



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 533**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04768320 .6**

96 Fecha de presentación : **02.09.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1660676**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2006**

54 Título: **Diagnóstico del riesgo de cáncer de pecho.**

30 Prioridad: **03.09.2003 GB 0320648**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2009

73 Titular/es: **Randox Laboratories Ltd.**
Ardmore, Diamond Road
Crumlin, Co. Antrim BT29 4QY, GB

72 Inventor/es: **Crockard, Martin Andrew;**
Baillie, Janice Roberta;
Lamont, John Victor y
Fitzgerald, Stephen Peter

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 319 533 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

Diagnóstico del riesgo de cáncer de pecho.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la detección de la presencia o el riesgo de cáncer de pecho.

Antecedentes de la invención

10

Existe más de 1 millón de casos de cáncer de pecho al año en términos globales, de los cuales en torno a un 0,5 millones se producen en los EE.UU., 40.000 en el RU y cerca de 2.000 en Irlanda. Es la causa principal de muertes por cáncer entre las mujeres. A pesar de que, en general, la incidencia de la enfermedad es cada vez mayor en el mundo occidental, una detección selectiva y los mejores tratamientos han llevado a un descenso gradual del índice de mortalidad en aproximadamente un 1% al año desde 1991. Los pacientes con un diagnóstico de cáncer de pecho temprano tienen en más de un 90% de los casos un índice de supervivencia relativo a los 5 años, en comparación con el 20% de los pacientes con un diagnóstico de cáncer de pecho con metástasis distal. No obstante, no existen pruebas para la detección selectiva en una etapa temprana definitivas para cáncer de pecho, ya que el diagnóstico se realiza en función de los resultados de la mamografía y la biopsia con aguja fina. La mamografía tiene sus limitaciones, ya que un 80% de los resultados de sospecha son falsos positivos y en un 10 a 15% de las mujeres con cáncer de pecho, se obtienen resultados falsos negativos. Frecuentemente, el tumor ha alcanzado una etapa avanzada en su desarrollo antes de la detección, reduciéndose así las posibilidades de supervivencia para el paciente y aumentando el coste del tratamiento y gestión para el sistema sanitario. Se requieren métodos más sensibles para detectar carcinomas de pecho *in situ* en una etapa temprana pequeños (< 2 cm de diámetro), para reducir la mortalidad del paciente. Además de la detección temprana, existen serios problemas de clasificación de la enfermedad como maligna o benigna, en la determinación de la etapa de los cánceres conocidos y en la diferenciación entre los tipos de tumor. Por último, existe la necesidad de llevar un seguimiento de los efectos del tratamiento en curso e identificar a los pacientes que se hacen resistentes a una terapia en particular. Dichos procesos de detección se complican además aún más por el hecho de que la glándula mamaria constituye uno de los pocos órganos que experimenta unos cambios morfológicos y funcionales espectaculares durante la vida adulta, en particular durante el embarazo, la lactancia y la involución, que conducen potencialmente a cambios en la signatura molecular de la misma glándula mamaria a lo largo del tiempo.

El diagnóstico de la enfermedad se lleva a cabo frecuentemente a través de un examen exhaustivo de los niveles relativos de un pequeño número de marcadores biológicos. A pesar de los últimos avances, la contribución de los biomarcadores actuales para el cuidado del paciente y los resultados clínicos es limitada. Esto se debe a la baja sensibilidad de diagnóstico y especificidad de la enfermedad de los marcadores existentes. Algunos biomarcadores moleculares, sin embargo, se vienen utilizando de forma rutinaria en el diagnóstico de enfermedades, como por ejemplo antígeno específico de próstata en la detección selectiva de cáncer de próstata, y se están descubriendo nuevos marcadores candidato a una velocidad cada vez mayor (Pritzker, 2002). Cada vez se acepta más que el uso de un panel de biomarcadores bien validado podría mejorar el valor positivo de predicción de un análisis y reducir al mínimo los falsos positivos y falsos negativos (Srinivas y cols., 2002). Por otra parte, existe un creciente interés por encontrar redes neutras que supongan la promesa de combinar una información débil pero independiente de diversos biomarcadores para producir un índice de pronóstico/predicción que es más informativo que cada uno de los biomarcadores en solitario (Yousef y cols., 2002).

En WO-A-01/92581 se describen secuencias de polinucleótido que son útiles en la terapia y diagnóstico del cáncer, en particular el cáncer de ovario. En WO-A-03/061386 se describen métodos para inhibir el crecimiento de una célula de cáncer de pecho que expresa el producto genético de tumor de Wilms 1 (WT1), utilizando un oligonucleótido antisentido WT1. En WO-A-02/092854 se describen genes que se expresan en cáncer de pecho y que son dianas de pronóstico y terapéuticas.

