



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 339 132**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05763127 .7**

96 Fecha de presentación : **27.07.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1781814**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Métodos y kit para el pronóstico de cáncer de mama.**

30 Prioridad: **10.08.2004 GB 0417740**
07.12.2004 GB 0426777

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.05.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.05.2010

73 Titular/es: **Cardiff Biologicals Limited**
Cardiff Business Technology Centre
Senghennydd Road
Cardiff CF24 4AY, GB

72 Inventor/es: **Jiang, Wen Guo**

74 Agente: **Serrat Viñas, Sara**

ES 2 339 132 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 y kit para el pronóstico de cáncer de mama.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método y a un kit, incluyendo partes de los mismos, para el pronóstico de cáncer de mama. En particular, el método implica identificar un patrón de expresión génica que indica la probabilidad de supervivencia de una paciente con cáncer de mama y/o la probabilidad de recidiva de la enfermedad y/o el carácter metastásico del cáncer en una paciente que se está tratando, o que se ha tratado, para cáncer de mama.

Antecedentes de la invención

El cáncer de mama es el cáncer femenino más común en el RU, los EE.UU. y Dinamarca. También es la forma de cáncer más común que afecta a las mujeres en el mundo industrializado. La incidencia del cáncer de mama ha ido en aumento de manera gradual, y en los EE.UU. es la segunda causa de muerte más común debida al cáncer. En efecto, en 1997, se estimó que se notificaron 181.000 nuevos casos en los EE.UU., y se ha estimado que 40.000 personas mueren de cáncer de mama cada año. A pesar de los esfuerzos globales que se han realizado para combatir este estado, ha habido muy pocos cambios en la incidencia de cáncer de mama, aunque la detección temprana y las nuevas terapias han mejorado ligeramente la supervivencia durante las últimas décadas.

Aunque se desconoce en gran parte el mecanismo de oncogénesis para la mayoría de carcinomas de mama, existen varios factores que pueden predisponer a algunas mujeres a desarrollar cáncer de mama. Estos incluyen la historia de nacimiento, el estado menstrual, el grado del tumor, el estado de ER, el tamaño del tumor y la afectación de los ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico y la cirugía. Además, el pronóstico puede determinarse en diversos grados mediante el uso de mamografía u otros métodos de obtención de imágenes con rayos x. Sin embargo, una mamografía tiene riesgos y el tumor de mama puede inducirse por las propiedades ionizantes de la radiación usada durante la prueba. Además, tales procedimientos son costosos y los resultados pueden interpretarse de diferente manera por diferentes técnicos. Por ejemplo, un estudio mostró considerables desacuerdos clínicos en aproximadamente un tercio de un conjunto de mamografías que interpretó un grupo de radiólogos. Además, muchas mujeres encuentran que someterse a una mamografía es una experiencia dolorosa.

En la práctica clínica, es importante el pronóstico de la enfermedad porque determina el tratamiento que se proporcionará. El pronóstico preciso podría permitir que el oncólogo, por ejemplo, favorezca la administración de una terapia hormonal o quimioterapia y recomendar cirugía sólo en los casos más agresivos de cáncer.

Sin embargo, el diagnóstico temprano se ha convertido en una característica regular en el cáncer de mama porque en la actualidad se presentan cada vez más pacientes con la enfermedad en un estadio muy temprano. Esto ha dificultado más los métodos convencionales de evaluación de los desenlaces del cáncer, y cada vez se hace más evidente que no sólo es el tipo de cáncer sino también el momento adecuado del tratamiento lo que resulta clave en lo bien o mal que responda una paciente. Por ejemplo, actualmente muchas pacientes pueden recibir tratamiento innecesario que frecuentemente provoca efectos secundarios tóxicos, mientras que otras pacientes pueden someterse a estrategias de tratamiento conservador cuando, en efecto, un cáncer está más avanzado de lo previsto. Por tanto, puede ser de vital importancia que se elabore un pronóstico correcto y preciso en un estadio temprano.

Hasta la fecha, no se ha identificado ningún conjunto de factores pronóstico satisfactorios para el pronóstico basándose sólo en la información clínica. Como resultado, la investigación se ha dirigido a estudiar firmas moleculares que pueden diagnosticar y pronosticar cáncer. El documento WO 02/103320 da a conocer miles de marcadores genéticos cuya expresión se correlaciona con el pronóstico clínico, y que pueden usarse para diferenciar a las pacientes que tienen buenos pronósticos de las que tienen malos pronósticos. El método para determinar la expresión implica comparar el patrón de expresión de una muestra de prueba de tejido tomada de una paciente con el de una muestra de tejido tomada de una paciente con un buen pronóstico y también con el de una muestra tomada de una paciente con un mal pronóstico conocido, y determinar cuál de estas muestras se corresponde más estrechamente con la muestra de prueba. El documento WO 03/083141 se refiere a la correlación de la firma molecular de una o más células de una muestra citológica con el fenotipo de una o más células de una muestra histológica. Tales métodos de correlación se logran comparando la firma molecular de las células de una muestra citológica con la firma molecular de las células que corresponden a un fenotipo particular. La equivalencia entre las dos firmas indica que la(s) célula(s) de la muestra tiene(n) el fenotipo de la muestra. En particular, el documento WO 03/083141 permite comparaciones de firmas moleculares de muestras citológicas con firmas histológicas de "referencia" de diferentes subtipos de estados benignos, así como diversos subtipos de estados malignos de cáncer de mama. Además, el documento WO 03/083141 permite comparaciones de firmas moleculares de muestras citológicas con firmas histológicas de pronóstico de la enfermedad o fenotipos de desenlace a nivel de la célula, el tejido, el sistema y/o el organismo tal como se observa en sujetos con células que tienen la firma en una muestra histológica. Esto incluye tasas de mortalidad, esperanza de vida en diversos estados, sensibilidad o resistencia a un agente terapéutico o tratamiento particulares.

Aunque esta metodología representa una mejora con respecto a los métodos clínicos tradicionales de pronóstico, tiene varias desventajas. Por ejemplo, el análisis de cientos de marcadores genéticos lleva un tiempo considerable y no es intrínsecamente práctico. Además, no está claro si una muestra que expresa algunos de los marcadores de buen

pronóstico y algunos de los marcadores de mal pronóstico proporcionaría un pronóstico de una u otra opción. Por consiguiente, debido a la complejidad de la metodología, ésta también puede ser imprecisa, en el sentido que se coloca a las pacientes en el grupo de pronóstico equivocado porque expresan más de los genes en un grupo que del otro, o no puede proporcionar una respuesta definitiva. Tal como se explicó anteriormente, el pronóstico temprano, y preciso, es vital para el tratamiento apropiado y eficaz. Por tanto, esta claro que se requiere una firma molecular más simple y más definitiva.

Por tanto, se ha desarrollado un método para determinar el pronóstico de un cáncer de mama dado que es relativamente sencillo de realizar, eficaz a la hora de llevarlo a cabo y proporciona una indicación precisa del desenlace probable de la enfermedad. El método usa una muestra pequeña pero altamente representativa de marcadores que, por tanto, son particularmente precisos en determinar el desenlace probable de un cáncer dado. Además, el método puede dividirse en tres componentes: un primer componente que predice la supervivencia probable de un individuo que presenta cáncer de mama; un segundo componente que predice la recidiva probable de cáncer en un individuo que presenta cáncer de mama; y un tercer componente que predice el carácter metastásico del cáncer. Tal como resultará evidente para los expertos en la técnica, el segundo componente indica, por tanto, la probabilidad de supervivencia libre de incidencia de una paciente que presenta cáncer de mama y el tercer componente indica la naturaleza agresiva de la enfermedad. En resumen, se ha identificado una pluralidad de firmas moleculares que tienen relevancia en la determinación del pronóstico de un cáncer de mama dado. Cada firma molecular comprende una pluralidad de marcadores genéticos cuya expresión, o bien alta o bien baja con respecto al tejido de una paciente con pronóstico moderado (véase más adelante en el presente documento), es indicativa de un desenlace dado. Además de esto, se ha analizado cada firma molecular con el fin de identificar qué marcadores genéticos son los mejores indicadores del desenlace de una enfermedad dada, en otras palabras, los que contribuyen más a la capacidad de predicción de la firma molecular. Este subconjunto de marcadores se conoce colectivamente como la firma molecular mejorada.

