

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 363 669**

21 Número de solicitud: 200930294

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **10.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **11.08.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
11.08.2011

71 Solicitante/s: **Fundació Privada Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) Hospital Duran i Reynalds, 3ª Planta Avda. Gran Vía, 199 08907 l'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES Universitat Pompeu Fabra, Universitat de Barcelona y Institut Català d'Oncologia**

72 Inventor/es: **Sanz Pamplona, Rebeca; Sierra Jiménez, Angels; Oliva Miguel, Baldomero; Moreno Aguado, Víctor Raúl y Gil Gil, Juan Miguel**

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

54 Título: **Método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral y un kit para llevar a cabo dicho procedimiento.**

57 Resumen:

Método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral y un kit para llevar a cabo dicho método.

El método comprende: (a) aislar una muestra de un tumor de mama; (b) determinar el nivel de expresión de GRP94, FN14 o de ambos en la muestra; y (c) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de dicho gen o genes en una muestra control, de manera que si se detecta una sobreexpresión de dicho gen o genes en relación con la muestra control, esto es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.

El kit para llevar a cabo el método de la invención comprende medios apropiados para determinar el nivel de expresión de cada uno de los marcadores.

Tanto el método como el kit proporcionan una información precisa sobre el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en una fase temprana, lo cual puede conducir a una reducción de la incidencia de la metástasis cerebral derivada del cáncer de mama.

ES 2 363 669 A1

DESCRIPCIÓN

Método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral y un kit para llevar a cabo dicho método.

- 5 La presente invención se refiere a marcadores indicativos de metástasis cerebral. Estos marcadores encuentran utilidad en la determinación del riesgo de desarrollar metástasis, en particular metástasis cerebral.

Estado de la técnica anterior

- 10 El cáncer es un proceso que acontece en múltiples etapas y aparece como resultado de la pérdida de control de la división celular, conduciendo a la formación de un tumor inicial que después puede diseminarse, y desarrollar un tumor en un órgano distante o metástasis.

- 15 Una característica diferencial de las células malignas es su capacidad para invadir tejido normal circundante, metastatizar a través de los sistemas sanguíneo y linfático y reestablecerse en localizaciones secundarias distantes. Para formar metástasis, las células tumorales individuales deben desprenderse de la masa tumoral primaria, degradar la matriz extracelular, invadir el tejido normal circundante, entrar en la circulación sanguínea o linfática, abandonar la circulación en un tejido distal y establecer colonias satélite dentro de este nuevo entorno tisular. Este comportamiento requiere la función cooperativa de numerosas proteínas. Esta diseminación metastásica del tumor sólido es responsable
20 directa o indirectamente de la mayoría de las muertes relacionadas con cáncer.

- El tratamiento médico del cáncer puede ayudarse de marcadores de pronóstico y de marcadores predictivos terapéuticos. Los marcadores de pronóstico evalúan el riesgo de avance de la enfermedad independiente de la terapia. Los marcadores predictivos terapéuticos indican la sensibilidad o resistencia de un cáncer a un tratamiento específico.
25 Para la mayoría de los cánceres y tratamientos del cáncer, existen subconjuntos de pacientes que responderán a un tratamiento particular y subconjuntos de pacientes que no responderán al tratamiento.

- El uso de marcadores predictivos terapéuticos para identificar subconjuntos de pacientes que probablemente respondan al tratamiento facilitaría la selección de un tratamiento apropiado y evitaría retrasos innecesarios asociados con un tratamiento ineficaz. Además, debido a que la mayoría de los tratamientos de cáncer se asocian con efectos secundarios adversos intrínsecos al tratamiento, dichos marcadores predictivos eliminan riesgos innecesarios de efectos secundarios adversos reduciendo la administración de tratamientos de cáncer a individuos en los que es probable que el tratamiento falle.
30

- 35 Actualmente, los únicos marcadores predictivos terapéuticos recomendados en oncología son el estado de ER (receptor de estrógenos) y PR (receptor de progesterona) para seleccionar cánceres de mama sensibles a hormonas, y HERB-2 para identificar pacientes con cáncer de mama que podrían beneficiarse del tratamiento con trastuzumab.

- La incidencia de metástasis cerebral en pacientes con cáncer de mama que sobreexpresan HERB-2 tratados con trastuzumab es el doble que en otros pacientes con cáncer de mama. Por otro lado, un tercio de los pacientes diagnosticados de cáncer de mama desarrollará metástasis en el SNC y, con frecuencia, esto se produce cuando están respondiendo a la terapia en otros órganos o tienen una enfermedad estable. Por lo tanto, los fármacos con un alto impacto sobre la evolución clínica de pacientes con cáncer de mama metastásico, tales como taxanos o trastuzumab, desempeñan solamente un papel limitado en el tratamiento de la metástasis cerebral (Tosoni A. *et al.*, "Chemotherapy in breast cancer patients with brain metastases: Have new chemotherapeutic agents changed the clinical outcome?", *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2008, vol. 68 (3), págs. 212-221). La resistencia a agentes dirigidos contra HERB-2 continúa siendo un problema médico importante ya que muchos cánceres positivos para HERB-2 presentan una resistencia intrínseca.
40

- Las metástasis cerebrales ocurren en el 10-15% de los pacientes con cáncer de mama avanzado y últimamente se han convertido en un problema médico significativo. Puede suponerse que hasta un 30% de los pacientes con cáncer de mama metastásico experimentarán metástasis cerebral durante el curso de su enfermedad. El aumento en este índice podría estar relacionado con una mayor supervivencia en pacientes que reciben quimioterapia y con el hecho de que es difícil superar la barrera hematoencefálica (BHE) con los tratamientos sistémicos actuales. Las dificultades en el manejo de la terapia de metástasis cerebral dan como resultado una supervivencia media de siete meses, siendo la metástasis cerebral la causa de muerte o un factor contribuyente principal de la misma en el 68% de los pacientes.
45

- Es necesaria una estimación adecuada de factores predictivos independientes en el diagnóstico del tumor inicial para permitir al médico determinar si dicho tumor puede metastatizar. Esta información sería útil para el médico para decidir entre tratamientos agresivos, evitar un tratamiento innecesario y diseñar terapias específicamente dirigidas contra aspectos diferenciales de cada localización metastásica.
50

Por lo tanto, existe la necesidad de marcadores predictivos que proporcionen información acerca del riesgo de que metastatice a otros órganos un tumor primario para tratar eficazmente la enfermedad.

65 Descripción resumida de la invención

Hasta ahora, poco se sabía sobre los factores predictivos que permiten la identificación temprana del riesgo de metástasis en el sistema nervioso central ("SNC") de pacientes con cáncer primario. El análisis de tejidos metastásicos,

el uso de estrategias bioinformáticas y la caracterización de la expresión de proteínas en tumores con metástasis específica a un determinado órgano han permitido a los inventores de la presente solicitud encontrar marcadores que proporcionan una información específica acerca de si las células cancerosas tienen una predisposición a metastatizar.

5 Así, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama, comprendiendo el método: (a) aislar una muestra del tumor de mama; (b) determinar el nivel de expresión de GRP94, FN14 o ambos en la muestra; y (c) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de dicho gen o genes en una muestra control, de manera que si se detecta una sobreexpresión de dicho gen o genes en relación con la muestra control, esto es indicativo del riesgo de
10 desarrollar metástasis cerebral.

Como se muestra más abajo, los inventores de la presente solicitud han analizado en profundidad las rutas patogénicas que intervienen en la metástasis cerebral mediante el análisis de la expresión de proteínas en tejidos de cerebro humano metastásico y de tumores de mama primarios, y han llevado a cabo un análisis funcional adicional de las
15 células. De esta forma, se ha identificado un fenotipo de resistencia al estrés del retículo endoplásmico (en lo sucesivo también denominado “ERSRP”) en cánceres de mama, que predice la evolución a metástasis cerebral y que, al mismo tiempo, es útil para tomar decisiones terapéuticas. Sin estar ligado a teoría alguna, los inventores creen que dicho ERSRP se basa principalmente en el nivel de expresión incrementado de GRP94 y/o FN14.

20 Sorprendentemente, los inventores de la presente solicitud han descubierto que GRP94 y FN14 se expresan de forma diferencial (i.e. se sobre-expresan) en muestras de tumor de mama primario procedentes de pacientes a los que ya se les ha diagnosticado metástasis cerebral. De hecho, el perfil de expresión de estos genes en las muestras de tumor de mama primario procedentes de estos pacientes fue el mismo que el que se encontró después de analizar muestras de metástasis cerebral. Esto respalda el uso de estos genes como marcadores predictivos de metástasis cerebral en
25 tumores de mama primarios.

La expresión diferencial de GRP94 y/o FN14 puede conferir al método una mayor sensibilidad, mejorando la capacidad de discriminación (principalmente porque la no detección de GRP94 y/o FN14 será indicativa de que no existe riesgo de metástasis cerebral) y, de este modo, reduciendo los falsos negativos asociados a otros métodos de
30 diagnóstico basados en la detección de otros marcadores tales como HERB-2 (véanse los datos que se muestran en la Tabla 2).

Como se ha descrito anteriormente, la metástasis es un proceso complejo. Esta complejidad hace impredecible si un tumor primario puede o no metastatizar y qué órgano u órganos pueden verse afectados por la metástasis. En
35 este sentido, el médico tiene el problema adicional de que la metástasis se detecta en una fase avanzada ya que las primeras fases son “silenciosas”, de modo que cuando se detecta, mediante técnicas de imágenes, es muy difícil tratar eficazmente al paciente.