A medida que se va acumulando más información molecular, las enfermedades como el cáncer de pecho se van subdividiendo con arreglo a las signaturas genéticas relacionadas con el resultado obtenido del paciente, de manera que se consigue información valiosa para el especialista clínico. Las nuevas tecnologías emergentes en medicina nuclear han demostrado ya su poder para discriminar entre subtipos de enfermedades que no son reconocibles según los criterios patológicos tradicionales (Sorlie y cols., 2001) y para identificar eventos genéticos específicos que participan en la progresión del cáncer (Srinivas y cols., 2001). Es necesario también abordar otras cuestiones paralelamente en relación con la eficacia de los biomarcadores entre géneros y razas, según lo cual una detección selectiva a gran escala de una población diversa es una necesidad.

La gestión de un cáncer de pecho se mejoraría con el uso de nuevos marcadores expresados normalmente tan sólo en el pecho pero que se encuentran en otras partes del organismo, como resultado de la enfermedad. Los elementos que predicen la actividad de la enfermedad tendrían asimismo una valiosa utilidad en la gestión de la enfermedad, especialmente, los que predicen si un carcinoma ductal *in situ* se va a desarrollar en un carcinoma ductal invasivo.

Compendio de la invención

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método *in vivo* para la detección de la presencia o del riesgo de cáncer de pecho en un paciente, que comprende las siguientes etapas:

(i) aislamiento de una muestra del genoma del paciente, y

(ii) detección de la presencia o expresión del gen que está comprendido dentro de la secuencia aquí identificada como SEQ ID N° 2, o su complemento, o un polinucleótido de al menos 15 nucleótidos consecutivos que se hibridan con la SEQ ID N° 2 (o su complemento) en condiciones hibridantes rigurosas, indicando la presencia o expresión del gen la presencia o el riesgo de cáncer de pecho.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, un polinucleótido aislado comprende la secuencia de nucleótido identificada aquí como SEQ ID N° 2, o su complemento, o un polinucleótido de al menos 15 nucleótidos consecutivos que se hibridan con la secuencia (o su complemento) en condiciones hibridantes rigurosas.

De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, un péptido aislado comprende la secuencia aquí identificada como SEQ ID N° 3, o un fragmento de ella de al menos 10 radicales de amino ácido consecutivos.

De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, un anticuerpo tiene una afinidad de al menos 10^{-6} M para un péptido tal como se ha definido anteriormente.

Descripción de los gráficos

La invención se describe haciendo referencia a las figuras adjuntas en las que:

La figura 1 presenta los resultados de un ensayo de detección selectiva para determinar la presencia del gen de interés en diferentes tejidos, T representa el ADNc del tejido de tumor y M representa el ADNc del tejido mamario sajado conjuntamente del mismo donante; y

La figura 2 presenta los resultados de un análisis de expresión que se lleva a cabo para determinar la expresión del gen de interés en diferentes muestras de tejido.

Descripción de la invención

La presente invención se basa en la identificación de un gen que se expresa en un paciente que sufre cáncer de pecho. La identificación del gen (o su producto expresado) en una muestra obtenida de un paciente indica la presencia o el riesgo de cáncer de pecho en un paciente.

La invención se refiere además a reactivos como secuencias de polipéptidos, útiles para detectar, diagnosticar, llevar un seguimiento, pronosticar, prevenir, representar en imagen, tratar o determinar una predisposición al cáncer.

La invención es adecuada para la detección de cáncer de pecho, en particular, un tumor ER α positivo.

Los métodos para llevar a cabo el diagnóstico pueden implicar la síntesis de ADNc a partir de ARNm en una muestra de ensayo, la amplificación como porciones apropiadas de ADNc que corresponden al gen o a un fragmento del mismo y la detección del producto como indicación de la presencia de la enfermedad en ese tejido, o la detección de productos de traducción de los ARNs que comprenden secuencias genéticas como una indicación de la presencia de la enfermedad.

Entre los reactivos útiles se incluyen polipéptidos o fragmentos de los mismos que pueden ser útiles en los métodos de diagnóstico como RT PCR, PCR o ensayos de hibridación de ARNm extraído de tejido de biopsia, sangre y otras muestras de ensayo, o proteínas que son los productos de traducción de dichos ARNm; o anticuerpos dirigidos contra estas proteínas. Estos ensayos incluyen también métodos para detectar los productos genéticos (proteínas) a la luz de las posibles modificaciones post-traducción que pueden tener lugar en el organismo, incluyendo interacciones con moléculas como por ejemplo co-factores, inhibidores, activadores y otras proteínas en la formación de complejos de sub-unidad.