Por ejemplo, se proporciona una primera firma molecular, que comprende dos conjuntos de marcadores moleculares cuya alta expresión se correlaciona con la baja tasa de supervivencia; el primer conjunto comprende aquellos marcadores moleculares que son los indicadores estadísticamente más significativos de la baja tasa de supervivencia, éstos se denominan en el presente documento, colectivamente, la primera firma molecular primaria [Conjunto (A)]:

AMF, ATF4, Cyr61, ER, matriptasa2, MET, MLN64, MMP7, nectina4, PAR1A, psoriasis, Pttg1, Rho-C, Scotin, SDF-1, SEMP1, SPF45, SST1, ST15, TACC2, TBD10, TCF2, TEM6, TEM7R, ZO-3; y

el segundo conjunto comprende los anteriores más al menos uno de los siguientes marcadores moleculares, denominados en el presente documento, colectivamente, la primera firma molecular secundaria [Conjunto (B)]:

Basigina, beta-catenina, BMP1, BMP10, calpaína grande, CD44, CX43, ciclinaD2, EHMS, FAK, FAP, GIRK, HAVR1, Isotopo3, JAK1, LOX12, NET-2, PAR1A2, PTHrP, Rho-G, S100A4, SPARC, TCF3, VECAD, Vilip, Wave2.

Hacer referencia en el presente documento a los marcadores anteriores y siguientes, es hacer referencia a una proteína conocida cuya identidad completa está disponible en la base de datos de www.NCBI.LM.NIH.gov, o que conocen bien los expertos en la técnica.

La referencia en el presente documento a la expresión alta o baja es con respecto al nivel de expresión del mismo marcador en las pacientes que se ha considerado que tienen un pronóstico moderado, es decir, pacientes con un índice pronóstico convencional, el índice pronóstico de Nottingham (NPI) = 3,4 - 5,4, en el que el NPI = 0,2 x tamaño de tumor + grado del tumor + situación ganglionar en el que

NPI (bajo) es < 3,4 y el 86% de las pacientes sobreviven 15 años

NPI (moderado) es 3,4 - 5,4 y el 42% de las pacientes sobreviven 15 años

NPI (alto) es > 5,4 y el 13% de las pacientes sobreviven 15 años.

Además, se proporciona una segunda firma molecular, que comprende dos conjuntos de marcadores moleculares cuya baja expresión se correlaciona con la baja tasa de supervivencia; el primer conjunto comprende aquellos marcadores moleculares que son los indicadores estadísticamente más significativos de baja tasa de supervivencia, éstos se denominan en el presente documento, colectivamente, la segunda firma molecular primaria [Conjunto (C)]:

ARP2, Atf-3, HuR, MEN1, paracelina, PTP-RK radixina, razón RHO8/gdiG, y

el segundo conjunto comprende los anteriores más al menos uno de los siguientes marcadores moleculares, denominados en el presente documento, colectivamente, la segunda firma molecular secundaria [Conjunto (D)]:

aMOT, Atf-1, claudina-1, IL22R, Rock2 Veg1.

Todavía se proporciona adicionalmente una tercera firma molecular, que comprende dos conjuntos de marcadores moleculares cuya alta expresión se correlaciona con una baja incidencia de supervivencia libre de cáncer; el primer

ES 2 339 132 T3

conjunto comprende aquellos marcadores moleculares que son los indicadores estadísticamente más significativos de una baja incidencia de supervivencia libre de cáncer, éstos se denominan en el presente documento, colectivamente, la tercera firma molecular primaria [Conjunto (E)]:

5 AAMP, AMFR, Bmp8, BMP9, beta-catenina, CAR, Creb12, DRIM, EHMS, endomuscina2, FAK, FAP, Isotopo1, Kiss1/ck19, Notch1, PAR1A, Par1A2. PLC-delta, psoriasina, PTTG1, RhoC, Rock1, SDF1, SST1, ST15, TEM6, TEM7R; y

10 el segundo conjunto comprende los anteriores más al menos uno de los siguientes marcadores moleculares, denominados en el presente documento, colectivamente, la tercera firma molecular secundaria [Conjunto (F)]:

Angiotensina2R1, ATF4, Bmp10, CASM, catepsinaS, CX43, elastasa-PMN, GIRK, HAVR1, HIN, Isotopo3, Kiss-1, LOX12, NOS3, PMSA, S100A4, SEMP1, TACC2, ubiquitina, WISP2.

15 Además, se proporciona una cuarta firma molecular, que comprende dos conjuntos de marcadores moleculares cuya baja expresión se correlaciona con una baja incidencia de supervivencia libre de cáncer; el primer conjunto comprende aquellos marcadores moleculares que son los indicadores estadísticamente más significativos de una baja incidencia de supervivencia libre de cáncer, éstos se denominan en el presente documento, colectivamente, la cuarta firma molecular primaria [Conjunto (G)]:

20 Bmp3, IL22R, IL24, JAK1, PTP-RK, Rho8/GdiG, Snail, WASP; y

el segundo conjunto comprende los anteriores más al menos uno de los siguientes marcadores moleculares, denominados en el presente documento, colectivamente, la cuarta firma molecular secundaria [Conjunto (H)]:

25 ATF3, Bmp4, BMPR1A, MEN1, paracelina.

Todavía se proporciona adicionalmente una quinta firma molecular que comprende dos conjuntos de marcadores moleculares cuya alta expresión se correlaciona con cáncer metastásico; el primer conjunto comprende aquellos marcadores moleculares que son los indicadores estadísticamente más significativos de un cáncer metastásico, éstos se denominan en el presente documento, colectivamente, la quinta firma molecular primaria [Conjunto (I)]:

30 BAF57, BNDF, CAR1, CASM, catepsina-L, Creb 1/2, CXCR10, DRIM, HERG, IL7R, IL-11, Kiss1, MKK1, PMN-elastasa, PTP1, SDF5, TACC2, ubiquitina, VIPR1, VUDP; y

35 el segundo conjunto comprende los anteriores más al menos uno de los siguientes marcadores moleculares denominados en el presente documento, colectivamente, la quinta firma molecular secundaria [Conjunto (J)]:

40 angiomotina, BMP7, ciclinaD1, ADN ligasa-1, IGFBP7, LYVE1, NET2, RHO8, SRBC, Stath4, TGAsa-3, vinculina, WAVE2.

