.66 %	67.13	57.57
REF10P	9.61	1.27	13.26 %	11.89	7.57
TEC3.1	77.86	3.54	4.55 %	83.98	69.97
TEC3.2	79.37	3.21	4.04 %	86.98	74.54
TEC3.3	76.20	4.22	5.53 %	83.12	69.82
TEC3.4	75.25	4.65	6.18 %	84.35	64.95
TEC3.5	74.51	5.06	6.79 %	84.16	62.71
MV TEC3.1-5	76.64	1.98	2.58 %		

El experimento se repitió con otros 7 bloques tumorales FFPE de cáncer de mama. Con respecto a la heterogeneidad del tejido tumoral del estado de metilación del ADN del promotor del gen PITX2, se obtuvieron resultados comparables como se muestra arriba.

10 Conclusión

La heterogeneidad tisular del promotor del gen PITX2. El estado de metilación del ADN (PMR %) es muy bajo, según se evaluó en 5 secciones consecutivas. La reproducibilidad es muy sólida con un coeficiente de variación (CV) del 2.58 %.

Ejemplo 5

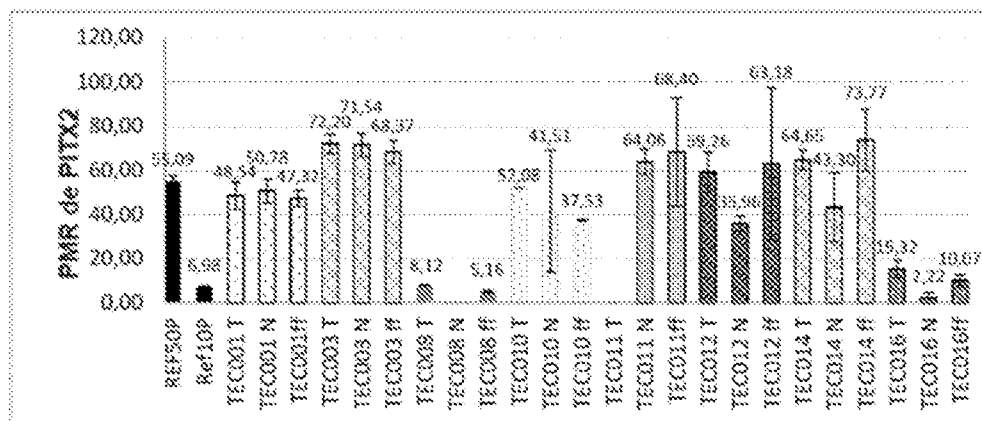
15 Además, se evaluó el estado de metilación del ADN del promotor del gen PITX2 en secciones de tejido FFPE de cáncer de mama de cara completa con contenido alto o bajo de células tumorales y se comparó con tejido macrodisecionado enriquecido en contenido de células tumorales de los mismos bloques tumorales FFPE.

Por lo tanto, las macrodisecciones se realizaron primero mediante la inspección de una sección correspondiente teñida con hematoxilina y eosina para detectar el área del tumor con alto contenido de tumor por parte de un patólogo

experimentado, marcando el área del tumor correspondiente en una sección de FFPE sin tefir y sin procesar mediante una superposición óptica con un marcador permanente, raspando de áreas de tejido con bajo contenido de tumor asociadas con una hoja de bisturí y transferencia de áreas enriquecidas con tumor, así como áreas con bajo contenido de tumor en tubos Eppendorf separados (correspondientes a las muestras TECXXXT y TECXXXN) y procesados de acuerdo con el mismo flujo de trabajo que en el Ejemplo 3. Se prepararon secciones de cara completa a partir de secciones completas (TECXXXff) mediante el mismo flujo de trabajo que en el Ejemplo 3 (ver figura 3). Se extrajo ADN de estas secciones de tejido, se convirtió con bisulfito y se determinó la PMR (%) de acuerdo con el ensayo descrito en el Ejemplo 3 anterior (ver Figura 1).