El gen asociado con el cáncer de pecho está comprendido dentro de la secuencia de polinucleótido que se indica como SEQ ID N° 1. La región de codificación putativa se muestra como SEQ ID N°2. El producto genético expresado se identifica aquí con la SEQ ID N° 3. La identificación del gen o su producto expresado puede llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas para la detección o caracterización de polinucleótidos o polipéptidos. Por ejemplo, se puede sondear material genético aislado de un paciente utilizando oligonucleótidos cortos que se hibridan específicamente con el gen diana. Las sondas de oligonucleótido se pueden etiquetar detectablemente, por ejemplo con un fluoróforo de manera que tras la hibridación con el gen diana, se pueden detectar las sondas. Alternativamente, el gen, o partes de él, puede amplificarse utilizando la reacción en cadena de polimerasa, identificándose los productos, también en este caso utilizando oligonucleótidos etiquetados.

ES 2 319 533 T3

Entre los ensayos de diagnóstico que incorporan este gen, o proteína o anticuerpos asociados se incluyen, sin limitarse sólo a ellos:

Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

PCR de transcripción inversa (RT-PCR)

PCR en tiempo real

Hibridación *in situ*

Manchas de Southern

Inmuno histoquímica

Ensayo de protección de ribonucleasa

Técnicas de arreglos de ADN

ELISA

Arreglos de proteínas, antígenos o anticuerpos en soportes sólidos como vidrio o cerámica, útiles en estudios de unión

Ensayos funcionales de ARN pequeño de interferencia

Todas las técnicas mencionadas son muy conocidas entre las personas especializadas en la técnica.

Un método de detección alternativo consiste en el uso de lo que se ha venido a llamar en la especialidad “balizas moleculares”. Las balizas moleculares son oligonucleótidos diseñados para la detección y determinación cuantitativa de ácidos nucleicos diana. Los oligonucleótidos comprenden normalmente porciones auto-hibridantes que, en ausencia de un ácido nucleico diana, forman una estructura de tallo y bucle. Se unen una fracción fluorescente y una fracción de apagado en cada uno de los extremos del oligonucleótido, y se colocan adyacentemente cuando el oligonucleótido se encuentra en la orientación de tallo y bucle. La fluorescencia queda impedida de forma efectiva con la fracción de apagado en esta orientación. La porción de bucle del oligonucleótido es complementaria con el ácido nucleico diana específico y, en presencia de la diana, tiene lugar la hibridación con la diana interrumpiéndose la orientación de tallo y bucle, separándose el fluor y la fracción de apagado, y teniendo como resultado un aumento de la fluorescencia detectable. El uso del método de balizas moleculares para la detección de la secuencia genética se describe en US 6548254.

La presente invención se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden la secuencia identificada como SEQ ID N° 2, o su complemento, o fragmentos de la misma que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos, preferiblemente 30 nucleótidos, más preferiblemente al menos 50 nucleótidos. Los polinucleótidos que se hibridan con un polinucleótido tal como se han definido, también entran dentro de marco de la presente invención. Normalmente, se lleva a cabo la hibridación en condiciones rigurosas. Las condiciones de hibridación rigurosas son conocidas entre las personas especializadas en la técnica, y se seleccionan para reducir la posibilidad de una hibridación no complementaria. En Nucleic Acid Hybridisation, A Practical Approach (B.D. Hames y S.J. Higgins, editores IRL Press, 1985) se describen ejemplos de condiciones adecuadas. Más específicamente, las condiciones de hibridación rigurosas incluyen una incubación durante toda la noche a 42°C en una solución que comprende: 50% de formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato sódico (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido del lavado con 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C.

La presente invención se refiere asimismo a productos de polipéptido aislados del gen de interés. Un polipéptido aislado de la invención comprende la secuencia identificada aquí como SEQ ID N° 3, o un fragmento de al menos 10 aminoácidos consecutivos de la misma, preferiblemente, al menos 15 aminoácidos consecutivos y, más preferiblemente, al menos 20 aminoácidos. El polipéptido puede ser útil para la generación de anticuerpos o en el desarrollo de moléculas de unión a proteína que se pueden unir *in vivo* a la proteína para inhibir su actividad.

La presente invención incluye asimismo anticuerpos desarrollados contra un polipéptido de la invención. Los anticuerpos tendrán afinidad para el polipéptido en al menos 10⁻⁶ M, más preferiblemente 10⁻⁹M, siendo sobre todo preferible al menos 10⁻¹¹ M. El anticuerpo puede ser de cualquier tipo adecuado, incluyendo monoclonal o policlonal. Se incluyen también los equipos de ensayo para determinar la presencia del antígeno de polipéptido en una muestra de ensayo. En uno de los modos de realización, el equipo de ensayo comprende un contenedor con un anticuerpo que se une específicamente al antígeno, comprendiendo el antígeno al menos un epítipo codificado por el gen de la invención. Estos equipos pueden comprender asimismo contenedores con herramientas útiles para recoger las muestras de ensayo, como por ejemplo sangre, saliva, orina y heces. Dichas herramientas incluyen lancetas y papel o tela absorbente para recoger y estabilizar, sangre, escobillones para recoger y estabilizar saliva, vasos para recoger y estabilizar orina

y muestras de sangre. El anticuerpo se puede unir a una fase sólida, como por ejemplo una superficie de vidrio o cerámica.