Finalmente, se proporciona una sexta firma molecular que comprende dos conjuntos de marcadores moleculares cuya baja expresión se correlaciona con cáncer metastásico; el primer conjunto comprende aquellos marcadores moleculares que son los indicadores estadísticamente más significativos de un cáncer metastásico, éstos se denominan en el presente documento, colectivamente, la sexta firma molecular primaria [Conjunto (K)]:

45 paracelina; y

el segundo conjunto comprende el anterior más al menos uno de los siguientes marcadores moleculares denominados en el presente documento, colectivamente, la sexta firma molecular secundaria [Conjunto (L)]:

50 ALCAM, eplin, ER-beta, glypic3, JAK1, MAGI-1, PEDF, PKC-eta, stathlin, WWOX.

Por tanto, se han determinado al menos seis firmas moleculares que comprenden doce conjuntos de marcadores moleculares (seis primarios y seis secundarios), que tienen uso en el pronóstico de cáncer de mama. El esclarecimiento de estas firmas ha llevado más de una década de trabajo, tiempo durante el que se han examinado sistemática y cuidadosamente cientos de muestras de tejido canceroso de mama y muchos cientos más de marcadores genéticos moleculares. Sin embargo, habiendo completado esta ardua tarea, sorprendentemente, se ha encontrado que, de hecho, es necesario examinar muy pocos genes con el fin de proporcionar un pronóstico preciso para una muestra dada de tejido canceroso de mama. Aún más sorprendentemente, ha podido reducirse adicionalmente este número identificando aquellos marcadores moleculares que contribuyen más al desenlace predictivo de estas firmas moleculares, así por ejemplo, en el caso de la firma molecular relacionada con cáncer metastásico, sólo es necesario examinar 20/21 genes. Esto significa que esta metodología tiene aplicación inmediata y puede realizarse rápidamente y de manera rutinaria en un contexto clínico. De hecho, se sugiere que esta metodología forma parte de un régimen de tratamiento convencional de una paciente con cáncer de mama de modo que el oncólogo pertinente, en un estadio temprano, pueda determinar el desenlace de una enfermedad particular y así ajustar el tratamiento en consecuencia. Por tanto, por ejemplo, en el caso de un individuo que presenta una firma indicativa de baja supervivencia o metástasis ganglionar (es decir, es probable que el cáncer se propague) podría recomendarse una forma de terapia inmediata y agresiva. De

manera similar, cuando un individuo presenta una firma indicativa de baja supervivencia libre de enfermedad, y por tanto, es más probable que tenga una recidiva de la enfermedad, podrían requerirse visitas y pruebas de seguimiento más frecuentes. Por el contrario, si un individuo tiene una firma indicativa de no metástasis, el oncólogo puede recomendar un tratamiento menos invasivo y agresivo, ahorrando así a la paciente cualquier malestar innecesario y efectos secundarios no deseados. Por tanto, este método no sólo sirve para garantizar que los individuos reciban tratamiento personalizado según sus características genéticas, sino que puede mejorar la calidad de vida de una paciente durante el tratamiento, garantizando que sólo se recomienda una terapia agresiva en aquellos casos en los que es necesario.

Por consiguiente, en un aspecto de la invención se proporciona un método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

- (a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (A), y;
- (b) cuando se determina el alto nivel de expresión para estos marcadores;
- (c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una baja probabilidad de supervivencia.

En aún una realización preferida adicional de la invención, dicha metodología, en la parte (a) de la misma, comprende además determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (B), con el fin de determinar si estos genes tienen un alto nivel de expresión; y/o el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (C), con el fin de determinar si estos genes se subexpresan; y/o determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (D), con el fin de determinar si estos genes se subexpresan y, si se identifican los anteriores patrones de expresión, concluir que el individuo tiene una baja probabilidad de supervivencia.

En aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

- (a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (C), y;
- (b) cuando se determina un bajo nivel de expresión para estos marcadores;
- (c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una baja probabilidad de supervivencia.

En aún una realización preferida adicional de la invención, dicha metodología, en la parte (a) de la misma, adicional o alternativamente, comprende determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (D) con el fin de determinar si estos genes se subexpresan y, si es así, concluir que el individuo tiene una baja probabilidad de supervivencia.

En aún una realización preferida adicional de este aspecto de la invención, dicha metodología, en la parte (a) de la misma, comprende además determinar el nivel de expresión de los genes en el conjunto (A) y/o al menos un gen en el conjunto (B) con el fin de determinar si estos genes se sobreexpresan y, si es así, concluir que el individuo tiene una baja probabilidad de supervivencia.

En aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

- (a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (E), y;
- (b) cuando se determina un alto nivel de expresión para estos marcadores;
- (c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una alta probabilidad de recidiva de cáncer.

Hacer referencia en el presente documento a la recidiva de cáncer incluye hacer referencia a la recidiva de cáncer de manera local, en la mama, o en un sitio remoto o hacer referencia a la metástasis.

En aún una realización preferida adicional de la invención, la metodología comprende además, en la parte (a) de la misma, determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (F), con el fin de determinar si estos genes tienen un alto nivel de expresión; y/o determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (G), con el fin de determinar si estos genes se subexpresan; y/o determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador

ES 2 339 132 T3

molecular en el conjunto (H), con el fin de determinar si estos genes se subexpresan, y si se identifican los patrones de expresión anteriores, concluir que el individuo tiene una alta probabilidad de recidiva de cáncer.

En aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

(a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (G), y;

(b) cuando se determina un bajo nivel de expresión para estos marcadores;

(c) concluir que los individuos de los que se ha tomado la muestra de tejido tienen una alta probabilidad de recidiva de cáncer.

En aún una realización preferida adicional de la invención, dicha metodología, en la parte (a) de la misma, adicional o alternatively, comprende determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (H), con el fin de determinar si estos genes se subexpresan y, si es así, concluir que el individuo tiene una alta probabilidad de recidiva de cáncer.

En aún una realización preferida adicional de este aspecto de la invención, dicha metodología, en la parte (A) de la misma, comprende además determinar el nivel de expresión de los genes en el conjunto (E) y/o al menos un gen en el conjunto (F) con el fin de determinar si estos genes se sobreexpresan y, si es así, concluir que el individuo tiene una alta probabilidad de recidiva de cáncer.

En aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

(a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los marcadores moleculares en el conjunto (I), y;

(b) cuando se determina un alto nivel de expresión para estos marcadores;

(c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una forma de cáncer metastásico.

En aún una realización preferida adicional de la invención, la metodología además comprende, en la parte (a) de la misma, determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (J), con el fin de determinar si estos genes tienen un alto nivel de expresión; y/o determinar el nivel de expresión del gen que codifica para el marcador molecular en el conjunto (K), con el fin de determinar si este gen se subexpresa; y/o determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (L), con el fin de determinar si estos genes se subexpresan y, si se identifican los patrones de expresión anteriores, concluir que el individuo tiene una forma de cáncer metastásico.

En aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

(a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para el marcador molecular en el conjunto (K), y;

(b) cuando se determina un bajo nivel de expresión para este marcador;

(c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una forma de cáncer metastásico.

En aún una realización preferida adicional de la invención, dicha metodología, en la parte (a) de la misma, adicional o alternatively, comprende determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos un marcador molecular en el conjunto (L) con el fin de determinar si estos genes se subexpresan y, si es así, concluir que el individuo tiene una forma de cáncer metastásico.

En aún una realización preferida adicional de este aspecto de la invención, dicha metodología, en la parte (a) de la misma, comprende además determinar el nivel de expresión de los genes en el conjunto (I) y/o al menos un marcador molecular en el conjunto (J) con el fin de determinar si estos genes se sobreexpresan y, si es así, concluir que el individuo tiene una forma de cáncer metastático.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona cualquier combinación seleccionada de todo el método mencionado anteriormente.

En cada uno de los anteriores métodos de la invención, el ensayo, idealmente, se lleva a cabo para tejido canceroso de mama humano y, aún más preferiblemente, tejido canceroso de mama humano femenino.