Resultados

Los valores medios de los análisis de PMR para áreas de tejido macrodisecado con contenido alto (T) o bajo (N) de células tumorales en comparación con secciones de tejido tumoral FFPE de cara completa (ff) se muestran en el siguiente gráfico:



Conclusión

Para el cáncer de mama macrodisecado con alto contenido de células tumorales (T) y secciones de cara completa (ff) del mismo bloque tumoral se obtuvieron resultados similares para el estado de metilación del ADN del PITX2. Las secciones de tumores FFPE macrodisecadas que contienen un bajo contenido de células tumorales (N) mostraron valores de PMR más bajos en comparación con las muestras de cara completa no disecadas.

Ejemplo 6

Además, el estado de metilación del ADN de PITX2 se determinó en 21 biopsias centrales FFPE tomadas de pacientes con cáncer de mama triple negativo (TNBC) tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclina y se correlacionaron con datos de remisión patológica completa (pCR).

Selección de pacientes

Solo se incluyeron en el estudio pacientes con TNBC, que tenían receptores de estrógeno (ER) y receptores de progesterona (PR) negativos con <1 % de células tumorales positivas para ER/PR y con estado de HER2 negativo (puntuación inmunorreactiva 0 o 1 si FISH HER2 la prueba de amplificación fue negativa).

Ensayo de metilación de PITX2 y correlación de pCR

La extracción de ADN de secciones de biopsia central FFPE, la conversión con bisulfito y el análisis semicuantitativo del estado de metilación del ADN en la región promotora del gen PITX2 se realizaron de acuerdo con el ensayo de metilación del PITX2 descrito en Ejemplo 3 arriba (ver Figura 1). El estado de metilación del ADN del PITX2 (PMR %) en secciones de tejido tumoral TNBC FFPE se correlacionó con la remisión patológica completa (pCR) de acuerdo con Sinn et al. (ver tabla 1).

Esquema experimental

Se realizaron dos Experimentos 1 y 2 independientes y los resultados se correlacionaron entre sí.

Experimento 1:

Se realizaron dos series experimentales independientes y se tomaron los valores medios para ambos experimentos. Los pacientes con TNBC incluyeron pCR 2-4 de acuerdo con Sinn et al. Los datos brutos y los resultados de correlación de las dos series experimentales independientes del Experimento 1 se dan en Tabla 7 y el siguiente gráfico:

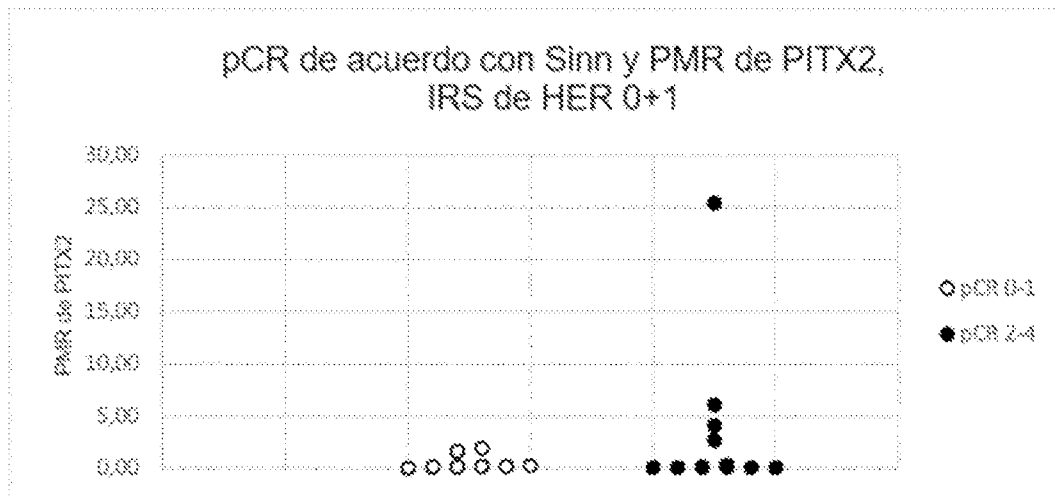


Tabla 7: Datos brutos del Experimento 1

pCR de acuerdo con Sinn	Muestra de la primera serie	MV ambas series	CV ambas series
1	Tneo15	0.01	0.00
1	Tneo31	0.13	0.04
1	Tneo14	0.13	0.04
0-1	Tneo48	0.17	0.09
1	Tneo42	0.20	0.03
1	Tneo 10	0.23	0.21
1	Tneo43	1.58	1.79
1	Tneo49	1.91	1.35
4	Tneo04	0.02	0.01
4	Tneo32	0.03	0.01
4	Tneo18	0.04	0.02
4	Tneo12	0.04	0.01
4	Tneo47	0.04	0.01
4	Tneo03	0.06	0.02
2	Tneo28	0.13	0.14
4	Tneo11	0.30	0.23
4	Tneo40	2.67	1.73
3	Tneo19	4.10	0.54
4	Tneo22	6.04	0.78
2	Tneo34	25.37	5.08

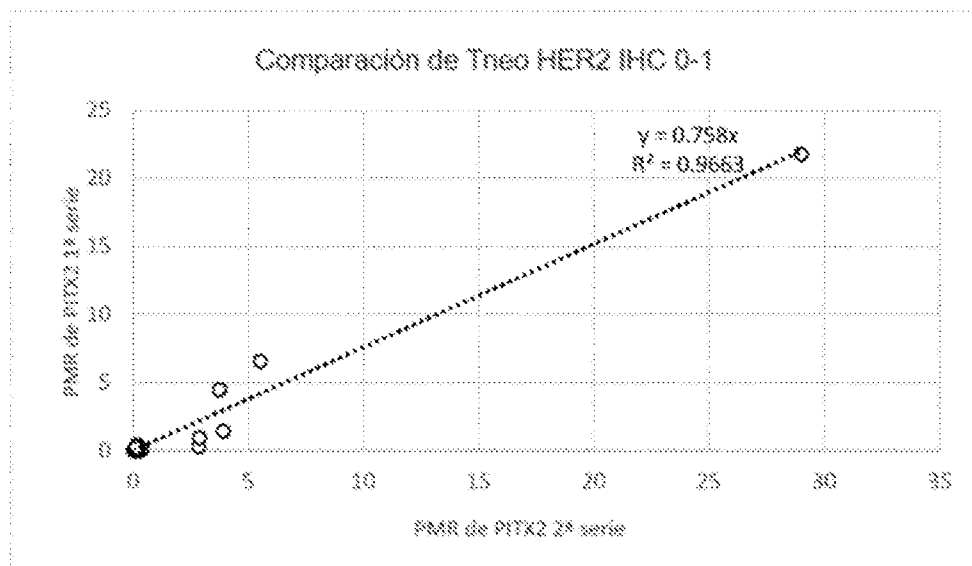
Resultados

- Los valores medios de PMR (%) de muestras de tejidos tumorales TNBC FFPE para pacientes sin respuesta (Sinn 0-1) fueron del 0.54 %, los pacientes con pCR (Sinn 2-4) tuvieron un valor medio de 3.24 %, es decir, un aumento de 6 veces de PMR (%).
- La aplicación de un valor de corte del 2 % de PMR deja a 8 de 8 muestras de tumores de pacientes sin identificación de la respuesta al tratamiento (Sinn 0-1).
- Aplicando el mismo valor de corte de 2 % de PMR, 4 de 12 muestras de tumores de pacientes con pCR (Sinn 2-4) tuvieron PMR superiores al 2 %.
- Si el PITX2 está metilado >2 % de PMR; 4 de cada 4 muestras metiladas con el PITX2 fueron pCR (Sinn 2-4), lo que corresponde a un valor predictivo positivo* del 100 %.
- Si el ADN del PITX2 está metilado <2 % de PMR, 8 de 16 muestras de tumores se definieron como no respondedores, lo que corresponde a un valor predictivo negativo* del 50 %.

*El valor predictivo positivo se refiere al número de respondedores pronosticados correctamente dividido por el número total de pacientes con un resultado positivo del biomarcador, mientras que el valor predictivo negativo se refiere al número de no respondedores pronosticados correctamente dividido por el número total de pacientes con un resultado negativo del biomarcador.