De acuerdo con el método del primer aspecto de la invención, si el médico, después de analizar la muestra de
40 cáncer de mama, determina la sobreexpresión de GRP94 y/o FN14, entonces puede realizar un análisis adicional mediante técnicas de imagen, por ejemplo RMN, del cerebro para confirmar si se ha producido o no la metástasis cerebral. Para el médico esto es de importancia porque le permitiría establecer el protocolo apropiado para el paciente desde el momento del diagnóstico del tumor primario, determinando qué tratamiento puede ser el más eficaz para tratar/prevenir la enfermedad metastática. Si en la técnica de imagen se visualiza la metástasis cerebral, el médico
45 diseñará el tratamiento específico para paliarla, con la ventaja de que se habrá diagnosticado esta metástasis en un estado temprano. Por lo tanto, la invención supone un gran avance en el campo del cáncer ya que permite predecir en un estado temprano la predisposición a metástasis cerebral, lo cual puede conducir a una reducción de la incidencia de la metástasis cerebral en el cáncer de mama.

50 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit para llevar a cabo el método que se ha definido en el primer aspecto de la invención, comprendiendo el kit medios apropiados para determinar el nivel de expresión de cada uno de los genes.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir
55 otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

60 Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 representa el análisis inmunohistoquímico para identificar las proteínas indicadas en parejas de tumor-
metástasis cerebral embebidas en parafina (x 20) Se muestra la tinción con hematoxilina-eosina (H y E) de cada tejido, observada mediante microscopía óptica (x 10). A: Metástasis, B: Tumor primario.
65

Fig. 2 muestra la expresión de proteína en tejidos de cáncer de mama para cada una de las proteínas indicadas realizando una inmunohistoquímica. Las intensidades de tinción bajas y medias se consideraron negativas con fines
semicuantitativos (L(-) y M(-), respectivamente), y sólo los tumores con una tinción de alta intensidad (H) se tuvieron

en cuenta como muestras positivas. Los cuadrados pequeños son la muestra de tejido de control positivo patrón usada en cada determinación.

Fig. 3 representa la curva de ROC (SE (sensibilidad) frente a SP (especificidad)) para el marcador HERB-2 (línea de puntos) y para la combinación de GRP94 + FN14 + Inhibina (línea continua).

Descripción detallada de modos de realización

La presente invención proporciona un método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama primario, comprendiendo el método: (a) aislar una muestra del tumor de mama; (b) determinar el nivel de expresión de GRP94, FN14 o ambos en la muestra; y (c) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de dicho gen o genes en una muestra control, de manera que si se detecta una sobreexpresión de dicho gen o genes en relación con la muestra control, esto es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.

La muestra control se selecciona dependiendo de la técnica, herramientas e instrucciones del fabricante usadas para determinar el nivel de expresión de GRP94 y FN14. Por ejemplo, si se desea determinar el nivel de las proteínas GRP94 y FN14, el experto en la materia buscará entre los anticuerpos apropiados que se encuentran disponibles en el mercado y seguirá las recomendaciones del fabricante para obtener los mejores resultados. Se proporciona un ejemplo ilustrativo no limitativo en la Tabla 1 de más abajo, en la que para cada uno de los anticuerpos comerciales usados para la detección de las proteínas diana, se usa un tejido control específico. Como alternativa, el médico podría usar una muestra de cáncer de mama primario de un paciente al que ya se le ha diagnosticado metástasis cerebral como control con el fin de determinar si existe sobreexpresión o no en la muestra en análisis.

En una realización del primer aspecto de la invención, se determina el nivel de expresión de GRP94.

La GRP94 (también conocida como HSP90B1, y que tiene el número ID de Swiss Prot P14625) es una proteína del retículo endoplásmico de la familia de proteínas HSP90. La GRP94 está implicada en la maduración conformacional de proteínas destinadas a la presentación en la superficie celular o a la exportación. El descubrimiento de los presentes inventores sugiere que GRP94 puede participaren ERSRP, activando PERK, ATF6 e IRE1. Por lo tanto, la sobreexpresión de GRP94 en la metástasis cerebral puede jugar un papel central en el fenotipo ERSRP.

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, se determina el nivel de expresión de FN14.

El FN14 (también denominado factor inducible de crecimiento de fibroblastos 14, y que tiene el número ID de Swiss prot. ID Q9NP84) es un miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). El FN14 es un gen de respuesta temprana inmediata cuya expresión se activa directamente después de la exposición a factores de crecimiento en fibroblastos, está sobre-regulado en células de glioma de migración estimulada *in vitro* y se ha relacionado con tumores de alto grado.

En una realización del primer aspecto de la invención, se determina el nivel de expresión de GRP94 y FN14.

Como muestran los resultados de la Tabla 3, GRP94 es el más sensible en los tumores positivos para HERB-2, mientras que FN14 es el más específico en tumores negativos para HERB-2. La detección combinada de ambos marcadores confiere al método de la presente invención una predicción fiable del riesgo de que un tumor de mama primario pueda metastatizar en el cerebro.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el método comprende además determinar el nivel de expresión de TRAF-2. Se ha descubierto que TRAF-2 está sobreexpresado en la metástasis cerebral derivada del cáncer de mama y que muestra un valor de sensibilidad superior al mostrado por HERB-2 (véase la Tabla 2). Por lo tanto, la combinación de GRP94 y/o FN14 junto con TRAF2 mejora la sensibilidad del método de la presente invención. Como se muestra más abajo, cuando se calcula la probabilidad positiva y negativa para evaluar la exactitud predictiva de cada uno de los tres genes (es decir, GRP94, TRAF2 y FN14) como marcadores de metástasis cerebral, GRP94 fue el mejor marcador predictivo negativo, seguido de TRAF2 y FN14. De hecho, se descubrió que la exactitud predictiva de estos marcadores era mejor que la de HERB-2. Por lo tanto, la ausencia de o la detección insignificante de al menos uno de estos marcadores en tumores predice con precisión la ausencia de riesgo a desarrollar metástasis cerebral.

El TRAF2 (también denominado “factor asociado a receptor de NF 2” y que tiene el número ID de Swiss protein Q96NT2) es un miembro de la familia de proteínas de factores asociados con receptores de TNF (TRAF). Las proteínas TRAF median la transducción de señales de miembros de la superfamilia de receptores de TNF. Esta proteína interacciona directamente con receptores de TNF y forma un complejo heterodimérico con TRAF1.

En una realización del primer aspecto de la invención, el método comprende además determinar el nivel de expresión de HERB-2.

HERB-2 también se denomina comúnmente Her-2/neu (número ID de Swiss protein P04626). Este gen es un miembro de una familia de genes que proporciona instrucciones para producir receptores de factores de crecimiento.

ES 2 363 669 A1

En otra realización del primer aspecto de la invención, el método comprende además determinar el nivel de expresión de Inhibina.

5 La Inhibina (número ID de Swiss prot P05111) es un péptido que es un inhibidor de la síntesis y secreción de FSH y participa en la regulación del ciclo menstrual.

Se ha descubierto que la Inhibina no está significativamente expresada en muestras de cáncer de mama procedentes de pacientes a los que ya se les ha diagnosticado una metástasis cerebral. Por lo tanto, cuando este marcador no se detecta o (no se detecta significativamente) en la muestra, será indicativo de una predisposición a desarrollar metástasis cerebral. Cuando se usa este marcador como marcador de metástasis cerebral, confiere al método de la invención una especificidad superior al 80%. Por lo tanto, si el método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de GRP94 y/o FN14 e Inhibina, el método ganará exactitud en la predicción de metástasis cerebral.

15 En otra realización del primer aspecto de la invención, el método comprende determinar el nivel de expresión de uno de los siguientes conjuntos de marcadores: (a) GRP94, FN14, Inhibina; (b) GRP94, TRAF2, HERB-2 y FN14; (c) GRP94, FN14, Inhibina y HERB-2; y (d) GRP94, FN14 y TRAF2.

20 Cuando el método se basa en determinar la sobreexpresión de GRP94, FN14 y TRAF2 (no se muestran los datos) se consigue una buena correlación con metástasis cerebral en pacientes con cáncer de mama. El poder predictivo usando la combinación de estos marcadores es mejor que el conseguido solamente con HERB-2 (que de momento es el marcador predictivo comúnmente usado). El método basado en estos tres marcadores representa una nueva herramienta para discriminar el riesgo de metástasis cerebral en cánceres de mama positivos y negativos para HERB-2.

25 Cualquiera de GRP94, FN14 y TRAF2 podría ser útil para tomar decisiones terapéuticas ya que podrían indicar respuesta a terapia.

Los inventores creen que el ERSRP puede predecir qué pacientes podrían tratarse más eficazmente con compuestos diferentes de trastuzumab o incluso tratarse para prevenir el desarrollo de la enfermedad.

30 La realización de un análisis multivariante basado en una regresión logística por etapas reveló que GRP94, FN14 e Inhibina son la mejor combinación para predecir una metástasis cerebral. El área bajo la curva ROC para esta combinación fue de 0,85, mientras que el área bajo la curva ROC para HERB-2 en solitario fue 0,76 (Fig. 3). La combinación de marcadores constituía una mejora significativa sobre la eficacia de predicción de HERB-2.

35 También se realizó un análisis estratificado para comprobar la relación entre la positividad de HERB-2 y ERSRP en combinaciones binarias. Se descubrió que realizando el análisis de la expresión de GRP94, TRAF2 y FN14 se aumentaba significativamente la predicción de la enfermedad metastásica en cerebro en comparación con HERB-2 en solitario.

40 El kit de acuerdo con el segundo aspecto de la invención comprende medios apropiados para llevar a cabo el método que se define en el primer aspecto de la invención. La presencia de los marcadores que forman parte del método del primer aspecto de la invención puede determinarse en base a los transcritos de ARNm o a las proteínas. De esta forma, el kit de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención incluirá medios apropiados para determinar la presencia de transcritos de ARNm o de la proteína correspondiente.