En cada uno de los métodos anteriores de la invención, idealmente, la muestra del tejido que se examina, se somete a ensayo para determinar la presencia de ARN, preferiblemente de ARN total y, aún más preferiblemente, la cantidad de ARNm. Resultará evidente para los expertos en la técnica que se conocen bien las técnicas disponibles para medir el contenido de ARN, en efecto, las que ponen en práctica de manera rutinaria los que trabajan en el campo del diagnóstico clínico.

En una realización alternativa de la invención, el método implica someter a ensayo la proteína codificada por cada uno de los marcadores moleculares y así, normalmente, pero no exclusivamente, implica el uso de agentes que se unen a las proteínas pertinentes y así identificar las mismas. Agentes comunes son los anticuerpos y, lo más idealmente, anticuerpos monoclonales que, ventajosamente, se han marcado con un marcador adecuado mediante lo cual puede determinarse la existencia del anticuerpo unido. Los expertos en la técnica conocen bien las técnicas de ensayo para identificar proteínas y, en efecto, los trabajadores en el campo del diagnóstico clínico las usan a diario.

Además, la metodología de la invención puede implicar la amplificación de un marcador seleccionado antes de la identificación del mismo y en este caso, normalmente, la amplificación se llevará a cabo usando una reacción de PCR en la que se usan sondas de oligonucleótidos específicas para el marcador molecular de interés con el fin de amplificar el mismo antes de determinar la presencia y, teniendo en cuenta el grado de amplificación, la cantidad del mismo.

En métodos preferidos adicionales de puesta en práctica de la invención, se determina el nivel de expresión de un marcador molecular dado teniendo en cuenta una muestra control, en el que la muestra control es una muestra de tejido de mama que está libre de cáncer o de una paciente con un pronóstico moderado tal como se define en el presente documento. Todavía más idealmente, esta muestra de tejido de mama se toma de un individuo que no presenta la enfermedad. Todavía alternativamente, el control es un patrón reconocido para la expresión de cada gen pertinente en un individuo sano.

El nivel de expresión génica puede medirse mediante PCR cuantitativa en tiempo real, usando un método dado a conocer en Jiang *et al.* 2003a, o Parr y Jiang 2004.

La probabilidad de supervivencia significa la probabilidad de que la paciente estará viva durante los próximos 10 años. La probabilidad de recidiva significa la probabilidad que el cáncer volverá a presentarse en el plazo de 10 años. Una forma de cáncer metastásico significa que el cáncer se habrá propagado desde el órgano o tejido de origen hasta otra parte del cuerpo.

Según aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit para realizar uno cualquiera o más de los métodos mencionados anteriormente, comprendiendo dicho kit:

- (a) una pluralidad de sondas para detectar al menos un conjunto de los marcadores moleculares especificados en los métodos mencionados anteriormente; y
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones pertinentes para el uso de dichas sondas.

En aún un aspecto preferido adicional de la invención, se proporciona un kit para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos que comprende:

- (a) una pluralidad de sondas para identificar al menos un transcrito de cada uno de los genes en el conjunto (A), y;
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

En aún una realización adicional de la invención, dicho kit comprende además:

- (a) una pluralidad de sondas para identificar: al menos un transcrito de cada uno de los genes en el conjunto (C) y/o al menos un transcrito para al menos uno de los genes en el conjunto (B) o (D), y;
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

En aún un aspecto preferido adicional de la invención, se proporciona un kit para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos que comprende:

- (a) una pluralidad de sondas para identificar al menos un transcrito de cada uno de los genes en el conjunto (E), y;
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

En aún un aspecto preferido de la invención, dicho kit comprende además:

- (a) una pluralidad de sondas para identificar: al menos un transcrito de cada uno de los genes en el conjunto (G) y/o al menos un transcrito para al menos uno de los genes en el conjunto (F) o (H), y;
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

5

En aún un aspecto preferido adicional de la invención, se proporciona un kit para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos que comprende:

10

- (a) una pluralidad de sondas para identificar al menos un transcrito de cada uno de los genes en el conjunto (I), y;
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

15

En aún un aspecto preferido adicional de la invención, dicho kit comprende además:

20

- (a) una pluralidad de sondas para identificar: al menos un transcrito de cada uno de los genes en el conjunto (K), y/o al menos un transcrito para al menos uno de los genes en el conjunto (J) o (L), y;
- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de dichos genes.

25

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un kit que comprende cualquier combinación seleccionada de los conjuntos de sondas mencionados anteriormente para identificar los conjuntos de marcadores moleculares mencionados anteriormente.

30

Según aún un aspecto adicional de la invención, se proporciona una micromatriz que comprende uno cualquiera o más de los conjuntos de sondas mencionados anteriormente para identificar el nivel de expresión de uno cualquiera o más de los conjuntos de marcadores moleculares mencionados anteriormente.

35

En otro aspecto de la invención, se proporciona un kit para determinar la probabilidad de supervivencia y/o recidiva de cáncer de mama y/o la naturaleza metastásica de un cáncer en una paciente, comprendiendo el kit:

- (a) al menos una micromatriz que comprende una pluralidad de sondas para identificar al menos un conjunto de marcadores moleculares descritos en los métodos anteriores; y, opcionalmente,
- (b) una segunda micromatriz que comprende una pluralidad de sondas para identificar el mismo conjunto de marcadores moleculares en un patrón interno que representa el nivel normal de expresión de dichos marcadores.

40

La invención también proporciona una micromatriz o conjunto de sondas tal como se describió anteriormente.

45

La presente invención se describirá ahora mediante los siguientes ejemplos haciendo referencia a las tablas 1-3 y a las figuras 1-4 en las que:

La figura 1 muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para todos los marcadores en la tabla 1.

50

La figura 2 muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para los marcadores indicados con un * en la tabla 1.

La figura 3 muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para todos los marcadores en la tabla 2.

55

La figura 4 muestra una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para los marcadores indicados con un * en la tabla 2.

60 Tejidos y células

Se recogieron tejidos tumorales de mama y tejidos normales asociados inmediatamente después de la cirugía y se congelaron hasta su uso. Esto se realizó con la aprobación de un comité ético local y tuvo lugar principalmente entre 1991-1994, con un número limitado recogido entre 1995-1996. El presente análisis se basa en una mediana de seguimiento de 10 años a junio de 2004. El presente estudio usó tejidos cancerosos de mama (n = 120) y tejidos de referencia normales (n = 32). Se adquirieron líneas celulares de cáncer de mama humano MCF-7 y MDA MB 231, línea celular de fibroblastos humanos MRC-5 de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (ECACC, Salisbury, Inglaterra). Se adquirieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de TCS Biologicals

65

(Oxford, Inglaterra). Se obtuvo información sobre la patología, información clínica durante y tras la cirugía, desenlaces clínicos de la paciente, poco después de la cirugía o en el momento del seguimiento.

Procesamiento de los tejidos

Los tejidos mamarios se congelaron en cortes. Los cortes se dividieron en las tres partes siguientes: una parte para la histología de rutina, una parte para la inmunohistoquímica y la otra parte fue para la preparación del ARN.

Extracción de ARN de las células y tejidos y síntesis de ADNc

Se obtuvieron cortes congelados de los tejidos a un espesor de 5-10 μm y se conservaron para la inmunohistoquímica y la histología de rutina (Jiang *et al.* 2003a). Se homogeneizaron 15-20 cortes adicionales usando un homogeneizador portátil, en disolución de extracción de ARN helada. Se determinó la concentración de ARN usando un espectrofotómetro UV. Se llevó a cabo la transcripción inversa usando un kit de RT con un cebador de oligo-dt anclado suministrado por AbGeneTM, usando 1 μg de ARN total en placas de 96 pocillos. Se verificó la calidad del ADNc usando cebadores de β -actina. El kit de extracción de ARN y el kit de RT se obtuvieron de AbGene Ltd, Surrey, Inglaterra, RU. Se diseñaron los cebadores de PCR usando Beacon Designer (California, EE.UU.) y se sintetizaron por InvitrogenTM Ltd (Paisley, Escocia, RU). La agarosa de calidad para biología molecular y el marcador de tamaño molecular de ADN fueron de Invitrogen. La mezcla madre para la PCR de rutina y la PCR cuantitativa fue de AbGene.