Se puede llevar a cabo también la detección de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno en una muestra de ensayo que contiene presuntamente estos anticuerpos. Dicho método de detección comprende el contacto de la muestra de ensayo con un polipéptido que contiene al menos un epítipo del gen. El contacto se lleva a cabo durante un período de tiempo y en unas condiciones suficientes como para dar cabida a la formación de complejos de antígeno/anticuerpo. El método abarca asimismo la detección de complejos que contienen el polipéptido. El complejo de polipéptido puede producirse por recombinación o síntesis, o se puede purificar a partir de fuentes naturales.

En un modo de realización distinto de la presente invención, se pueden utilizar anticuerpos, o fragmentos de ellos, contra el antígeno para la detección de la localización de imagen de un antígeno en un paciente, con el fin de detectar o diagnosticar la enfermedad o estado patológico. Dichos anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, o pueden obtenerse a través de técnicas de biología molecular y se pueden etiquetar con diversos agentes detectables, entre los que se incluyen sin limitarse sólo a ellos radioisótopos.

En otro modo de realización más, los anticuerpos o fragmentos de ellos, ya sean monoclonales, policlonales o obtenidos por técnicas de biología molecular, se pueden utilizar como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión del gen de la invención. El anticuerpo se puede utilizar sin formación de derivado, o se puede formar un derivado con un agente citotóxico como por ejemplo un radioisótopo, enzima, toxina, fármaco, pro-fármaco o similar.

El término "anticuerpo" se refiere de forma general a un agente de unión inmunológico como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Anticuerpo se utiliza también para referirse a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tiene una región de unión a antígeno e incluye, pero sin limitarse sólo a ellos, fragmentos de anticuerpo como por ejemplo anticuerpos de dominio simple (DABS), Fv, scFv etc. Las técnicas para preparar y utilizar diversos constructos y fragmentos a base de anticuerpo son muy conocidos dentro de la especialidad.

Si se desea, los métodos para la detección selectiva de cáncer de la presente invención pueden combinarse fácilmente con otros métodos para proporcionar una indicación más fiable aún del diagnóstico y pronóstico, proporcionando de este modo una prueba de varios marcadores.

El ejemplo que se expone a continuación ilustra la invención haciendo referencia a las figuras adjuntas.

Ejemplo

Se aisló una serie de fragmentos genéticos expresados diferentemente a partir de poblaciones de ADNc derivadas de muestras clínicas emparejadas de pacientes de cáncer de pecho, utilizando representación diferencial no isotópica (DDRT-PCR). SE reveló que uno de estos fragmentos, denominado aquí DD11, se regulaba ascendentemente significativamente en muestras de tejido de tumor de pecho de una serie de donantes. El perfil de expresión de este nuevo marcador molecular, su longitud completa y su supuesta secuencia de proteína correspondiente se describen en detalle a continuación.

Materiales y métodos

Se llevó a cabo la expresión genética diferencial entre pares emparejados de tejido de tumor y de mama normal del mismo donante. Se obtuvieron las muestras de tejido con el consentimiento del paciente informado y aprobación ética, de Pathlore, Peterborough, R.U. Tras la extirpación quirúrgica del tumor, se recogió una muestra del tejido de tumor, y también del tejido normal, extirpado a la vez, adyacente. Se extrajo el ARN mensajero y se sintetizó posteriormente el ADNc utilizando protocolos de transcripción inversa con perlas magnéticas Dynabeads etiquetadas con Dynal dT18 y con Superscript II, respectivamente. Se empleó la transcripción inversa de representación diferencial PCR (DDRT-PCR) para observar las diferencias entre los perfiles de expresión de gen de estas muestras emparejadas y se aislaron e investigaron posteriormente los transcritos genéticos individuales que presentan regulación ascendente y descendente.

Descrita por primera vez por Liang & Pardee (1992), la PCR de transcripción inversa de representación diferencial (DDRT-PCR) utiliza ARNm de dos o más muestras biológicas como plantillas para la síntesis de ADNc representativo por transcripción inversa, con uno de tres posibles cebadores ancla. Se amplificó por PCR cada una de las 3 subpoblaciones utilizando su cebador de ancla correspondiente acoplado con uno de los 80 cebadores de 13 meros arbitrarios. Se ha estimado que este número de combinaciones de cebadores facilita la representación de un 96% de los genes expresados en una población de ARNm (Sturtevant, 2000). Esta subdivisión de la población tiene como resultado la reducción de los 12.000-15.000 ARNm estimados expresados en células eucarióticas para 100-150 transcritos al final de la síntesis de ADNc de doble hebra para cada conjunto de cebadores. Esto facilita la separación electroforética en paralelo y la visualización con precisión de conjuntos de cebadores emparejados en gel de poliacrilamida, lo que lleva a la identificación de fragmentos de genes expresados en una muestra de tejido pero no en la otra.