Correlación de resultados experimentales

Además, los resultados de las dos series de qPCR independientes (utilizando lotes de conversión de bisulfito independientes) del Experimento 1 se correlacionaron entre sí como se demuestra en el siguiente gráfico. Se obtuvo una alta correlación estadística para las dos series de qPCR independientes con un coeficiente de correlación de $R = 0.983$, lo que demuestra que se extrae suficiente ADN de biopsias centrales FFPE de cáncer de mama para obtener valores PMR del PITX2 reproducibles.



HER2: Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

IHC: Puntuación inmunorreactiva (IRS) 0-3. 0 = sin expresión de proteínas; 1 = baja expresión de proteínas; 2 = expresión proteica moderada; 3 = alta expresión de proteínas. La puntuación 2 solo califica para terapia dirigida si la prueba de amplificación del gen FISH HER2 es positiva.

Experimento 2:

Se realizó una única serie experimental, en la que los pacientes con TNBC que mostraban 3 y 4 de acuerdo con Sinn et al. fueron incluidos en el análisis. Los datos brutos del Experimento 2 se dan en la Tabla 8 y los resultados de correlación del estado de metilación del ADN de PITX2 y la remisión patológica completa (pCR) se dan en Tabla 9 abajo:

Tabla 8: Datos brutos del Experimento 2

pCR de acuerdo con Sinn	Muestra de la primera serie	PMR duplicado	STDEV duplicado
1	Tneo15	0.01	0.00

1	Tneo23	0.02	0.00
1	Tneo 10	0.08	0.01
1	Tneo31	0.16	0.01
1	Tneo14	0.16	0.04
1	Tneo42	0.22	0.01
0-1	Tneo48	0.23	0.24
1	Tneo43	0.31	0.29
1	Tneo49	0.96	0.96
1	Tneo24	12.95	0.88
4	Tneo32	0.03	0.00
4	Tneo04	0.03	0.00
4	Tneo12	0.03	0.00
4	Tneo47	0.05	0.00
4	Tneo18	0.05	0.01
4	Tneo03	0.08	0.01
4	Tneo11	0.46	0.18
4	Tneo40	1.45	0.01
4	Tneo25	2.15	0.50
3	Tneo19	4.48	1.87
4	Tneo22	6.59	1.11

Tabla 9: Resultados de correlación del Experimento 2

	pCR 0-1	pCR 3-4
Numero de muestra	10	11
< PMR 1 %	9	7
≥ PMR 1 %	1	4

Resultados

- 5
- Aplicar un valor de corte del 1 % de PMR, 9 de 16 muestras de tumores de pacientes no tienen respuesta (Sinn 0-1), con PMR <1 %.
 - Aplicar el mismo valor de corte de 1 % de PMR, 4 de 5 muestras de tumores de pacientes con pCR (Sinn 3-4) mostraron PMR > 1 %.
- 10
- Si el ADN del PITX2 está metilado > 1 % de PMR, 4 de cada 5 muestras de ADN metilado del PITX2 fueron pCR Sinn 3-4, lo que corresponde a un valor predictivo positivo* del 80 %.
 - Si el ADN del PITX2 está metilado <1 % de PMR, 9 de 16 muestras de tumores no respondieron, lo que corresponde a un valor predictivo negativo* del 56 %.

*El valor predictivo positivo se refiere al número de respondedores pronosticados correctamente dividido por el número total de pacientes con un resultado positivo del biomarcador, mientras que el valor predictivo negativo se refiere al número de no respondedores pronosticados correctamente dividido por el número total de pacientes con un resultado negativo del biomarcador.

15

Conclusiones

En los experimentos anteriores se determinó un valor de corte del 2 % de PMR para pacientes cuyo tumor había respondido a la quimioterapia neoadyuvante basada en antraciclinas de acuerdo con Sinn 2 a 4 (Experimento 1), y se determinó un valor de corte del 1 % de PMR para respuestas de acuerdo con Sinn 3 y 4 (Experimento 2).