Análisis cuantitativo de los marcadores genéticos

El nivel de transcritos de los miembros de la familia CCN de los ADNc preparados anteriormente se determinó usando PCR cuantitativa en tiempo real, basada en la tecnología AmplifluorTM (Nazarenko *et al.* 1997), modificada a partir de un método notificado previamente (Jiang *et al.* 2003a y 2003b). En resumen, se diseñaron un par de cebadores de PCR usando el software Beacon Designer (versión 2, California, EE.UU.). Para uno de los cebadores (de manera rutinaria para el cebador antisentido en el laboratorio), se añadió una secuencia adicional, conocida como la secuencia Z (5'actgaacctgacctaca'3) que es complementaria a la sonda universal Z (Nazarenko *et al.* 1997) (Intergen Inc., Inglaterra, RU). Se adquirió un kit de detección TaqmanTM para β -actina de Perkin-ElmerTM.

La reacción se llevó a cabo usando lo siguiente: mezcla madre Hot-start Q (Abgene), 10 μmol de cebador directo específico, 1 μmol de cebador inverso que tiene la secuencia Z, 10 μmol del sonda marcada con FAM (Intergen Inc.), y ADNc a partir aproximadamente de 50 ng de ARN (calculado a partir del ARN de partida en la reacción de RT). La reacción se llevó a cabo usando IcylerQTM (Bio-RadTM) que está equipado con una unidad óptica que permite la detección en tiempo real de 96 reacciones, usando la siguiente condición: 94°C durante 12 minutos, 50 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 40 segundos y 72°C durante 20 segundos (Jiang *et al.* 2003b, 2003c, Parr y Jiang 2004). Los niveles de los transcritos se generaron a partir de un patrón interno (Jiang *et al.* 2003a) que se amplificó de manera simultánea con las mezclas. Los resultados se muestran en este caso de dos maneras: niveles de transcritos basados en cantidades iguales de ARN, o como una razón diana/CK19.

Tinción inmunohistoquímica de las moléculas cuando fue apropiado

Se obtuvieron cortes congelados de tumor de mama y el tejido de referencia a un espesor de 6 μm usando un criostato (Jiang *et al.* 2003c). Se montaron los cortes sobre portaobjetos para microscopio Super frost plus, se secaron al aire y luego se fijaron en una mezcla de acetona al 50% y metanol al 50%. Entonces, se colocaron los cortes en tampón de lavado "Optimax" durante 5-10 minutos hasta su rehidratación. Se incubaron los cortes durante 20 minutos en una disolución de bloqueo de BSA al 0,6% y se sondaron con un anticuerpo primario. Tras lavados exhaustivos, los cortes se incubaron durante 30 minutos en un anticuerpo biotinilado secundario (inmunoglobulina porcina anticabra/ratón/conejo Multilink, Dako Inc.). Tras los lavados, se aplicó entonces el complejo avidina-biotina (Vector Labs) a los cortes, seguido de lavados exhaustivos. Entonces, se añadió el cromógeno diaminobencidina a los cortes que se incubaron en la oscuridad durante 5 minutos. Entonces, se tiñeron los cortes para el recuento en hematoxilina de Gill y se deshidrataron en grados ascendentes de metanol antes de aclarar en xileno y montar bajo un cubreobjetos. Se cuantificó la tinción citoplasmática de las respectivas proteínas usando el software Optimas 6.0 tal como se describió previamente (Davies *et al.* 2000, King *et al.* 2004) y se muestran en este caso como densidad de tinción relativa.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando la prueba de la U de Mann-Whitney y la prueba de Kruskal-Wallis. El análisis de supervivencia se llevó a cabo usando la curva de supervivencia de Kaplan-Meier y el análisis de una variable (SPSS11).

Resultados

Moléculas seleccionadas

Se han cuantificado 453 moléculas frente a la información clínica completa que incluye un seguimiento de 10 años. Tras el análisis de las tasas de supervivencia e incidencia de recidiva de la enfermedad, se han desarrollado tres firmas, la firma molecular de supervivencia y la firma molecular de predicción de incidencia y la firma molecular metastásica.

La firma molecular de supervivencia

Tal como se muestra en la tabla 1, se encontraron 51 moléculas que tienen una correlación positiva con la baja supervivencia y 14 inversamente correlacionados con la baja supervivencia. La figura 1 muestra que se prevé que el 92,2% de los individuos que tienen lo que se denomina en el presente documento una “buena firma” (es decir, que no tienen un alto nivel de expresión de las moléculas en la columna de la izquierda de la tabla 1, y que no tienen subexpresión de las moléculas en la columna de la derecha de la tabla 1), sobrevivirá durante hasta 148,9 meses, mientras que se prevé que sólo el 8,3% de los individuos que tienen lo que se denomina en el presente documento una “mala firma” (es decir, que tienen una alta expresión de las moléculas en la columna de la izquierda de la tabla 1, y una subexpresión de las moléculas en la columna de la derecha en la tabla 1) sobrevivirán durante hasta 40 meses. Este resultado es estadísticamente significativo, con un valor de $p < 0,00001$.

Usando la curva de supervivencia de Kaplan-Meier y el análisis de una variable, se mejoró la firma molecular identificando aquellas moléculas que contribuyen más a la precisión estadística (identificadas con * en la tabla 1). Se encontró que 33 marcadores moleculares primarios, 25 de los cuales tienen una correlación positiva con baja supervivencia y 8 de los cuales tienen una correlación negativa con baja supervivencia, representan la mayoría de la significación estadística. La figura 2 muestra la curva de supervivencia prevista usando la primera y la segunda firmas moleculares primarias, teniendo el 93,2% de los individuos una buena firma que prevé que sobrevivirán durante hasta 149,69 meses, y teniendo sólo el 14,4% de los individuos una mala firma que prevé que sobrevivirán durante hasta 52,3 meses ($p < 0,000001$).

La firma molecular de predicción libre de incidencia

Tal como se muestra en la tabla 2, se encontraron 48 moléculas que tienen una correlación positiva con la aparición de incidencia (recidiva y metástasis) y 13 inversamente correlacionados con la aparición de incidencia. La figura 3 muestra que se prevé que el 94,5% de los individuos que tienen una buena firma (es decir, que no tienen una alta expresión de las moléculas en la columna de la izquierda de la tabla 2, y que no tienen subexpresión de las moléculas en la columna de la derecha de la tabla 2) no tendrán recidiva de la enfermedad (es decir, supervivencia libre de enfermedad) durante hasta 150,4 meses, mientras que se prevé que sólo el 34,5% de los individuos que tienen una mala firma (es decir, que tienen una alta expresión de las moléculas en la columna de la izquierda de la tabla 2, y una subexpresión de las moléculas en la columna de la derecha de la tabla 2) vivirán libres de enfermedad durante hasta 72,4 meses ($p < 0,00001$).