Son bien conocidos en el estado de la técnica métodos y medios para determinar la cantidad de ARNm de un gen particular en una muestra.

50 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es el método más ampliamente usado para la amplificación enzimática *in vitro* de ácidos nucleicos, pero no es el único. La reacción en cadena de la ligasa (LCR), por ejemplo, puede usarse para la detección sensible de una secuencia de ADN con una especificidad aumentada en comparación con la PCR (la LCR puede usarse para la discriminación entre alelos). Durante la LCR, para cada una de las dos cadenas de ADN se ligan dos sondas parciales para formar la misma; por lo tanto, la LCR usa dos enzimas: una ADN polimerasa y una ADN ligasa. Cada ciclo da como resultado una duplicación de la molécula de ácido nucleico diana.

60 Un método cuantitativo para la determinación de ácidos nucleicos es la PCR a tiempo real. La PCR a tiempo real, también denominada PCR a tiempo real cuantitativa (qPCR), se usa para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula de ADN diana. El procedimiento sigue el principio general de la reacción en cadena de la polimerasa; su característica clave es que el ADN amplificado se cuantifica a medida que se acumula en la reacción a tiempo real después de cada ciclo de amplificación. Dos métodos comunes de cuantificación son el uso de colorantes fluorescentes que se intercalan con el ADN bicatenario y sondas oligonucleotídicas de ADN modificadas que presentan fluorescencia cuando hibridan con un ADN complementario.

65 Se han desarrollado estrategias adicionales basadas en la PCR original para la amplificación de ARN, tales como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). En esta técnica, se realiza primero una transcripción inversa de la cadena de ARN en su complementaria de ADN o su ADN complementario, seguida de amplificación del ADN resultante usando una reacción en cadena a la polimerasa. Otro método en la biología molecular

ES 2 363 669 A1

que se usa para amplificar secuencias de ARN es la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA). Explicada de forma resumida, la NASBA funciona de la forma siguiente: (a) se proporciona un molde de ARN a la mezcla de reacción y el primer cebador se une a su sitio complementario en el extremo 3' del molde; (b) la transcriptasa inversa sintetiza la cadena de ADN opuesta complementaria; (c) la ARNasa H destruye el molde de ARN (la ARNasa H sólo destruye el ARN en híbridos de ARN-ADN pero no el ARN monocatenario); (d) el segundo cebador se une al extremo 5' de la cadena de ADN y la ARN polimerasa 5-T7 produce una cadena de ARN complementaria que puede usarse de nuevo en la etapa (a). La NASBA se ha introducido en el diagnóstico médico, donde se ha demostrado que proporciona resultados más rápidos que la PCR, y también puede ser más sensible. Tanto la RT-PCR como la NASBA son técnicas adecuadas para la determinación de la expresión. Preferiblemente, el nivel de expresión de los genes se determina mediante RT-PCR.

Otras técnicas adecuadas para la determinación de la expresión génica son el screening de macroarrays, microarrays y nanoarrays.

Son bien conocidos en el estado de la técnica varios métodos para determinar la cantidad de una proteína en una muestra. Generalmente, estos métodos utilizarán porciones de unión, que son moléculas o segmentos de moléculas capaces de unirse específicamente a la proteína diana (en el presente caso la proteína diana es la proteína codificada por el gen del que se determina la expresión). Pueden identificarse porciones de unión a polipéptidos por medio de un examen. Un método o examen adecuado para identificar péptidos u otras moléculas que se unen selectivamente a una proteína diana puede comprender poner en contacto la proteína diana con un péptido de prueba u otra molécula en condiciones en las que pueda producirse la unión y después determinar si la molécula o péptido de ensayo se ha unido a la proteína o péptido diana. Son bien conocidos en el estado de la técnica métodos de detección de la unión entre dos porciones. Preferiblemente, la porción de unión puede ser una molécula polipeptídica (tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo) o un aptámero de ácido nucleico, entre otros. Las moléculas de unión usadas más frecuentemente son anticuerpos.

Por "anticuerpo" se entiende un anticuerpo completo, incluyendo sin limitación un anticuerpo quimérico, recombinante, transgénico, humanizado, injertado y de cadena sencilla y similares, o cualquier proteína de fusión, conjugados, fragmentos o derivados del mismo que contengan uno o más dominios que se unan selectivamente a la proteína o péptido diana. Por lo tanto, el término anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina completa, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano o un fragmento inmunológicamente eficaz de cualquiera de estos. Un fragmento de anticuerpo significa un fragmento Fv, un Fv ligado a disulfuro, scFv, Fab, Fab' o F(ab')₂, que son bien conocidos en la técnica, o cualquier parte del anticuerpo con un tamaño y una conformación adecuadas para unirse a la proteína o péptido diana. Existen diversas ventajas para el uso de fragmentos de anticuerpo en lugar de anticuerpos completos.

Los anticuerpos monoclonales (MAb) son anticuerpos monoespecíficos. Dada (casi) cualquier sustancia, es posible generar anticuerpos monoclonales que se unan específicamente a esa sustancia. Pueden producirse Mab por técnicas que son bien conocidas en el estado de la técnica.

Se emplean frecuentemente anticuerpos para la determinación de la expresión de una proteína particular en el interior de una célula mediante técnicas inmunohistoquímicas o inmunofluorescentes. Preferiblemente, la técnica a usar en la presente invención es la inmunohistoquímica (IHC). La IHC es una técnica bien conocida que se usa ampliamente para entender la distribución y la localización de biomarcadores y proteínas expresadas de forma diferencial en diferentes partes de un tejido biológico.

Ejemplos

Materiales y métodos

Células y tejidos humanos de metástasis cerebral

Los cultivos celulares MDA-MB 435 (435-P) y las células 435-Br1 son modelos humanos bien caracterizados (proporcionados por Ángels Fabra de IDIBELL), establecidos a partir de metástasis cerebral en ratones desnudos con capacidad para metastatizar en el cerebro (Schackert G. *et al.*, "Unique patterns of brain metástasis produced by different human carcinomas in athymic nude mice", *Int. J. Cancer*, 1989, vol. 44, pp. 892-897; Zhang R. D. *et al.*, "Relative malignant potential of human breast carcinoma cell lines established from pleural effusions and a brain metástasis", *Invasion Metastasis*, 1991, vol. 11, págs. 204-215). Estos cultivos celulares se mantuvieron en una mezcla 1:1 (v/v) de medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio F12 de Ham complementado con suero fetal bovino al 10%, piruvato 1 mmol/l y L-glutamina 2 mmol/l en CO₂ al 5%-aire al 95%, a 37°C en un incubador humidificado.

Para estudios funcionales también se usaron otras variantes metastásicas procedentes de cultivos primarios de metástasis de hígado (435-Liver) y pulmón (435-Lung) (Martin B. *et al.*, "Functional Clustering of Metastasis Proteins Describes Plastic Adaptation Resources of Breast-Cancer Cells to New Microenvironments", *J. Proteome Res.*, 2008, vol. 7, págs. 3242-3253). En algunos experimentos se usaron células metastásicas de hueso de MDA-MB 231, células BO2 proporcionadas por P. Clézardin (INSERM U.664, Faculté de Médecine Laennec, Lyon, Francia).

Para confirmar la expresión de proteína se usaron seis metástasis cerebrales, emparejadas con los correspondientes carcinomas ductales de mama, de pacientes tratados quirúrgicamente en el Hospital Universitario de Bellvitge, HUB.

5 También se usaron carcinomas ductales de mama primarios en el diagnóstico inicial para evaluar el valor predictivo de cada proteína. El Comité para el Cáncer de Mama del Instituto Catalán de Oncología (I.C.O.) y el HUB suministraron muestras de pacientes diagnosticados entre 1988 y 2006. La serie incluía 71 tumores consecutivos en el diagnóstico inicial de pacientes metastásicos en tratamiento en el momento del estudio, con uno o varios órganos afectados, y 51 pacientes con ganglios linfáticos positivos en la cirugía sin evolución metastásica después de
10 un seguimiento mínimo de cinco años. Para optimizar cada análisis inmunohistoquímico, también se usaron tejidos control de cáncer de mama (GRP94, TRAF2), testículo (inhibina), riñón y corazón (FN14) (Véase la Tabla 1 de más abajo).

Identificación de candidatos de cáncer

15 El procedimiento para identificar nuevos candidatos de cáncer ha sido descrito por Aragües y colaboradores (Aragües R. *et al.*, “Predicting cancer involvement of genes from heterogeneous data”, *BMC Bioinformatics*, 2008, vol. 9, pág. 172). En una primera etapa, se construyó una red de interacciones proteína-proteína (“PPIN”) a partir de un conjunto de proteínas diana que se sabe que están implicadas en el cáncer (es decir, proteínas semilla). Después, se mapearon los niveles de expresión génica sobre las proteínas de la red. Se considera que una proteína se expresa de forma diferencial si el gen que la codifica se encontraba expresado de forma diferencial en el experimento de micromatrices. Por último, se produjo una lista de genes de cáncer candidatos.

20 Para clasificar las proteínas por su función se usó el programa informático FatiGo; una herramienta web para detectar asociaciones significativas entre términos de ontología de genes y grupos de genes (Al-Shahrour F. *et al.*, “FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes”, *Bioinformatics*, 2004, vol. 20, págs. 578-580).