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el resultado de la quimioterapia neoadyuvante de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC) que comprende las etapas:
 - a) proporcionar una muestra biológica del sujeto,
- 5 b) determinar la expresión o el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica del factor 2 de transcripción de homeodominio (PITX2) y/o secuencias reguladoras del mismo dentro de dicha muestra, y
- c) determinar a partir del mismo el resultado de un tratamiento de dicho sujeto.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa b) dicha expresión se determina mediante análisis del ADN genómico aislado de la muestra biológica.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicha expresión se establece al determinar el estado de metilación de uno o más sitios CpG dentro de dicho gen y/o secuencia genómica y/o regiones reguladoras del mismo, preferiblemente al convertir, en dicho ADN genómico, o un fragmento del mismo, citosina no metilada en la posición 5 con respecto a uracilo o con otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación (es decir, que no se hibrida con guanina).
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende poner en contacto ADN genómico aislado de una muestra biológica obtenida del sujeto con al menos un reactivo, o una serie de reactivos que distingue entre dinucleótidos CpG metilados y no metilados dentro de al menos una región diana de la región de ADN genómico, preferiblemente, en el que la región objetivo comprende, o hibrida bajo condiciones rigurosas con una secuencia de al menos 16 nucleótidos contiguos del gen PITX2 y/o regiones regulatorias del mismo, en el que dichos nucleótidos
- 20 contiguos incluyen al menos una secuencia de dinucleótidos CpG, y mediante el cual se predice, al menos en parte, el resultado del tratamiento con antraciclinas de trastornos proliferativos celulares.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en el que la hipometilación de PITX2 es indicadora de un resultado clínico deficiente de la quimioterapia neoadyuvante de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC).
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5,

 en el que la hipometilación es un grado de metilación del ADN diana de hasta el 95 %, hasta el 90 %, hasta el 80 %, hasta el 70 %, hasta el 60 %, hasta el 50 %, hasta el 40 %, hasta el 30 %, hasta un 20 %, o hasta un 10 % menos que un grado de metilación de un control; o

 en el que la hipometilación es una relación porcentual de metilación (PMR) del ADN diana de menos del 5 % de PMR, menos del 4 % de PMR, menos del 3 % de PMR, menos del 2 % de PMR, o menos del 1 % de PMR.
- 30 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además d) determinar un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto, preferiblemente en el que la etapa d) comprende determinar la quimioterapia neoadyuvante como un régimen de tratamiento adecuado para un sujeto que presenta un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >1 % de PMR, o un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de
- 35 >2 % de PMR.
8. Un método para predecir el resultado de la quimioterapia neoadyuvante en un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC), que comprende:
 - a) aislar ADN genómico de una muestra biológica del sujeto;
- 40 b) convertir, en dicho ADN genómico, o un fragmento del mismo, citosina no metilada en la posición 5 en uracilo o en otra base que sea detectablemente diferente a la citosina en términos de propiedades de hibridación (es decir, que no se hibrida con guanina);
- c) amplificar una región del ADN genómico convertido, o del fragmento convertido del mismo, usando al menos dos cebadores, en el que dicha región comprende al menos 16 nucleótidos contiguos del gen PITX2 y/o regiones reguladoras del mismo, en el que dichos nucleótidos contiguos comprenden al menos una secuencia de dinucleótidos CpG;
- 45 d) detectar la presencia o ausencia de, o la cantidad de ADN amplificado en la etapa c);
- e) determinar, en función de la presencia o ausencia de, o de la cantidad de dicho amplificado, el estado de metilación del gen y/o secuencia genómica de PITX2; y
- f) predecir a partir de dicho estado de metilación el resultado del tratamiento neoadyuvante.