La segmentación y la re-amplificación de fragmentos de interés fue seguida de la eliminación de falsos positivos por manchado de Southern inverso. Esto entrañó el manchado de cada uno de los fragmentos re-amplificados sobre

ES 2 319 533 T3

membranas de nilón por duplicado (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech) y la hibridación de ellas con la población de ADNc de tejido de tumor o normal del donante del que se derivaron los fragmentos. A continuación, se secuenciaron en secuencias directas, es decir sin clonación, los fragmentos en los que se confirmó expresión diferenciada, seguido de una consulta de la base de datos de la web para determinar si cada gen era nuevo. Se consideraron los fragmentos que no emparejaban con genes conocidos como genes que representaban potencialmente marcadores nuevos para cáncer de pecho de los que se derivaban. Se llevó a cabo una posterior detección selectiva de cada transcrito o bien por RT-PCR semi-cuantitativa o bien por PCR en tiempo real, utilizando un grupo de poblaciones de ADNc emparejadas de una serie de donantes de tumor de pecho. En todos los casos, se utilizó β -actina como gen de referencia constitutivo para calibrar las plantillas de ADNc y como control positivo interno durante la PCR. La expresión del gen marcador nuevo putativo se llevó a cabo mediante el uso de conjuntos de cebadores específicos de gen en las plantillas calibradas. A continuación, se sintetizaron transcritos de longitud completa de los nuevos fragmentos de gen, incluyendo el marco de lectura abierto (la parte del gen que codifica la proteína) utilizando un complejo proceso conocido como 5'-RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc) que incorpora extensión y amplificación específica de gen, verificable por secuenciado.

Se ensayó la determinación de la especificidad de tejido utilizando cebadores específicos de gen de cada nuevo marcador contra poblaciones de ADNc de tejido no mamario, incluyendo cerebro, corazón, linfocitos, bazo, riñón, testículos y músculo (obtenido de Origene). Se sometió a ensayo también el marcador molecular DD11 utilizando poblaciones de ADNc derivadas de un panel más completo de 22 tipos de tejido humanos. Fueron los siguientes:

Glándula suprarrenal	recogida de 62 donantes
Médula ósea	recogida de 7 donantes
Cerebro, cerebelo	recogida de 24 donantes
Cerebro, entero	recogida de un donante
Colon*	recogida de un donante
Cerebro fetal	recogida de 59 donantes
Hígado fetal	recogida de 63 donantes
Corazón	recogida de un donante
Riñón	recogida de un donante
Hígado	recogida de un donante
Pulmón	recogida de un donante
Placenta	recogida de 7 donantes
Próstata	recogida de 47 donantes
Glándula salivar	recogida de 24 donantes
Músculo esquelético	recogida de 2 donantes
Intestino delgado*	recogida de un donante
Bazo	recogida de 14 donantes
Testículos	recogida de 19 donantes
Timo	recogida de 9 donantes
Glándula tiroides	recogida de 65 donantes
raquea	recogida de 1 donante
Útero	recogida de 10 donantes

Debe advertirse que la mayoría de estas muestras formaron parte del panel II de ARN Total humano (Clontech), pero hubo dos muestras, marcadas con asteriscos, que se obtuvieron como terrones de tejido de Pathlore (Peterborough Hospital Tissue Bank) y se procesaron en los Randox Laboratories Ltd.

ES 2 319 533 T3

Por otra parte, se realizaron los ensayos en una serie de muestras de tumor éticamente aprobadas, según se obtuvo de Pathlore. Se sometieron a ensayo ADNc representativos de tumores de ovario, testículos, estómago, hígado, pulmón, vejiga, colon y páncreas tanto contra β -actina como DD11 por PCR en tiempo real.

5 Además del análisis de expresión de marcador nuevo, se sometió a análisis de signatura molecular cada par emparejado de tejidos de mama. Esto entrañó el uso de un grupo de cebadores específicos para una serie de marcadores moleculares de cáncer de pecho publicado previamente en RT-PCR semi-cuantitativa contra cada ADNc de tejido. Se determinó la relación entre cada marcador molecular y se tabuló para cada muestra, para su uso como referencia con la que se pudo comparar cada uno de los marcadores nuevos. Esto se realizó con el fin de sub-clasificar los tipos de tumor para permitir la asociación de nuevos marcadores contra estos sub-tipos aumentando el poder del marcador de diagnóstico considerablemente.