Análisis proteómico experimental y análisis de la red de interacciones de proteínas

30 Se usó antes del análisis proteómico que comparaba la expresión diferencial de proteínas entre células 435-P y 435-Br1 para generar y analizar una red de interacciones proteína-proteína (Martin B. *et al.*, “Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells”, *J. Proteome Res.*, vol. 7, págs. 908-920). En resumen, se identificaron las proteínas que se expresaban de forma diferencial mediante electroforesis bidimensional en gel (Ettan TM DIGE, Amersham Biosciences AB) en células 435-Br1 mediante espectros de masas de huella peptídica registrados mediante un Voyager STR MALDI-TOF (Applied Biosystems) en modo reflector positivo con extracción retardada. Los espectros se analizaron usando el programa m/z (Proteometrics, Nueva York, NY). Las proteínas se identificaron frente una base de datos no redundante (NCBI) usando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

40 La red de proteínas se basaba en 17 proteínas conocidas. Se usó PIAÑA (Aragües R. *et al.*, “PIAÑA: protein interactions and network analysis”, *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, págs. 1015-1017) para combinar los datos de DIP 2006.01.16, (Salwinski L. *et al.*, “The Database of Interacting Proteins: 2004 update”, *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, págs. D449-451), MIPS 2006.01 (Pagel P. *et al.*, “The MIPS mammalian protein-protein interaction database”, *Bioinformatics*, 2005, vol. 21, págs. 832-834), HPRD 2005.09.13 (Peri S. *et al.*, “Human protein reference database as a discovery resource for proteomics”, *Nucleic Acids Res.*, 2004, vol. 32, págs. D497-501), BIND 2006.01 (Alfarano C. *et al.*, “The Biomolecular Interaction Network Database and related tools 2005 update”, *Nucleic Acids Res.*, 2005, vol. 33, págs. D418-424) y las interacciones humanas de dos experimentos de alto rendimiento (Rual J. F. *et al.*, “Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network”, *Nature*, 2005, vol. 437, págs. 1173-1178; Stelzl U. *et al.*, “A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome”, *Cell*, 2005, vol. 122, págs. 957-968).

55 La integración de muchas fuentes de interacciones diferentes en un único dispositivo de almacenamiento permitió trabajar con un vasto conjunto de 363.571 interacciones entre 42.040 secuencias de proteínas diferentes. El conjunto inicial de proteínas se denominó “proteínas semilla”. En esta red, una proteína que estaba asociada con más de un semilla se denominó un N-engarcer, siendo N el número de proteínas semilla con las que estaba asociada.

60 Por último, las proteínas que sólo estaban asociadas con una proteína semilla se denominaron “hojas” (Dawelbait G. *et al.*, “Structural templates predict novel protein interactions and targets from pancreas tumour gene expression data”, *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, págs. 1115-124; Cockell S. J. *et al.*, “Structure-based evaluation of in silico predictions of protein-protein interactions using Comparative Docking”, *Bioinformatics*, 2007, vol. 23, págs. 573-581).

Datos transcriptómicos de metástasis cerebral en seres humanos

65 Se usó la lista de genes expresados de forma diferencial para 4 metástasis cerebrales de pacientes con cáncer de mama obtenida del MetaBre Consortium. Se analizaron mediante hibridación de microarray usando el GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, UK Ltd, Reino Unido), que incluye más de 47.000 transcritos y variantes, siguiendo protocolos convencionales para la extracción de ARN y preparación de las sondas. Para procesar

ES 2 363 669 A1

y normalizar los chips de Affymetrix se usaron algoritmos de promedio robusto de multichip (RMA) (Irizarry R. A. *et al.*, "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data", *Biostatistics*, 2003, vol. 4, págs. 249-264). Todos estos cálculos se realizaron con el paquete Bioconductor (Gentleman R. C. *et al.*, "Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics", *Genome Biol.*, 2004, vol. 5, pág. R80). Los perfiles de expresión se analizaron con BRB Array tools, versión 3.3beta3 (Biometric Research Branch, Division of Cancer Treatment and Diagnosis Molecular Statistics and Bioinformatics Section, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Se usaron dos procedimientos diferentes para las comparaciones: (1) la variación en veces para cada gen en metástasis cerebral en comparación con una combinación de carcinomas de mama primarios (Lonnstedt I. *et al.*, "Replicated microarray data", *Statistica Sinica*, 2002, vol. 12, págs. 31-46); (2) y un test t univariante (Landemaine T. *et al.*, "A six-gene signature predicting breast cancer lung metastasis", *Cancer Res.*, vol. 68, págs. 6092-6099) para identificar genes que se expresaban de forma diferencial en metástasis cerebral y en metástasis en órganos distintos del cerebro (5 muestras de metástasis de pulmón, 6 de hígado, 2 de piel y 6 de hueso osteolítico).

También se usó para las comparaciones la lista obtenida en los mismos experimentos de genes expresados de forma diferencial en metástasis diferentes de la metástasis cerebral (genes en pulmón, hígado y hueso) con respecto a una combinación de tumores de cáncer de mama.

Microarrays de tejidos (TMA) e inmunohistoquímica

Se prepararon TMA a partir de tres áreas representativas del tumor que se seleccionaron cuidadosamente a partir de secciones teñidas con hematoxilina-eosina de bloques de 122 donantes. Se troquelaron cilindros de núcleo de un diámetro de 0,6 mm de cada uno de ellos con un punzón de biopsia de piel y se depositaron en bloques de parafina receptores usando un dispositivo de generación de matrices específico (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI), tal y como se describe en Fernandez y colaboradores (Fernandez P. L., *et al.*, "Tissue macroarrays ("microchops") for gene expression analysis", *Virchows Arch.*, 2001, vol. 438, págs. 591-594). Además de tumores, el bloque receptor también contenía 6 muestras normales de mama. Se realizaron secciones de tres μm del bloque de microarray resultante y se usaron para análisis de IHC después de transferirse a portaobjetos de vidrio.

Las condiciones experimentales y las características y fuente de los anticuerpos usados se enumeran en la Tabla 1.

TABLA 1

VALIDACIÓN IHC	Anticuerpo	Clon y compañía	Protocolos	Expresión celular	Tejido de control
PROTEÓMICA DE CEREBRO	GRP 94	sc-1794 (C-19) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)	1/2000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Retículo endoplásmico	Carcinoma de mama
	TRAF2	SM7106P (clon 33A1293; 205-222 aa) (Acris, Acris Antibodies GmbH, Alemania)	1/100 una noche (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Carcinoma de mama
	FN14	sc-27143 (C-13) (Santa Cruz Biotechnology)	1/3000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Membrana	Riñón/corazón
IDENTIFICACIÓN MetaBre CEREBRO	INHA	MCA951ST (R1) (abD serotec; una División de Morphosys, Alemania)	1/50 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Testículo
	TOP1	ab3825 (401-600 aa) (Abcam; Abcam plc, Reino Unido)	1/100 (recuperado en TRIS/EDTA)	Núcleos/citoplasma	Tumor colorrectal
	VAV2	sc-20803 (H-200) (Santa Cruz Biotechnology)	1/1000 (recuperado en tampón citrato de	Citoplasma	Páncreas

VALIDACIÓN IHC	Anticuerpo	Clon y compañía	Protocolos	Expresión celular	Tejido de control
			sodio)		
OTRAS VALIDACIONES	GFAP	Z0334 (Dakocytomation, Dako Diagnostics S.A, Dinamarca)	1/8000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Cerebro (astrocitos)
	TEM 8	ab21270 (Abcam)	1/2000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma/membrana	Endotelio de tumor cerebral
	ARFGAP	SP1402P (Acris)	1/1000 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Testículo
	EIF3s8	ab19359 (1-50 aa N-terminales) (Abcam)	1/1000 una noche (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Riñón
	BAT 8	G-6919 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)	1/250 (recuperado en tampón citrato de sodio)	Citoplasma	Ganglio linfático

Se usaron tejidos de control positivos para cada proteína como una referencia para la intensidad de tinción de TMA.

Los antígenos se desmascaron por calentamiento en una olla de presión durante 20 minutos en el tampón apropiado (como se indicaba en la Tabla 1 anterior). Se diluyeron anticuerpos primarios en tampón diluyente de anticuerpos Dako Real™ (Dakocytomation): tampón Tris, pH 7,2, NaN₃ 15 mM. Se usó LSAB+System-HRP (Dakocytomation) incluyendo las inmunoglobulinas biotiniladas anti-conejo, anti-ratón y anti-cabra en PBS; estreptavidina conjugada con HRP en PBS; y 3,3'-diaminobencidina líquida en solución de cromógeno. Se usó el anticuerpo policlonal anti-HERB-2, A0485 (DAKO) con el kit de detección Ultraview en un sistema de tinción automático (Benchmark XT, Estados Unidos).

Las inmunorreactividades se clasificaron estimando el porcentaje de células tumorales que mostraron una tinción característica (desde "indetectable" o del 0%, hasta tinción homogénea o del 100%) y estimando la intensidad de tinción (1, tinción débil o negativa; 2, tinción moderada; ó 3, tinción fuerte). Los valores límite eran los mismos para todos los marcadores ensayados: se consideró la tinción fuerte como positiva cuando más del 50% de las células expresaban (Fig. 2) (Ginestier C. *et al.*, "Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA microarrays in the study of breast tumor markers", *Am. J. Pathol.*, vol. 161, págs. 1223-1233; Jacquemier J. *et al.*, "Protein expression profiling identifies subclasses of breast cancer and predicts prognosis", *Cancer Res.*, 2005, vol. 65, págs. 767-779). Se comprobó la reproducibilidad del método usando múltiples intérpretes y la fiabilidad por comparación con inmunohistoquímica convencional en secciones completas. Los portaobjetos fueron evaluados al microscopio óptico por dos investigadores.