9. El método de la reivindicación 8, en el que los al menos dos cebadores usados en la etapa c) comprenden cada uno una secuencia contigua de al menos 18 nucleótidos de longitud que es complementaria a, o se hibrida en condiciones moderadamente rigurosas o rigurosas con una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 30 y complementos de los mismos.
- 5 10. El método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, en el que la hipometilación de PITX2 es indicativa de un resultado clínico deficiente de la quimioterapia neoadyuvante de un sujeto que padece cáncer de mama triple negativo (TNBC), preferiblemente
- 10 en el que la hipometilación es un grado de metilación del ADN diana de hasta el 95 %, hasta el 90 %, hasta el 80 %, hasta el 70 %, hasta el 60 %, hasta el 50 %, hasta el 40 %, hasta el 30 %, hasta un 20 %, o hasta un 10 % menos que un grado de metilación de un control; o
- en el que la hipometilación es una relación de metilación porcentual (PMR) del ADN diana de menos del 5 % de PMR, menos del 4 % de PMR, menos del 3 % de PMR, menos del 2 % de PMR, o menos del 1 % de PMR.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además g) determinar un régimen de tratamiento adecuado para el sujeto.
- 15 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa g) comprende determinar la quimioterapia neoadyuvante como un régimen de tratamiento adecuado para un sujeto que presenta un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de >1 % de PMR, o un valor de relación porcentual de metilación (PMR) de > 2 % PMR.
13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la quimioterapia neoadyuvante es una quimioterapia basada en antraciclina.
- 20 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en fluidos corporales tales como aspirado de pezón, sangre, suero, plasma, células, estirpes celulares, células sanguíneas, tejido, biopsias de tejido y todas las posibles combinaciones de los mismos, preferiblemente en las que dicha muestra se proporciona en un estado seleccionado del grupo que consiste en estado natural, congelado, liofilizado, conservado, embebido, embebido en parafina y todas las combinaciones posibles de
- 25 los mismos, más preferiblemente en el que la muestra es una muestra de tejido embebida en parafina o una muestra de sangre anticoagulada.
15. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que un criterio de valoración del resultado clínico es la remisión patológica completa (pCR).