Resultados y explicación

15 Utilizando representación diferencia, se observó que un fragmento de gen, denominado DD11, derivado de poblaciones de ADNc de tejido emparejado de un donante de cáncer de pecho, tenía una significativa regulación ascendente en la población de ADNC de tumor en comparación con el ADNc de tejido normal correspondiente. Se confirmó que este producto se expresaba de forma diferencial por manchas de Southern inversas. El análisis de secuencia seguido de la consulta de la base de datos determinó que DD11 no era homólogo a los genes o proteínas conocidas en las base de datos EMBL y SWISSPROT, respectivamente, de manera que se consideró como potencialmente nuevo. No obstante, fue homólogo en un 100% tras la eliminación de la cola poli-A, al clon (RP11-875011) del cromosoma 8 del genoma humano (Número de acceso AC107959).

25 Se realizó además la detección selectiva de este fragmento utilizando poblaciones de ADNc derivadas de una serie de tejidos de tumor de pecho emparejados donados por otros pacientes. De las muestras de donante determinadas selectivamente 6 de 9 presentaron notables aumentos en la expresión, confirmando que DD11 era un marcador molecular putativo de la presencia de tumor de pecho (figura 1). Este análisis se sustanció con el análisis de signatura molecular de todas las muestras de tejido de pecho emparejadas disponibles actualmente, del siguiente modo:

30

Aumento en tumor	10	52,6%
Aumento en normal	1	5,3%
35 Sin diferencia discernible	7	36,8%
No hay expresión evidente	1	<u>5,3</u> %
Totales	19	100%

40

Para facilitar un posterior análisis, se empleó 5'-RACE para extender el fragmento para incluir el marco de lectura abierto completo (ORF) del gen, además de cualquier secuencia no codificadora 5'. Utilizando esta técnica, se derivó un supuesto producto de longitud completa de 513 nucleótidos (SEQ ID N°1) que tras la posterior consulta de la base de datos confirmó la homología anterior con el cromosoma humano 8, que es 100% homólogo en toda la longitud de la secuencia (513/513). A partir de esta secuencia, se generaron todos los marcos de lectura de 6 aminoácidos y se observó un ORF pequeño putativo (SEQ ID N°2) en el marco +2, que comprende 47 aminoácidos, incluyendo el codón de parada (SEQ ID N°3). Esta proteína pequeña no reveló una alta homología con ninguna proteína conocida en la base de datos SWALL, lo que se asume como nuevo.

50

Para determinar la especificidad de órgano, se sometieron a ensayo poblaciones de ADNc de 8 tejidos humanos no mamarios contra los cebadores DD11, además de un par emparejado de ADNs de un donador de cáncer de pecho. Se sometieron a ensayo también las mismas muestras utilizando cebadores de un gen de mantenimiento (housekeeping gen) constitutivo, β -actina, como control positivo y para calibrar las plantillas para análisis PCR semi-cuantitativo. Se amplificó fuertemente el producto de β -actina en todas las poblaciones de ADNc estudiadas, mientras que solamente se detectó el producto DD11 en la muestra de tumor de pecho (Figura 2). Esto proporcionó más pruebas de que este nuevo gen podía ser un marcador molecular muy poderoso para determinar la presencia de un tumor de pecho.

55

60 Se examinó posteriormente este marcador molecular utilizando poblaciones de ADNc derivadas de un panel de 22 tipos de tejido humano, tanto por análisis PCR en tiempo real como convencional. De los sometidos a ensayo, utilizando el ciclador térmico en tiempo real Opticon II (MJ Research), se detectó DD11 en muestras de placenta y testículos. Por otra parte, se llevaron a cabo los ensayos en una serie de muestras de tumor humano éticamente aprobadas según se obtuvo de Pathlore, para valorar si el marcador era específico de tumor de pecho o un marcador de tumor menos específico. Se sometió a ensayo el ADNc representativo de tumores de ovario, testículos, colon, estómago, hígado, pulmón, vejiga y páncreas tanto contra β -actina como DD11. Entre ellos, se detectó DD11 solamente en un nivel significativo en ADNc derivado de tumor de testículos. Se verificaron los productos de estas amplificaciones de PCR como DD11 por secuenciado directo.

65

La amplificación por PCR convencional en un ciclador térmico normal utilizando los paneles combinados de 22 poblaciones de ADNc de tejidos humanos normales y 8 de ADNc de tumor confirmaron que DD11 era específico para un número muy limitado de tipos de tejido. Como en el análisis de PCR en tiempo real, la población de ADNc de los testículos expresó DD11, como lo hizo el tumor de testículos. La única población restante que mostró una expresión significativa de este marcador fue de la muestra de útero. La muestra de placenta presentó un bajo nivel de expresión, pero esto no fue a la misma escala que las muestras de los testículos y el útero. Se observaron asimismo bajos niveles de producto en otras muestras de tejido diversas, pero se consideraron como poco significativas. Esto podría indicar que de todas las muestras sometidas a ensayo, DD11 se expresa fuertemente solamente en los tejidos que están bajo la influencia de hormonas reproductivas. Específicamente, los tejidos derivados del pecho y tumor asociado, los testículos y tumor asociado y el útero. El tejido de la placenta expresa también este marcador en un menor grado.