Análisis de transferencia de Western (WB)

Se lisaron células de cultivos en fase exponencial en 200 μ l de tampón RIPA. Las proteínas separadas en un gel de poliacrilamida al 7% ó 12% se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-p, Millipore Corporation, Bedford, MA). Se usaron los siguientes anticuerpos: GRP94, clon C-19 (Santa Cruz) a 1/1000; GRP78, clon N-20 (Santa Cruz) a 1/500; HSP70, clon C92F3A-5 a 1/1000 (Stressgen, Ann Arbor, MI); GRP58, producto E1031 a 1/200 (Sigma), HSP60, clon LK1 (Abcam) a 1/200; TRAF2, clon 33A1293 a 1/100 (Acris Antibodies, GmbH, Alemania); ATF6, clon 70B14B.1 a 1/200 (Acris). También se usaron anticuerpo monoclonal anti-actina humana 1/2000 (Sigma) y anti-tubulina α humana, clon B-5-1-2 (Sigma) a 1/10.000 como patrones internos para el análisis densitométrico, para los que se evaluó una banda usando el programa Quantity One; la intensidad de una banda se calcula como la suma de las intensidades de todos los píxeles dentro de los límites de la banda multiplicada por el área de cada píxel.

ES 2 363 669 A1

Se usó anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa 1/2000 (Amersham), o anticuerpo secundario anti-ratón 1/2000 (Pierce, Perbio Science Ltd., Cheshire, Reino Unido) o anticuerpo secundario anti-cabra 1/3000 (Santa Cruz) según fuera apropiado en cada caso.

5 Se visualizaron las bandas inmunorreactivas con un sistema de formación de imágenes VersaDoc™ (Bio-Rad) usando el Super Signal west-Pico (Pierce). Se establecieron los PM con patrón preteñido con See Blue Plus2 (Invitrogen, San Diego, CA).

Análisis estadístico

10 Para realizar el análisis estadístico se siguieron las sugerencias de STARTD (<http://www.stard-statement.org/>). Se usó un análisis de varianza de dos vías para comparar los niveles medios de expresión. Los marcadores de inmunohistoquímica se clasificaron en una escala de tres categorías (negativo, positivo débil y positivo fuerte). La predictibilidad de metástasis cerebral para cada marcador se ensayó usando una prueba exacta de Fisher de dos lados y se resumió por
15 cálculo de la sensibilidad entre tumores que desarrollaron metástasis y la especificidad entre tumores sin metástasis para valores positivos fuertes. También se calcularon las relaciones de probabilidad positiva y negativa como índices predictivos integrados, así como el área bajo la curva de ROC. Se evaluaron los marcadores usando un modelo de regresión logística multivariante en un procedimiento por etapas hacia delante para identificar la mejor combinación para predecir la metástasis cerebral. Puesto que HERB-2 ya era un factor de riesgo de metástasis conocido, también se
20 realizó un análisis que incluía HERB-2 como la medida basal, así como un análisis estratificado de cada marcador candidato dentro de tumores positivos y negativos para HERB-2. En todos los análisis, las asociaciones se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

25 a) *Red de interacciones proteína-proteína (PPIN) experimental validada con transcriptómica de metástasis cerebral*

Los inventores usaron un enfoque integrado para construir, ensayar y perfeccionar un modelo de rutas celulares implicadas en la evolución a metástasis cerebral usando una PPIN. Se usó una PPIN de metástasis cerebral obtenida
30 previamente (consúltese Martin B. *et al.*, “Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells”, *J. Proteome Res.*, 2008, vol. 7, págs. 908-920) que incluía 628 proteínas de 13 semillas conocidas identificadas mediante MALDI-TOF. 8 proteínas estaban subexpresadas en células metastásicas cerebrales con respecto a las células parentales (glioxalasa 1, queratina 1, proteína de choque térmico 27 (HSP27) y 70 (HSP70), galectina
35 1, isoforma 3 de corte y empalme de RAD 50, proteína ribosomal 40s s12 y catepsina D) y 5 estaban sobreexpresadas (receptor de laminina de 34/67 kDa (34/67-LMR), queratina 10, vimentina, cadena β de ATP sintasa y tubulina β 5).

La PPIN se comparó con 5.235 genes de metástasis cerebral expresados de forma diferencial con respecto a una
40 combinación de carcinomas de mama primarios de transcriptómica (variación en veces, ≥ 2 , o ≤ -2). Usando este método (consúltese Lonnstedt I. *et al.*, “Replicated microarray data”, *Statistica Sinica*, 2002, vol. 12, págs. 31-46), se encontraron en la red 556 parejas de proteína-gen que se correspondían con 183 genes diferentes, 48 subexpresados y 135 sobreexpresados (no se muestran los datos) (29,14% proteínas por ordenador).

Para clasificar de forma funcional esta identificación de proteínas cerebrales se usó el programa informático FatiGO que a través de ID Ensembl busca términos GO para llegar a una función preponderante de proteínas estadísticamente
45 significativas en grupos de coexpresión. Se clasificaron 112 códigos de términos GO: 34 metabolismo de ácidos nucleicos (36,17%), 29 proteínas de traducción (30,85%), 18 proteínas involucradas en las modificaciones y plegamientos de otras proteínas (19,15%), 9 de muerte celular (9,58%) y una miscelánea de proteínas de señalización y transporte metabólico (no se muestran los datos).
50

b) Identificación funcional específica de metástasis cerebral

La identificación de genes específicos para la metástasis cerebral (BMOS) se catalogó con un agrupamiento jerárquico que distingue claramente entre las diferentes metástasis (cfr. Landemaine T. *et al.*, “A six-gene signature predicting breast cancer lung metástasis”, *Cancer Res.*, 2008, vol. 68, págs. 6092-6099). La BMOS contenía 1.193 genes (MetaBre) después de que las comparaciones de clase de uno contra todos (ONA) identificaran genes expresados de forma diferencial en las 4 metástasis cerebrales a diferencia de en las otras 19: 6 de hueso, 5 de pulmón, 2 de piel y 6 de hígado.
55

Integrando los análisis genómicos y proteómicos que se han descrito anteriormente, los inventores relacionaron la BMOS con la red de proteínas obtenida en la sección anterior y obtuvieron 38 proteínas específicas de órgano cerebral: 7 subexpresadas y 31 sobreexpresadas. Estas incluían 13 proteínas del metabolismo de ácidos nucleicos (48,15%), 10 proteínas de traducción (37,04%), 7 proteínas de muerte celular (25,93%), 6 proteínas que modifican y plegan otras proteínas (22,22%) así como miscelánea de proteínas implicadas en metabolismo, de señalización y transporte, algunas de ellas con varias funciones. Estas proteínas clasificadas adicionalmente con el programa informático FatiGO se validaron como una identidad funcional específica de órgano con un ligero aumento en genes de muerte celular.
60

Además, eran predominantes cinco funciones de la PPIN: unión y reparación de ADN; plegamiento de proteínas y chaperonas, que emplea una proteína más de unión a ADN (O14776); estructural de citoesqueleto, que emplea cuatro nuevas proteínas de unión a ADN (Q9POW2, P33991, Q53X93, Q9UJN0), dos nuevos factores de transducción de señales (P50453, P16220), una proteína de ubiquitinización (Q96BH1), una proteína del metabolismo de aminoácidos (Q8N6T7) y una proteína implicada en la metilación (Q96KQ7); biosíntesis de proteínas, que emplea cuatro nuevos factores de transducción de señales (P29692, Q96I38, Q8IWK1, P05111); y una proteína de transporte de vesículas (Q8N6T3).

Los inventores de la presente solicitud buscaron referencias a identificaciones de metástasis cerebral en datos genómicos publicados de cáncer de mama clínico y experimental y análisis de metástasis, pero no encontraron ninguna. De la lista de genes, sólo siete aparecían en listas anteriores de generación de perfiles de expresión génica que predecían desenlaces médicos de cáncer de mama: EEF1D, MCM4, RPL5, RPS12 y CLN3, a partir de la generación de perfiles de expresión génica que predicen el desenlace clínico (consúltese van 't Veer *et al.*, "Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer", *Nature*, 2002, vol. 415, págs. 530-536) y FAM3A y TBCD a partir de las identificaciones de expresión génica en la predicción del desenlace del cáncer de mama (consúltese Nevins J. R. *et al.*, "Towards integrated clinico-genomic models for personalized medicine: combining gene expression signatures and clinical factors in breast cancer outcomes prediction", *Hum. Mol. Genet.*, 2003, vol. 12 Espec. Nº 2: R153-157). La GFAP, una proteína ubicua en el SNC, también aparecía en una lista de genes que se expresaban de forma diferencial entre metástasis del cáncer de mama en cerebro y hueso (consúltese Klein A. *et al.*, "Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes", 2008, *Cancer Lett.*, (Electronic)).

Se llevaron a cabo experimentos inmunohistoquímicos adicionales en las seis muestras de metástasis cerebral tumoral de cáncer de mama emparejadas de pacientes para corroborar la expresión diferencial de algunas proteínas representativas de las funciones implicadas. Se validó la expresión de GRP94, el plegamiento de proteínas y chaperonas, en todas las parejas (6/6) con una intensidad de tinción citoplasmática similar; FN14, de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral engranaba con el plegamiento de proteínas y nudo de chaperonas, que tenía una tinción de membrana particular y citoplasmática aumentada en la metástasis cerebral (6/6); y TRAF2, una proteína adaptadora y transductora de señales que relaciona miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral con diferentes rutas de señalización que presentaban una clara tinción citoplasmática.