Figura 1

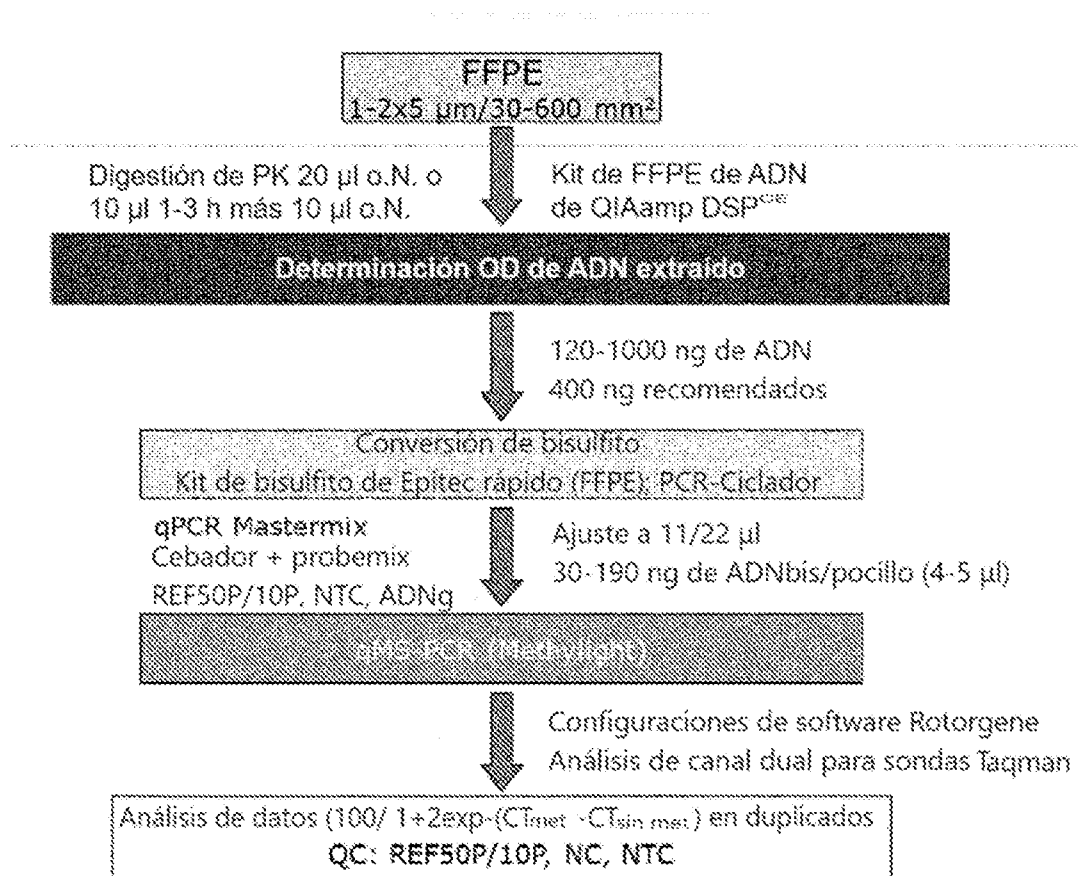


Figura 2

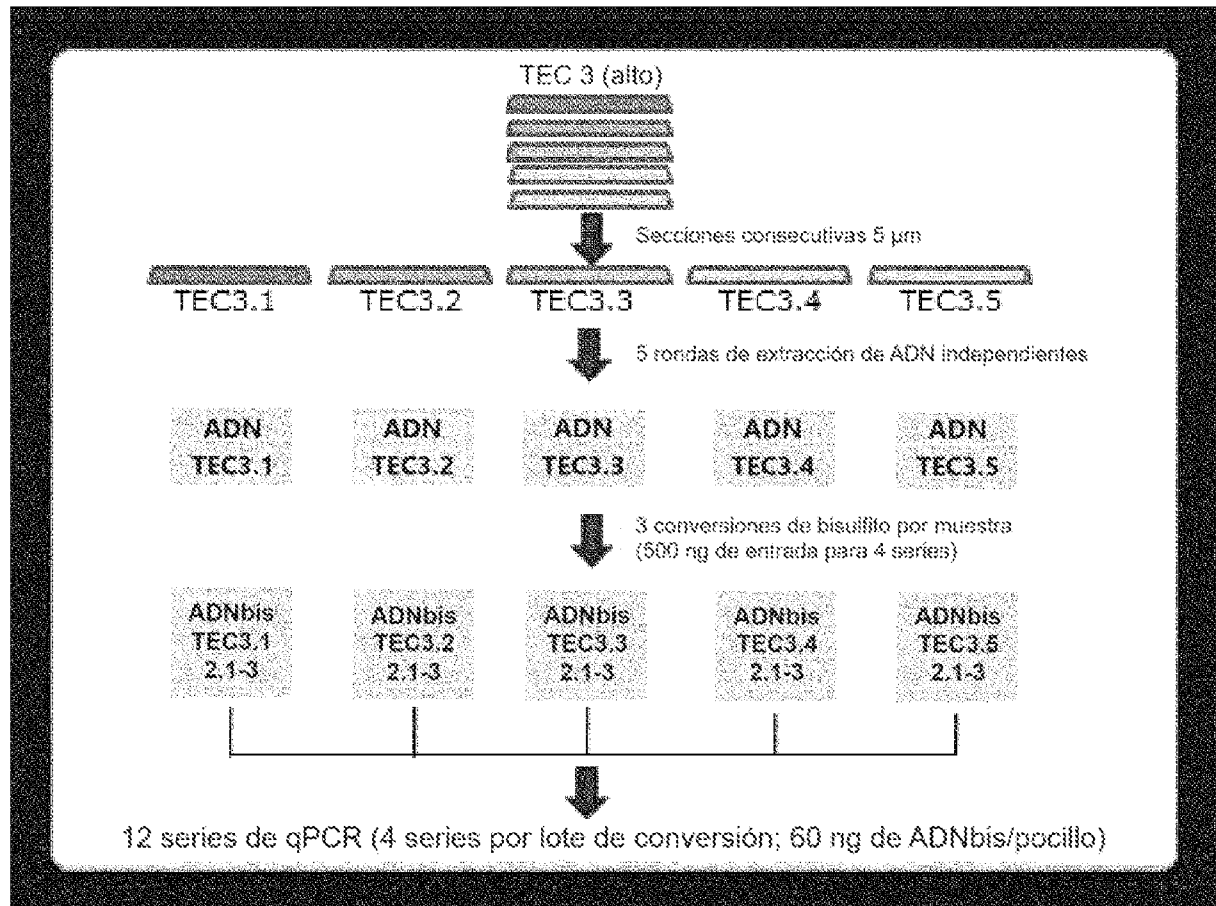


Figura 3