Como con la firma de supervivencia anterior, también se mejora esta firma, y se encontró que 36 marcadores moleculares primarios (indicados con * en la tabla 2), 28 de los cuales tienen una correlación positiva con recidiva, y 8 de los cuales tienen una correlación negativa con recidiva, representan la mayoría de la significación estadística. La figura 4 muestra la curva de supervivencia prevista usando la tercera y la cuarta firmas moleculares primarias, teniendo el 91,7% de los individuos una buena firma que prevé que no tendrán recidiva de la enfermedad durante hasta 148,4 meses, y teniendo sólo el 5,88% de los individuos una mala firma que prevé que sobrevivirán, sin ninguna recidiva de la enfermedad, durante hasta 44,2 meses ($p < 0,000001$).

La firma molecular de metástasis ganglionar

Tal como se muestra en la tabla 3, se encontraron 37 moléculas que tienen una correlación positiva con metástasis ganglionar y 10 inversamente correlacionados con la metástasis ganglionar. La combinación de estas 37 moléculas ha mostrado que el 91% de los tumores con una mala firma (es decir, que tienen una alta expresión de las moléculas en la columna de la izquierda de la tabla 3, y una subexpresión de las moléculas en la columna de la derecha de la tabla 3) desarrollaron metástasis ganglionar. Además, el 88,9% de los tumores con buena firma (es decir, que no tienen una alta expresión de las moléculas en la columna de la izquierda de la tabla 3, y que no tienen subexpresión de las moléculas en la columna de la derecha de la tabla 3) no tienen metástasis ganglionar ($p = 0,00024$).

Como antes, se ha modificado esta firma mejorando la combinación, y se ha encontrado que también se pronosticó bien una combinación de 21 genes primarios, 20 de los cuales se correlaciona positivamente con la metástasis ganglionar y 1 de los cuales se correlaciona negativamente con la metástasis ganglionar (indicados con * en la tabla 3). El 89,1% de los tumores con una mala firma tuvieron metástasis ganglionar y el 86,8% de los tumores con una buena firma no tuvieron metástasis ganglionar ($p = 0,0000205$).

Bibliografía

Davies et al. 2000: Davies G, Jiang W G, Mason M D. Cell-cell adhesion and signalling intermediates in human prostate cancer. *Journal of Urology*, 2000, 163, 985-992

Jiang et al. 2003a: Jiang W G, Watkins G, Lane J, Douglas-Jones A, Cunnick G H, Mokbel M, Mansel R E. Prognostic value of Rho family and rho-GDIs in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9 (17), 6432-6440

Jiang et al. 2003b: Jiang W G, Douglas-Jones A, and Mansel R E. Level of expression of PPAR-gamma and its co-activator (PPAR-GCA) in human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 2003, 106, 752-757

Jiang et al. 2003c: Jiang W G, Grimshaw D, Lane J, Martin T A, Parr C, Davies G, Laterra J, and Mansel R E. Retroviral hammerhead transgenes to cMET and HGF/SF inhibited growth of breast tumour, induced by fibroblasts. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9, 4274-4281

King et al 2004: King J A C, Ofori-Acquah A F, Stevens T, Al-Mehdi A B, Fodstad O; Jiang W G. Prognostic value of ALCAM in human breast cancer. *Breast Cancer Research*, 2004, R478-487

Nazarenko et al. 1997: Nazarenko I A, Bhatnagar S K, Hohman R J. A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2516-21

Parr and Jiang 2004: Parr C and Jiang W G. The Notch receptors, Notch-1 and Notch-2, in human breast cancers. *International Journal of Molecular Medicine*, 2004 Nov.;14(5): 779-786

TABLA 1

Firma molecular para la supervivencia global

Alta con incidencia		Baja con incidencia	
Kit original (la curva de supervivencia es la figura 1)	Kit modificado (genes indicados con *, la curva de supervivencia es la figura 2)	Kit original (figura 1)	Kit modificado (genes indicados con *, figura 2)
AMF	*	aMOT	
ATF4	*	ARP2	*
Basigina		Atf-1	
Beta-catenina		Atf-3	*
BMP1		Claudina-1	
BMP10		HuR (0,05)	*
Calpaína grande		IL22R	
CD44		MEN1 (0,02)	*
CX43		Paracelina	*
CiclinaD2		PTP-RK	*
Cyr61	*	Radixina	*

ES 2 339 132 T3

	EHMS		Razón	*
5			RHO8/gdiG	
	ER	*	Rock 2	
	FAK		VEG1	
10	FAP			
	GIRK			
	HAVR1			
15	Isotopo3			
	JAK1			
20	LOX12			
	Matriptasa2	*		
	MET	*		
25	MLN64	*		
	MMP7	*		
	Nectina4	*		
30	NET-2			
	PAR1A	*		
35	PAR1A2			
	Psoriason	*		
	PTHrP			
40	Pttg1	*		
	Rho-C	*		
45	Rho-G			
	S100A4			
	Scotin	*		
50	SDF-1	*		
	SEMP1	*		
55	SPARC			
	SPF45	*		
	SST1	*		
60	ST15	*		
	TACC2	*		
	TBD10	*		
65	TCF2	*		

ES 2 339 132 T3

TCF3			
TEM6	*		
TEM7R	*		
VECAD			
Vilip			
Wave2			
ZO-3	*		

TABLA 2

Firma molecular para la supervivencia libre de incidencia en cáncer de mama humano

Kit original, genes = 61			
Kit modificado, genes = 36			
Alta con incidencia		Baja con incidencia	
Kit original (la curva de supervivencia es la figura 3)	Kit modificado (genes indicados con *, figura 4)	Kit original (figura 3)	Kit modificado (genes indicados con *, figura 4)
AAMP	*	ATF3	
AMFR	*	Bmp3	*
Angiotensina2R1		Bmp4	
ATF4		BMPR1A	
Bmp8	*	IL22R	*
BMP9	*	IL24	*
Bmp10		JAK1	*
Beta-catenina	*	MEN1	
CAR	*	Paracelina	
CASM		PTP-RK	*
CatepsinaS		Rho8/GdiG	*
Creb12	*	Snail	*
CX43		WASP	*
DRIM	*		
EHMS	*		
Elastasa PMN			

ES 2 339 132 T3

	Endomuscina2	*		
	FAK	*		
5	FAP	*		
	GIRK			
10	HAVR1			
	HIN			
	Isotopo 1	*		
15	Isotopo3			
	Kiss1			
20	Kiss1/ck19	*		
	LOX12			
	NOS3			
25	Notch	*		
	PAR1A	*		
	Par1A2	*		
30	PLC-delta	*		
	PMSA			
35	Psoriasina	*		
	PTTG1	*		
	RhoC	*		
40	Rock1	*		
	S100A4			
45	SDF1	*		
	SEMP1			
	SST1	*		
50	ST15	*		
	TACC2			
	TEM6	*		
55	TEM7R	*		
	Ubiquitina			
60	WISP2			

65

ES 2 339 132 T3

TABLA 3

Firma molecular para predecir metástasis ganglionar

Significativamente alta con metástasis ganglionar		Significativamente baja con incidencia	
<u>Presentación</u> <u>inicial</u>	<u>Firma</u> <u>modificada</u> <u>(*)</u>	<u>Presentación</u> <u>inicial</u>	<u>Firma</u> <u>modificada (*)</u>
Angiomotina		ALCAM	
BAF57	*	Eplin	
BMP7		ERbeta	
BNDF	*	Glypic3	
CAR1	*	JAK1	
CASM	*	MAGI-1	
Catepsina-L	*	Paracelina	*
Creb 1/2	*	PEDF	
CXCR10	*	PKC-eta	
CiclinaD1		Sthalin	
ADN ligasa-1		WWOX	
DRIM	*		
HERG	*		
IGFBP7			
ILR7	*		
IL-11	*		
Kiss1	*		
LYVE			
MKK1	*		
NET2			
PMN-elastasa	*		
PTTP1	*		
RHO8			
SDF5	*		
SRBC			
Stath4			
TACC2	*		
TGAsa-3			
Ubiquitina	*		
Vinculina			