Para validar el carácter específico de órgano de esta identificación, los inventores volvieron a los datos transcriptómicos para comprobar la expresión en metástasis distintas del cerebro (hígado, pulmón y hueso) de genes que se sabe que están implicados en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (ERS). Así, se buscaron grupos funcionales diferentes de genes: chaperonas del retículo endoplásmico, sensores de estrés clásico, respuesta de plegamiento/no plegamiento de proteínas, rutas de señalización clásicas, resistencia a estrés oxidativo, proteosoma, transportadores de glucosa, grupos del metabolismo de aminoácidos, transportadores de proteínas y receptores y transductores de señales. De estos, los sobreexpresados de una forma más diferencial eran la proteína GRP94, 10 veces, en metástasis cerebral pero también en pulmón, 6,5 veces y hueso, 3,3 veces; HSP90, 22 veces, en cerebro seguido de hueso, 7,5 veces; calreticulina, 8 veces, que muestra un ligero aumento en hueso y pulmón. Más específicamente, en cerebro la subunidad del proteosoma 26S se sobreexpresaba 12 veces, el receptor de proteína tirosina quinasa HERB-2 32 veces y el receptor del factor de crecimiento epidérmico 9,5 veces. Por el contrario, otras funciones no tenían una expresión importante en cerebro, por ejemplo, el metabolismo de glucosa se sobreexpresaba solamente en hígado, o el metabolismo de aminoácidos. Por lo tanto, de acuerdo con la expresión de estos genes en las cuatro metástasis diferentes, los inventores formularon la hipótesis de que la metástasis cerebral tenía un fenotipo funcional particular diferente de otras metástasis que se desarrollan en pulmón, hígado o hueso.

De las proteínas validadas, las implicadas en el plegamiento de proteínas y chaperonas pueden relacionar diferentes funciones y presumiblemente actúan rescatando células de respuestas de RES. De hecho, el mecanismo integrado implica las respuestas de proteínas no plegadas (UPR) para establecer un eje de comunicación entre el retículo endoplásmico (RE) y el núcleo, la maquinaria de degradación asociada al RE, la maquinaria exportación del RE y una interfaz con mitocondrias implicada en la activación de mecanismos proapoptóticos. GRP94, la glicoproteína más abundante en el RE, está implicada en la maduración conformacional de proteínas destinadas a presentación en la superficie celular o exportación. GRP94, como BiP, podría participar en la activación de PERK, ATF6 e IRE1 por ERSRP. Por lo tanto, la sobreexpresión de GRP94 en metástasis cerebral podría ser un eje que organiza el fenotipo ERSRP.

La apoptosis puede inducirse mediante IRE1 y TRAF2 por liberación de calcio de los depósitos del RE. Además, la sobreexpresión de FN14 a través de la señalización de TRAF2, como receptores de TNF α , podría ser un mediador potencial de la supervivencia celular puesto que la activación induce la translocación desde el citoplasma hasta el núcleo, regulando positivamente proteínas antiapoptóticas. Por lo tanto, la capacidad de células metastásicas cerebrales de manejar el estrés puede condicionar su capacidad intrínseca para sobrevivir y contribuir a la evolución a metástasis cerebral y a la resistencia a terapia. Puesto que GRP94 también era una molécula de metástasis cerebral específica de órgano en muestras de pacientes, los inventores de la presente solicitud formularon la hipótesis de que GRP94 podía organizar las respuestas al estrés del retículo endoplásmico (ERSR), induciendo rutas compensatorias para inhibir la muerte celular.

c) *Expresión de ERSRP en tumores primarios de cáncer de mama predice la evolución a metástasis cerebral*

Para estimar la probabilidad de desenlaces específicos de metástasis cerebral se analizó el ERSRP generado en una serie de tumores de cáncer de mama primarios para determinar su valor como una supuesta herramienta para la predicción temprana en el diagnóstico inicial.

Se seleccionó la tecnología de array de tejidos (TMA) porque permite el análisis simultáneo de muchas muestras de tumores archivadas organizadas en matrices sobre portaobjetos de vidrio mediante análisis inmunohistoquímico tradicional sobre tejidos embebidos en parafina con un seguimiento prolongado. La TMA permitió comprobar la expresión de GRP94, TRAF2 y FN14 seleccionados del análisis proteómico en tumores de mama primarios. También se comprobó VAV2, TOP1 e Inhibina, que obtuvieron buenas puntuaciones como específicos de órgano cerebral en los datos transcriptómicos previos y se validaron adicionalmente mediante IHC a nivel de expresión de proteínas. Los resultados se resumen en la Tabla 2:

TABLA 2

MARCADORES DE METÁSTASIS CEREBRAL

	Sensibilidad	Especificidad	LR		Prueba exacta de Fisher (de 2 lados)
			(+)	(-)	
ErbB2	8/13 (61,5)	90/99 (90,9)	6,70	0,42	< 0,0001
GRP94	12/13 (92,0)	55/107 (51,4)	1,89	0,16	0,003
FN14	9/13 (69,2)	70/104 (77,0)	3,01	0,40	0,001
TRAF2	9/11 (81,8)	45/88 (51,1)	1,67	0,35	0,055
VAV2	2/13 (15,4)	95/107 (88,8)	1,38	0,95	0,65
TOP1	4/13 (30,8)	91/105 (86,6)	2,30	0,80	0,11
Inhibina	0/13 (0)	97/107 (90,7)	0	1,10	0,60

La expresión se optimizó y puntuó previamente para las seis parejas de tumores de cáncer de mama y metástasis cerebral emparejadas (Fig. 1). Como se esperaba, la tinción para todos los anticuerpos fue homogénea con diferentes intensidades entre ellos. Se consideró que un marcador era positivo cuando se detectaba una alta expresión para evitar falsos positivos innecesarios, teniendo en cuenta la expresión conocida en un tejido de control (Fig. 2).

El análisis estadístico de los datos mostró asociaciones significativas entre la evolución a metástasis cerebral y la alta expresión de GRP94 ($p < 0,0001$), TRAF2 ($p < 0,001$), FN14 ($p < 0,0001$), TOP1 ($p=0,032$), y VAV2 ($p=0,005$). La expresión de Inhibina no se asoció con evolución a metástasis cerebral ($p = 0,2$). Como se esperaba, la expresión de HERB-2 se asociaba con metástasis cerebral con una alta significación ($p < 0,0001$); así como con la ausencia de receptores de hormonas, ER: 54,6% frente a 29,6% (6/11 y 29/98, respectivamente, $p = 0,016$) y PR: 72,7% frente al 39,0% (8/11 frente a 37/95, respectivamente, $p = 0,009$). También se observó una ligera asociación con el grado histológico (HG), HG III 46,9% (7/12 frente a 45/96, $p = 0,105$).

Se calcularon las relaciones de probabilidad positiva y negativa para evaluar la exactitud predictiva de cada molécula como un marcador de metástasis cerebral considerando la sensibilidad y la especificidad de cada una. El mayor valor predictivo para la presencia de la enfermedad metastásica fue la expresión de HERB-2 (LR positiva 6,7, $p < 0,0001$), seguido de FN14 (LR positiva 3,01, $p < 0,001$), GRP94 (LR positiva 1,89 $p < 0,003$) y TRAF2 (LR positiva 1,67, $p < 0,055$). Por otro lado, GRP94 fue mejor marcador predictivo negativo (LR negativa 0,16), seguido de TRAF2 (LR negativa 0,35), FN14 (LR negativa 0,40) y HERB-2 (LR negativa 0,42). Por lo tanto, la ausencia de ERSRP en tumores predecía la ausencia de metástasis cerebral.

Un análisis multivariante basado en una regresión logística por etapas determinó que GRP94, FN14 e Inhibina como la mejor combinación para predecir la metástasis cerebral. El área bajo la curva de ROC para esta combinación fue de 0,85 (95% CI 0,75-0,96) mientras que el área bajo la curva de ROC para HERB-2 en solitario fue de 0,76 (95% CI 0,58-0,93). Esta combinación de marcadores supone una mejora significativa sobre la eficacia de predicción de HERB-2 ($p < 0,001$). (Tabla 3, Fig. 3).

ES 2 363 669 A1

También se realizó un análisis estratificado para comprobar la relación entre la positividad de HERB-2 y ERSRP en combinaciones binarias, como se muestra en la Tabla 3:

	HERB-2 +		HERB-2 -	
	Sensibilidad	LR + χ^2	Especificidad	LR - χ^2
Marcadores de metástasis cerebral de la invención				
GRP 94	8/8 (100)	2,78 0,16	48/89 (53,9)	2,31 0,14
FN 14	5/8 (62,5)	1,47 0,23	68/88 (77,3)	6,88 0,004
TRAF 2	6/7 (85,7)	0,54 0,46	36/71 (50,7)	1,06 0,27
Marcadores tradicionales				
ER	3/7 (42,9)	0,54 0,46	21/83 (25,3)	1,06 0,27
PR	2/7 (28,6)	0,43 0,56	29/81 (35,8)	2,43 0,11
HG III	6/8 (75,0)	0,14 0,71	42/45 (93,3)	0,77 0,39

En tumores negativos para HERB-2, FN14 tenía una relación de probabilidad negativa alta para predecir la ausencia de evolución a metástasis cerebral (LR = 0,26, sensibilidad = 0,8, p = 0,015). Además, si el mejor predictor de metástasis cerebral en solitario era HERB-2, la adición de la expresión de GRP94, TRAF2 y FN14 aumentaba significativamente la predicción de enfermedad metastásica en cerebro, Además, la combinación de GRP94, FN14, Inhibina y HERB-2 mostró una predicción de enfermedad metastásica en cerebro de aROC = 0,90.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama, comprendiendo el método: (a) aislar una muestra del tumor de mama; (b) determinar el nivel de expresión de GRP94, FN14 o ambos en la muestra; y (c) comparar dicho nivel con el nivel de expresión de dicho gen o genes en una muestra control, de manera que si se detecta una sobreexpresión de dicho gen o genes en relación con la muestra control, es indicativo del riesgo de desarrollar metástasis cerebral.
- 10 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que se determina el nivel de expresión de GRP94 y FN14.
3. Método de acuerdo con cualquier de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar el nivel de expresión de TRAF-2.
- 15 4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar el nivel de expresión de HERB-2.
5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además determinar el nivel de expresión de Inhibina.
- 20 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina el nivel de expresión de uno de los siguientes conjuntos de marcadores:
- (a) GRP94, FN14, Inhibina;
 - 25 (b) GRP94, TRAF2, HERB-2, y FN14;
 - (c) GRP94, FN14, Inhibina y HERB-2; y
 - 30 (d) GRP94, FN14 y TRAF2.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se determina la cantidad de proteína.
8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la cantidad de proteína se determina usando un anticuerpo que se une específicamente a dicha proteína.
- 35 9. Kit para llevar a cabo el método que se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, comprendiendo el kit medios apropiados para determinar el nivel de expresión de cada uno de los marcadores.
- 40 10. Kit de acuerdo con la reivindicación 9, en el que los medios son anticuerpos que se unen específicamente a cada una de las proteínas a detectar.
11. Uso de GRP94 como un marcador de pronóstico o susceptibilidad a metástasis cerebral.