DD11 también se compara muy favorablemente con algunos de los marcadores de cáncer de pecho que se consideran "normales" por excelencia, como el receptor de estrógeno ($ER\alpha$) y el receptor de factor de crecimiento epidérmico humano (c-ErbB-2). Esto es evidente tanto en el análisis de signatura molecular de todas las muestras de tejido de cáncer emparejadas, en el que la expresión es similar en ambas muestras del mismo paciente en muchos casos, como al utilizar cebadores específicos de diana contra el panel interior de 30 poblaciones de ADNc de tejido de tumor y normal humano.

Documentos de referencia

DeRisi, J. L. Iyer, V.R. and Brown, P.O 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. 278: 680-686.

Liang, P. and Pardee, A. B. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase reaction. *Science*. 257: 967-971.

Pritzker, K.P. 2002 Cancer biomarkers: easier said than done. *Clin. Chem.* 2002 Aug; 48(8): 1147-50.

Salodof **MacNeil.** 2001. From genes to proteins: the FLEXgene consortium. *HMS Beagle*. 112: on-line journal.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H., Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M., Jeffrey SS, Thorsen T., Quist H, Metase JC, Brown PO, Bostein D, Eystein Lonning P., Borresen-Dale AL, 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* Sept. 11; 98(19): 10869-74.

Srinivas PR, Verma M. Zhao Y., Srivastava S. 2001. Proteomics for cancer biomarker discovery. *Clin. Chem.* Aug; 48(8):1160-9.

Sturtevant, J. Applications of differential-display reverse transcription-PCR to molecular pathogenesis and microbial mycology. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000 Jul; 13(3):408-27.

Yousef y cols., 2002 Yousef GM., Scorilas A., Kyriakopoulou LG, Rendl, L. Diamandis M., Ponzzone R. Biuglia N., Gai M., Roagna R., Sismondi P., Diamandis EP. Human kallikrein gene 5 (KLK5) expression by quantitative PCR: an independent indicator of poor prognosis in breast cancer. *Clin. Chem.* 2002 Aug; 48(8): 1241-50.

Zong, Q., Schummer, M. Hood, L. and Morris, D.R. 1999. Messenger RNA translation state; the second dimension of high-throughput expression screening. *Proc. Natl., Acad. Sci.* 96: 10632-10636.

ES 2 319 533 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Un método *in vitro* para la detección de la presencia o el riesgo de cáncer de pecho en un paciente que comprende las etapas de:

(i) aislar una muestra del genoma del paciente; y

10 (ii) detectar la presencia o expresión del gen que está comprendido dentro de la secuencia aquí identificada como SEQ ID N° 2, o su complemento, o un polinucleótido de al menos 15 nucleótidos consecutivos que se hibrida con la SEQ ID N° 2 (o su complemento, en condiciones de hibridación rigurosas,

indicando la presencia o expresión del gen la presencia o el riesgo de cáncer de pecho.

15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la muestra de genoma se obtiene de un tejido de pecho.

3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la detección se lleva a cabo por amplificación del gen utilizando la enzima polimerasa.

20 4. Un polinucleótido aislado que comprende la secuencia de nucleótido identificada aquí como SEQ ID N° 2, o su complemento, o un polinucleótido de al menos 15 nucleótidos consecutivos que se hibrida con la secuencia (o su complemento) en condiciones de hibridación rigurosas.

25 5. Uso de un polinucleótido según la reivindicación 4, en un ensayo de diagnóstico *in vitro* para determinar por ensayo el riesgo de cáncer de pecho en un paciente.

6. Un péptido que comprende la secuencia identificada aquí como SEQ ID N° 3, o un fragmento de la misma de al menos 10 radicales de aminoácido consecutivos.

30 7. Un anticuerpo que tiene afinidad de al menos 10^{-6} M para el péptido de la reivindicación 6.