ES 2 339 132 T3

VIPR1	*	
VUDP	*	
WAVE2		

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos, comprendiendo el método:

- (a) examinar una muestra de tejido canceroso de mama de un individuo con el fin de determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los siguientes marcadores moleculares: AMF, ATF4, Cyr61, ER, matriptasa2, MET, MLN64, MMP7, nectina4, PAR1A, psoriasis, Pttg1, Rho-C, Scotin, SDF1, SEMP1, SPF45, STT1, ST15, TACC2, TBD10, TCF2, TEM6, TEM7R, y ZO-3; y
- (b) cuando se determina un alto nivel de expresión para estos marcadores con respecto al nivel de expresión de los mismos marcadores en pacientes que se ha considerado que tienen un pronóstico moderado;
- (c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una baja probabilidad de supervivencia que es inferior al 20% de la de los individuos que sobreviven más de cinco años.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la parte (a) comprende además determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos uno de los siguientes marcadores moleculares: basigina, beta-catenina, BMP1, BMP10, calpaína grande, CD44, CX43, ciclinaD2, EHMS, FAK, FAP, GIRK, HAVR1, Isotopo3, JAK1, LOX12, NET-2, PAR1A2, PTHrP, Rho-G, S100A4, SPARC, TCF3, VECAD, Vilip, Wave-2.

3. Método según la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que la parte (a) comprende además determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para los siguientes marcadores moleculares: ARP2, Atf-3, HuR, MEN1, paracelina, PTP-RK radixina y razón RHO8/gdiG; y

- (b) cuando se determina un bajo nivel de expresión para estos marcadores;
- (c) concluir que el individuo del que se ha tomado la muestra de tejido tiene una baja probabilidad de supervivencia.

4. Método según la reivindicación 3, en el que la parte (a) comprende además determinar el nivel de expresión de los genes que codifican para al menos uno de los siguientes marcadores moleculares: aMOT, Atf-1, claudina-1, IL22R, Rock 2, Veg1.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tejido canceroso es de un ser humano.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tejido canceroso es de una mujer.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina el nivel de expresión sometiendo a ensayo para determinar la presencia de ARN o ARNm.

8. Método según una cualquiera de la reivindicaciones 1-7, en el que se determina el nivel de expresión sometiendo a ensayo para determinar la(s) proteína(s) codificada(s) por los marcadores moleculares.

9. Método según la reivindicación 8, en el que el método implica el uso de agentes que se unen a la(s) proteína(s) pertinente(s) y así la(s) identifica(n).

10. Método según la reivindicación 9, en el que los agentes son anticuerpos.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se amplifica el marcador seleccionado, antes de realizar la parte (a).

12. Método según la reivindicación 11, en el que se amplifica el marcador mediante PCR.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina el nivel de expresión de un marcador molecular dado teniendo en cuenta una muestra control, en el que la muestra control es una cualquiera de lo siguiente: una muestra de tejido de mama que está libre de cáncer, una muestra de tejido de mama tomada de un individuo que no presenta cáncer, o un patrón reconocido para la expresión de cada marcador molecular pertinente en un individuo sano.

14. Kit para determinar el pronóstico de cáncer de mama en mamíferos que consiste en:

- (a) una pluralidad de sondas limitadas a aquéllas para identificar al menos un transcrito de cada uno de los genes en el siguiente conjunto de marcadores: AMF, ATF4, Cyr61, ER, matriptasa2, MET, MLN64, MMP7, nectina4, PAR1A, psoriasis, Pttg1, Rho-C, Scotin, SDF1, SEMP1, SPF45, SST1, DT15, TACC2, TBD10, TCF2, TEM6, TEM7R y ZO-3; y

- (b) reactivos e instrucciones opcionales que determinan, o muestran cómo determinar, el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

15. Kit según la reivindicación 14, en el que dicho kit consiste además en:

- (a) una pluralidad de sondas que pueden identificar al menos un transcrito de al menos uno de los genes en el siguiente conjunto de marcadores: basigina, beta-catenina, BMP1, BMP10, calpaína grande, DC44, CX43, ciclinaD2, EHMs, FAK, FAP, GIRK, HAVR1, Isotopo3, JAK1, LOX12, NET-2, PAR1A2, PTHrP, Rho-G, S100A4, SPARC, TCF3, VECAD, Vilip, Wave2, y/o al menos un transcrito de cada uno de los genes en el siguiente conjunto de marcadores ARP2, Atf-3, HuR, MEN1, paracelina, PTP-RK radixina y razón RHO8/gdiG, y/o al menos un transcrito de al menos uno del siguiente conjunto de marcadores: aMOT, Atf-1, claudina-1, IL22R, rock 2, y;

- (b) opcionalmente, reactivos e instrucciones que determinan el nivel de expresión de cada uno de dichos genes.

16. Kit para determinar la probabilidad de supervivencia y/o recurrencia de cáncer de mama y/o la naturaleza metastásica de un cáncer en una paciente, consistiendo el kit en:

- (a) al menos una micromatriz que consiste en al menos un conjunto de sondas limitadas a aquéllas para identificar los conjuntos de marcadores moleculares que consisten en las firmas moleculares descritas en las reivindicaciones 1-4; y opcionalmente,

- (b) una micromatriz secundaria que comprende una pluralidad de sondas para identificar el mismo conjunto de marcadores moleculares en un patrón interno que representa el nivel de expresión de dichos marcadores en o bien un individuo libre de cáncer o bien una paciente con pronóstico moderado.