45

50

55

60

65

FIG. 1

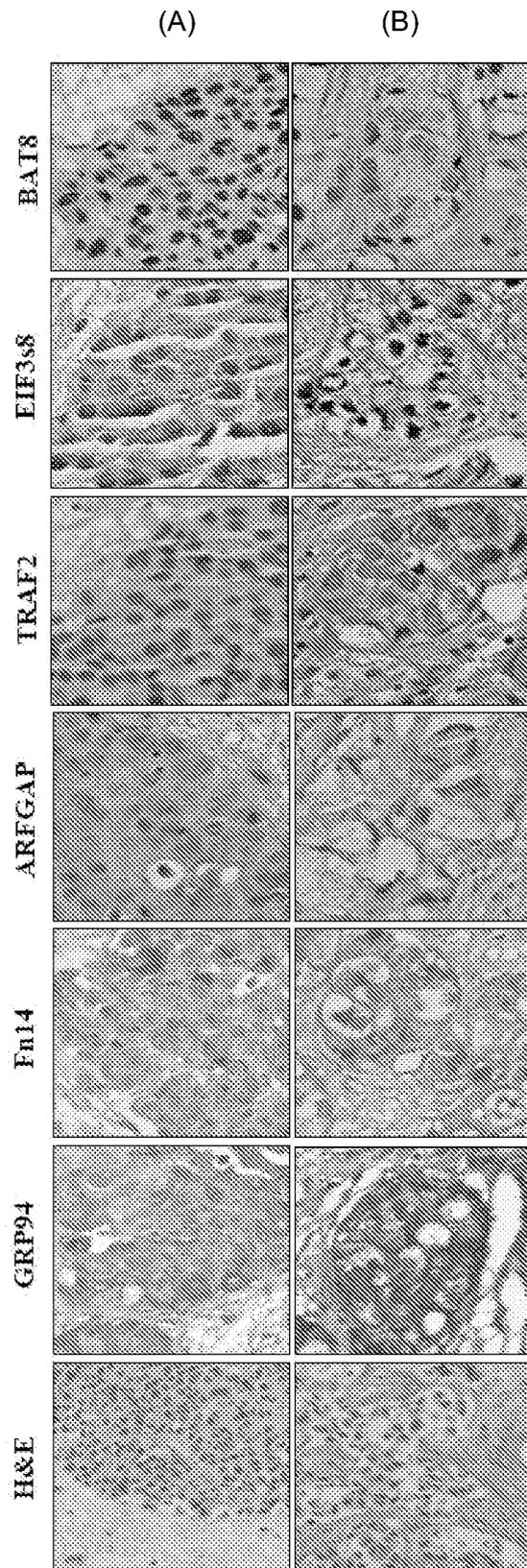


FIG. 2

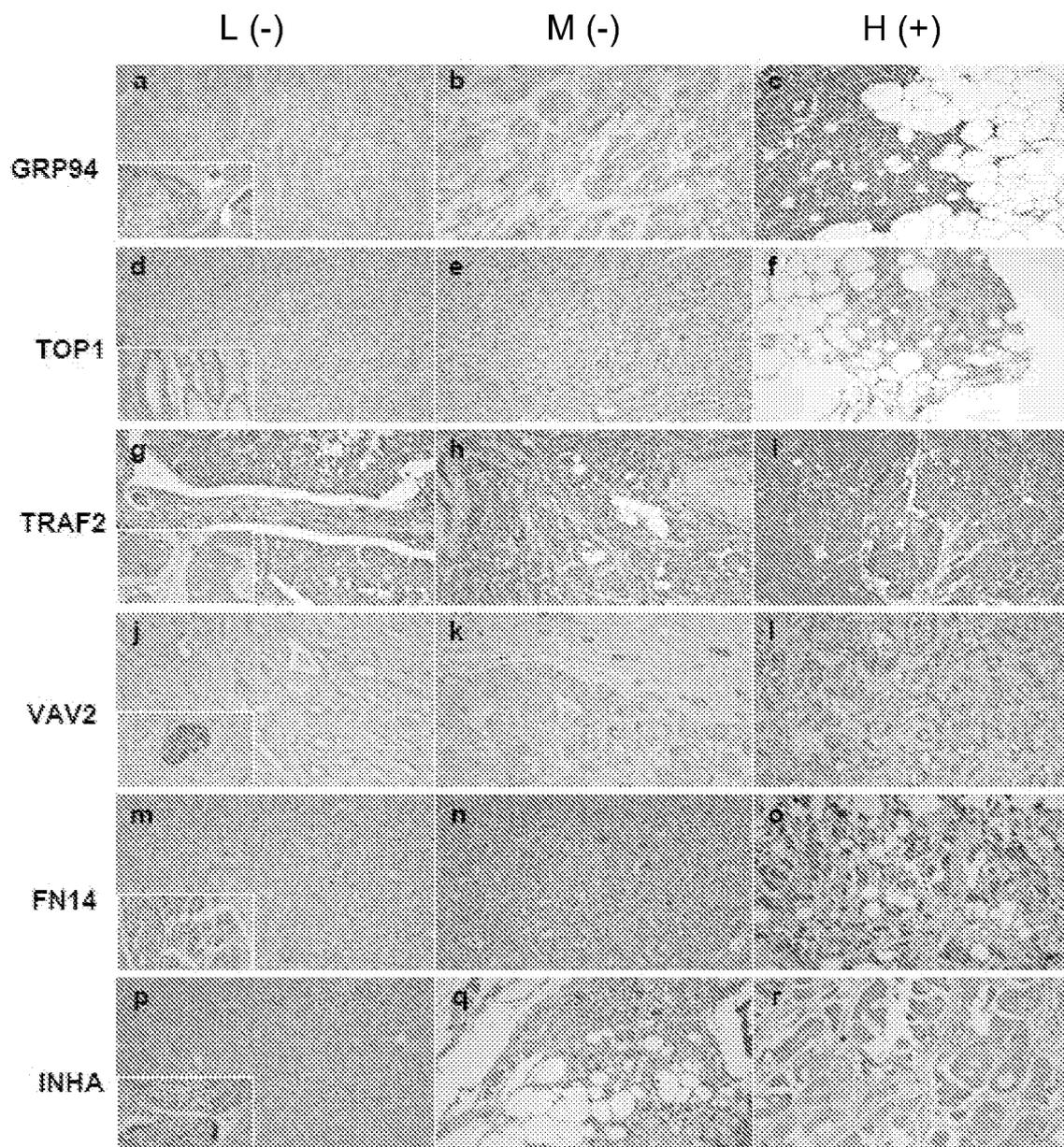
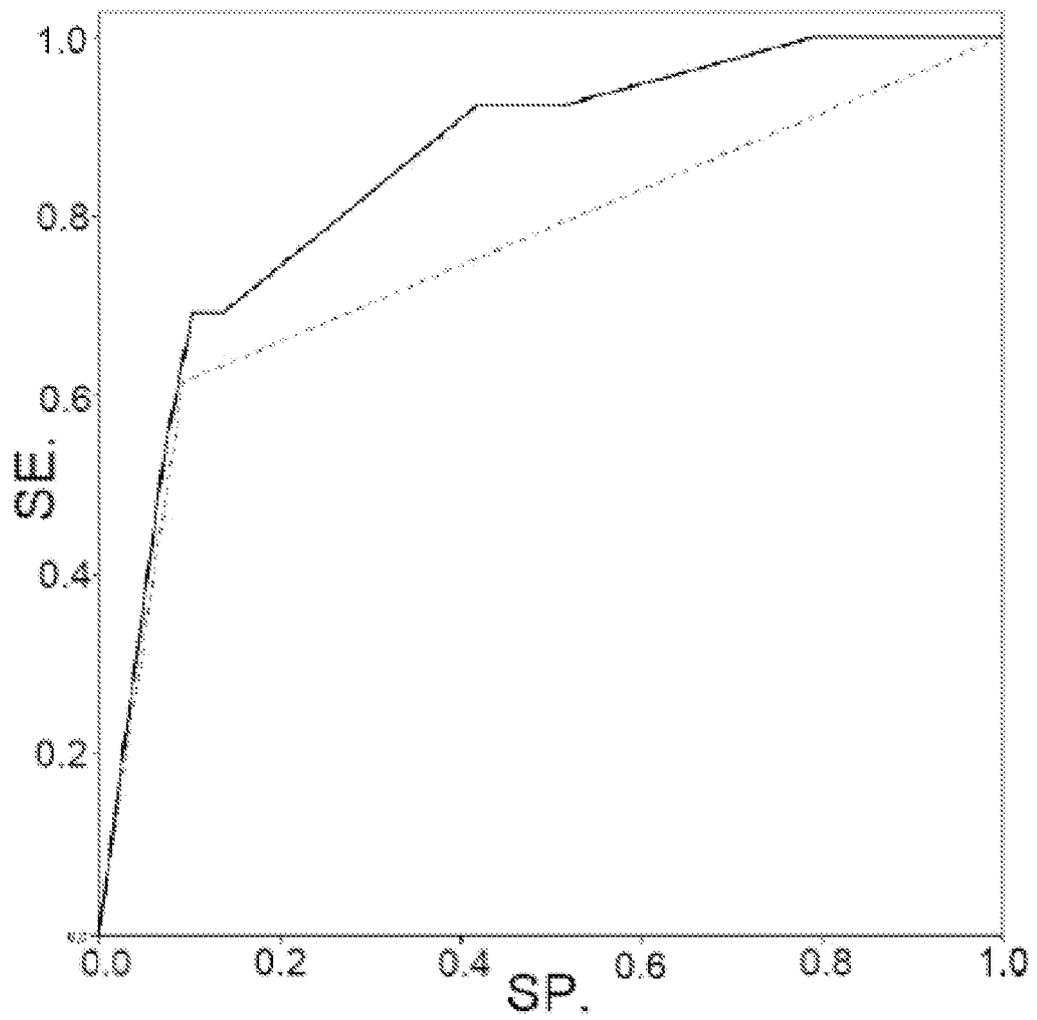