35

40

45

50

55

60

65

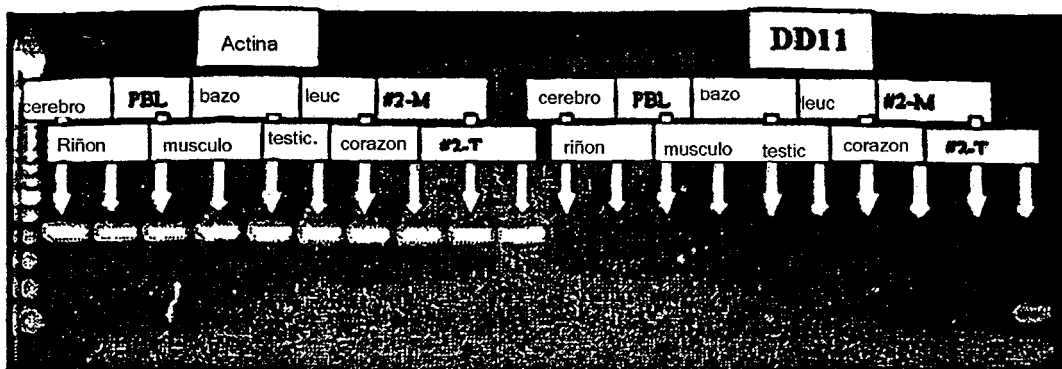


Figura 2

B-actina

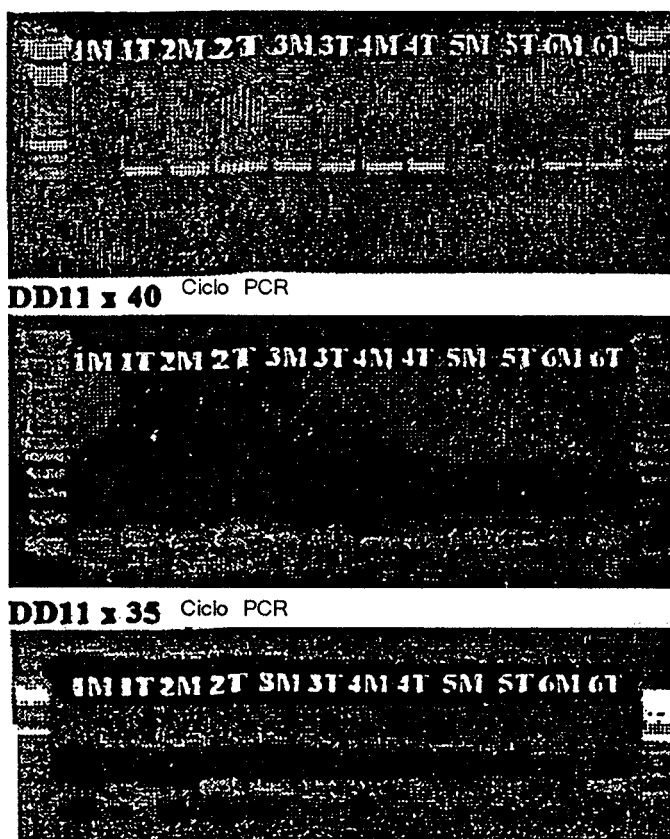


Figura 1

ES 2 319 533 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Randox Laboratories Ltd.

5 <120> Diagnóstico de riesgo de cáncer de pecho

<130> JWJ01047WO

<150> 0320648.9

10 <151> 2003-09-03

<160> 3

<170> patentIn versión 3.1

15

<210> 1

<211> 513

<212> ADN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

25 tttatggtca taagcttaga aaatcctttg cccaacataa aataagagaa ctctaatttc 60
 ttagggagat ttttattaaa tgattagatt tntagcatat agttgtataa aataagatga 120
 actctaattt ctagggagg ttttattaaa tgattagatt tntagcatat catcgtgtaa 180
30 agtacatgga cattatTTTT gatatagaa gtgtagtggt ccccttcatt gttctgagtt 240
 actctcatct gtccaacccc agcgagccac tgttattcc ctttctctga actttgtggt 300
 gtttatggaa gcttcattcc gtagcagcaa ggcgtcaatc attaactctg ggtgattagt 360
35 cctcaggcat ctccctgctc tgagctgagg ggtgtggtag tgttgaaagt tgcagtgctc 420
 tgatcacgtg gttggttcga ctggtaactg gtccctctct ggcaagagcc acctcatcag 480
 tatcaactca ggaatgctgg aaatcatttt atg 513

40

<210> 2

<211> 138

<212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

50 <222> (1).....(138)

<223>

55

60

65

ES 2 319 533 T3

<400> 2

atg att aga ttt gta gca tat cat cgt gta aag tac atg gac att att 48
Met Ile Arg Phe Val Ala Tyr His Ag Val Lys Tyr Met Asp Ile Ile
5 1 5 10 15
ttt gat ata gaa agt gta gtg ttc ccc ttc att gtt ctg agt tac tct 96
10 Phe Asp Ile Glu Ser Val Val Phe Pro Phe Ile Val Leu Ser Tyr Ser
20 25 30
cat ctg tcc aac ccc agc gag cca ctg att att ccc ttt ctc 138
15 His Leu Ser Asn Pro Ser Glu Pro Leu Ile Ile Pro Phe Leu
35 40 45

<210> 3

20 <211> 46

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 3

Met Ile Arg Phe Val Ala Tyr His Arg Val Lys Tyr Met Asp Ile Ile
30 1 ;5 10 15
Phe Asp Ile Glu Ser Val Val Phe Pro Phe Ile Val Leu Ser Tyr Ser
35 20 25 30
His Leu Ser Asn Pro Ser Glu Pro Leu Ile Ile Pro Phe Leu
40 35 40 45

45

50

55

60

65