17. Micromatriz según la reivindicación 16.

18. Conjunto de sondas según las reivindicaciones 14-15.

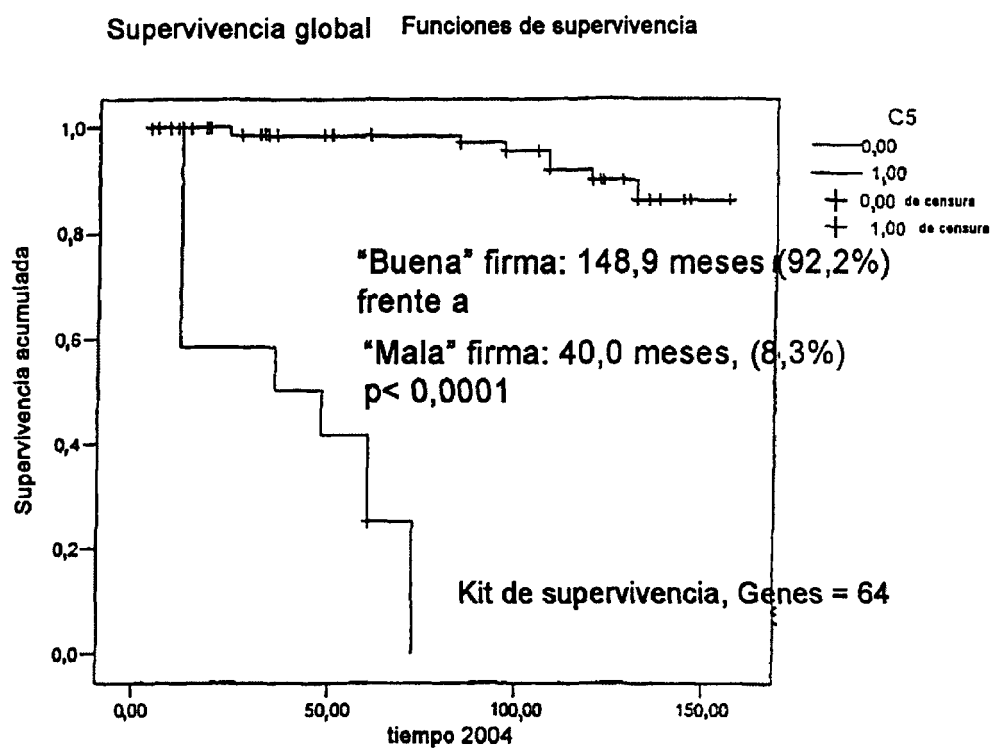


Figura 1. Kit de supervivencia de Kaplan-Meier para el kit original

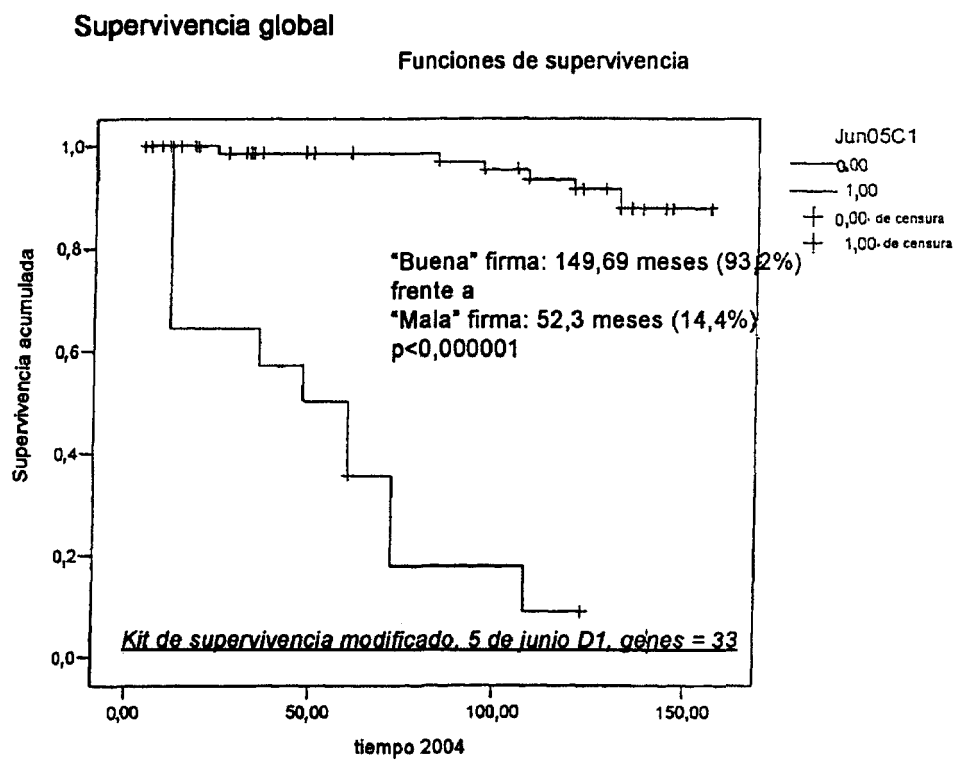


Figura 2. Kit de supervivencia de Kaplan-Meier para el kit modificado

Supervivencia libre de enfermedad

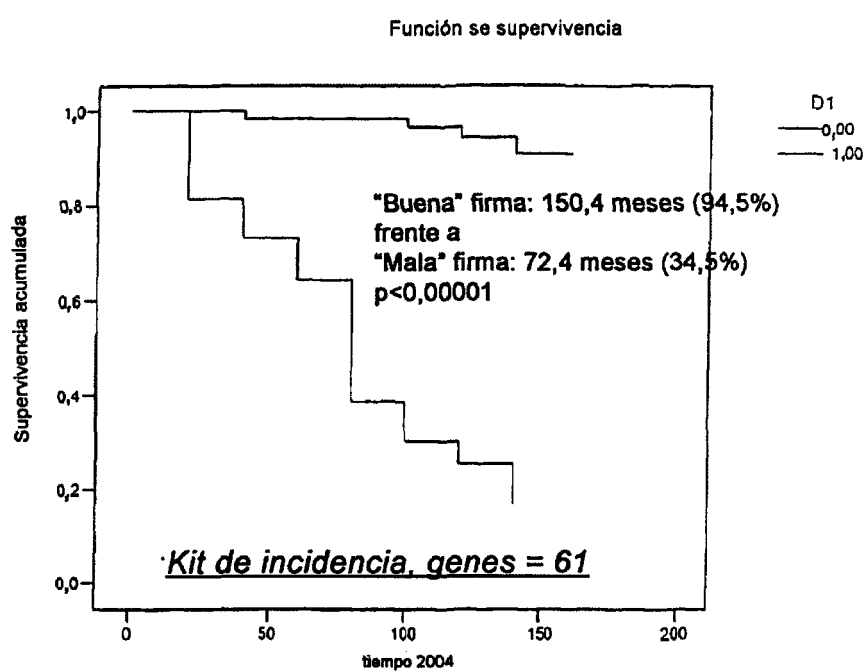


Figura 3. Curva de supervivencia de Kaplan Meier (supervivencia libre de enfermedad), basada en el kit original

Libre de enfermedad

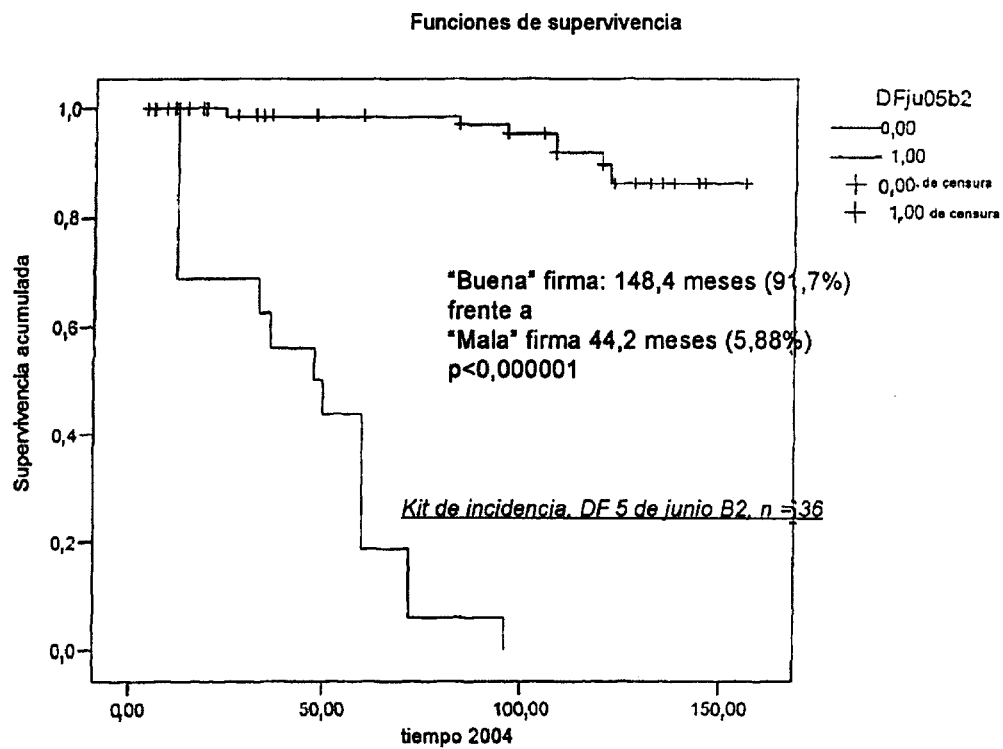


Figura 4. Kit de supervivencia de Kaplan-Meier, basado en el kit modificado