FIG. 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930294

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MARTÍN B., ARAGÜES R., SANZ R., OLIVA B., BOLUDA S., MARTÍNEZ A., SIERRA A. "Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells." Journal of Proteome Research (2008) Vol. 7, pages 908-920. Páginas 908-910, 912-918.	1, 7-11
A	WINKLES J. A., TRAN N. L., BERENS M. E. "TWEAK and Fn14: new molecular targets for cancer therapy?" Cancer Letters (2006) Vol. 235, pages 11-17. Resumen y páginas 14-15.	1-11
A	WINKLES J. A., TRAN N. L., BROWN S., STAINS N., CUNLIFFE H. E., BERENS M. E. "Role of TWEAK and Fn14 in tumor biology." Frontiers in Bioscience (2007) Vol. 12, pages 2761-2771. Páginas 2765-2767.	1-11
A	ESSEGHIR S., KENNEDY A., SEEDHAR P., NERURKAR A., POULSOM R., REIS-FILHO J., ISACKE C. M. "Identification of NTN4, TRA1, and STC2 as prognostic markers in breast cancer in a screen for signal sequence encoding proteins." Clinical Cancer Research (2007) Vol. 13, pages 3164-3173. Páginas 3168, 3170 y 3172.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.07.2011

Examinador
M. García Bueno

Página
1/6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930294

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.06.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHOUTEN L. J., RUTTEN J., HUVENEERS H. A. M., TWIJNSTRA A. "Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma." Cancer (2002) Vol. 94, pages 2698-2705. Todo el documento.	1-11
A	WILLIS A. L., TRAN N. L., CHATIGNY J. M., CHARLTON N., VU H., BROWN S., BLACK M. A., McDONOUGH W. S., FORTIN S. P., NISKA J. R., WINKLES J. A., CUNLIFFE H. E. "The fibroblast growth factor-inducible 14 receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity." Molecular Cancer Research (2008) Vol. 6, pages 725-734. Páginas 725-726, 729 y 731.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.07.2011

Examinador
M. García Bueno

Página
2/6

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, TXTF, MEDLINE, BIOSIS, XPESP, EMBASE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.07.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 2-6, 9-11	SI
	Reivindicaciones 1, 7-8	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2-6	SI
	Reivindicaciones 1, 7-11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	MARTÍN B., ARAGÜES R., SANZ R., OLIVA B., BOLUDA S., MARTÍNEZ A., SIERRA A. "Biological pathways contributing to organ-specific phenotype of brain metastatic cells." Journal of Proteome Research (2008) Vol. 7, pages 908-920. Páginas 908-910, 912-918.	2008
D02	WINKLES J. A., TRAN N. L., BERENS M. E. "TWEAK and Fn14: new molecular targets for cancer therapy?" Cancer Letters (2006) Vol. 235, pages 11-17. Resumen y páginas 14-15.	2006
D03	WINKLES J. A., TRAN N. L., BROWN S., STAINS N., CUNLIFFE H. E., BERENS M. E. "Role of TWEAK and Fn14 in tumor biology." Frontiers in Bioscience (2007) Vol. 12, pages 2761-2771. Páginas 2765-2767.	2007
D04	ESSEGHIR S., KENNEDY A., SEEDHAR P., NERURKAR A., POULSOM R., REIS-FILHO J., ISACKE C. M. "Identification of NTN4, TRA1, and STC2 as prognostic markers in breast cancer in a screen for signal sequence encoding proteins." Clinical Cancer Research (2007) Vol. 13, pages 3164-3173. Páginas 3168, 3170 y 3172.	2007
D05	SCHOUTEN L. J., RUTTEN J., HUVENEERS H. A. M., TWIJNSTRA A. "Incidence of brain metastases in a cohort of patients with carcinoma of the breast, colon, kidney, and lung and melanoma." Cancer (2002) Vol. 94, pages 2698-2705. Todo el documento.	2002
D06	WILLIS A. L., TRAN N. L., CHATIGNY J. M., CHARLTON N., VU H., BROWN S., BLACK M. A., McDONOUGH W. S., FORTIN S. P., NISKA J. R., WINKLES J. A., CUNLIFFE H. E. "The fibroblast growth factor-inducible 14 receptor is highly expressed in HER2-positive breast tumors and regulates breast cancer cell invasive capacity." Molecular Cancer Research (2008) Vol. 6, pages 725-734. Páginas 725-726, 729 y 731.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un método para determinar el riesgo de desarrollar metástasis cerebral en un sujeto diagnosticado con cáncer de mama, que comprende determinar si existe sobreexpresión de GRP94, FN14 o ambos en una muestra de tumor de mama. Dicho método puede comprender además la determinación de los niveles de TRAF-2, HERB-2 o Inhibina (reivindicaciones 1-8).

La presente solicitud de invención también consiste en un kit para llevar a cabo el método reivindicado y el uso de GRP94 como un marcador de pronóstico de metástasis cerebral (reivindicaciones 9-11).

El documento D01 consiste en un estudio para caracterizar los fenotipos funcionales que pueden aumentar la metástasis en el cerebro en sujetos diagnosticados con cáncer de mama.

El documento D02 divulga en un estudio que indica que Fn14 puede ser regulador potencial de tumores humanos, al estar sobre-expresado en ciertos tipos de tumores en humanos (ver resumen y páginas 14-15).

El documento D03 divulga la expresión génica Fn14 está elevada en ciertos tumores de alto grado, por lo que Fn14 podría ser un marcador de diagnóstico o pronóstico para el cáncer de mama, y tumores en el sistema nervioso central (ver páginas 2765-2767).

El documento D04 divulga un estudio donde se ha examinado la expresión de una serie de genes secretados en el cáncer de mama, mostrando que estos genes, entre los que se encuentra GRP94, están sobre-expresados en dicho cáncer, por lo que GRP94 se considera un marcador pronóstico en cáncer de mama (ver páginas 3168, 3170 y 3172).

El documento D05 consiste en un estudio sobre la influencia de los factores relacionados con la metástasis cerebral en una cohorte de pacientes diagnosticados con cáncer de colon, pulmón, mama, melanoma o carcinoma de riñón (ver todo el documento)

El documento D06 consiste en un estudio que muestra que Fn14 está sobre-expresado en tumores de mama (ver páginas 725-726, 729 y 731).

1.-NOVEDAD (Art. 61. Ley 11/1986).

1.1.-Reivindicaciones 1, 7-8.

El documento D01 divulga un método de pronóstico de metástasis cerebral en un sujeto al que se le ha diagnosticado un tumor de mama, que comprende las fases de aislamiento de una muestra del tumor de mama, determinación del nivel de expresión de GRP94, y comparación de dicho nivel con el nivel de expresión de dicho gen en una muestra control. En dicho método se determina la cantidad de proteína usando el anticuerpo que se une específicamente a dicha proteína (ver páginas 908-910, 912-918).

Las características de las reivindicaciones 1, 7-8 ya son conocidas del documento D01. Por lo tanto esas reivindicaciones no son nuevas a la vista del estado de la técnica conocido.

1.2.-Reivindicaciones 2-6, 9-11.

Las reivindicaciones 2-6, 9-11 son nuevas en el sentido del artículo 6.1 Ley 11/1986.

2.-ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

2.1.- Reivindicaciones 1, 7-8.

Las reivindicaciones 1, 7-8, al no ser nuevas no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.

2.2.-Reivindicaciones 2-6.

Ninguno de los documentos D01-D06 citados, o cualquier combinación relevante de ellos revela la determinación del nivel de expresión de GRP94 junto a Fn14, TRAF-2, HERB-2 o inhibina.

En consecuencia, las reivindicaciones 2-6 son nuevas y se considera que implican actividad inventiva en el sentido de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.

2.3-Reivindicaciones 9-11.

A la vista de lo que se conoce en el documento D01 no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar un kit como el descrito en las reivindicaciones 9-10.

Además, la utilización de GRP94 como marcador de pronóstico de metástasis cerebral, reivindicada en la reivindicación 11, se considera obvia para el experto en la materia.

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 9-11 no implica actividad inventiva según el artículo 8.1 Ley 11/1986.