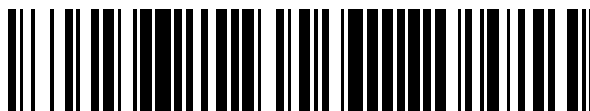


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 547**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03736436 .1**
96 Fecha de presentación: **13.02.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1563302**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.08.2005**

54 Título: **MÉTODOS PARA SELECCIONAR REGÍMENES DE TRATAMIENTO Y PREDECIR RESULTADOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA.**

30 Prioridad:
13.02.2002 US 356928 P
09.08.2002 US 402311 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.02.2012

73 Titular/es:
AMERICAN DIAGNOSTICA, INC.
500 WEST AVENUE P.O.BOX 110215
STAMFORD, CT 06911-0215, US

72 Inventor/es:
HARBECK, Nadia;
KATES, Ronald, E.;
SCHMITT, Manfred y
FOEKENS, John, A.

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 547 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para seleccionar regímenes de tratamiento y predecir resultados en pacientes con cáncer de mama.

1. Campo de la invención

5 La invención se refiere de manera general al campo del pronóstico del cáncer, selección del tratamiento y predicción del resultado. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para seleccionar un protocolo de tratamiento para un sujeto basado en al menos dos factores de pronóstico para cáncer, particularmente cáncer de mama, leucemia y plasmacitoma. Los factores incluyen activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y su inhibidor, inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). La presente invención proporciona métodos que comprenden medir los niveles de uPA y PAI-1 o ARNm que codifican uPA y PAI-1 en el tejido canceroso de un paciente con cáncer y seleccionar un
10 régimen de tratamiento para el cáncer. La selección del régimen de tratamiento se basa en los niveles de uPA/PAI-1 o los niveles de ARNm que codifican uPA y PAI-1. También se proporcionan métodos para predecir el máximo beneficio esperado, es decir, supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia global de los pacientes con o sin un tratamiento particular.

2. Antecedentes de la invención

15 El cáncer se caracteriza principalmente por un incremento en el número de células anormales derivadas de un tejido normal dado, la invasión de los tejidos adyacentes por estas células anormales y la diseminación linfática o a través de la sangre de las células malignas a ganglios linfáticos regionales y a sitios distantes (metástasis). Los datos clínicos y los estudios de biología molecular indican que el cáncer es un proceso con múltiples etapas que empieza con cambios preneoplásicos mínimos, que pueden progresar, bajo determinadas condiciones, a neoplasia.

20 El crecimiento de las células anormales pre-malignas se ejemplifica por hiperplasia, metaplasia o lo más particularmente displasia (para revisión de dichas condiciones anormales de crecimiento, véase Robbins y Angell, 1976, *Basic Pathology*, 2a Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, p. 68-79). La lesión neoplásica puede evolucionar clonalmente y desarrollar una capacidad incrementada de crecimiento, metástasis y heterogeneidad, especialmente bajo condiciones en las que las células neoplásicas se escapan de la vigilancia inmune del huésped (Roitt, I., Brostoff, J. y Kale, D., 1993, *Immunology*, 3a ed., Mosby, St. Louis, p. 17.1-17.12). El sistema activador del plasminógeno juega un papel clave en la invasión y metástasis tumoral (Andreasen, *et al.*, 1997, *Int. Journal Cancer* 72: 1-22; Schmitt, *et al.*, 1997, *Thrombosis Haemostasis* 78: 285-296). Un equilibrio crítico del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA), su receptor de la superficie celular uPA-R (CD 87) y su inhibidor, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) es el prerrequisito para una proteólisis focal, adhesión y migración eficaces y, por lo tanto, la invasión y metástasis posteriores de las
30 células tumorales.

En la práctica clínica, el diagnóstico preciso de varios subtipos de cáncer es importante porque las opciones de tratamiento, pronóstico y la probabilidad de respuesta terapéutica todos dependen en líneas generales del diagnóstico. El pronóstico preciso, o la determinación de supervivencia sin metástasis distantes o supervivencia global, podría permitir al oncólogo y al paciente tomar decisiones en cuanto al tratamiento. Además, la predicción precisa de pronóstico
35 peor impactaría en gran medida en los ensayos clínicos para nuevas terapias de cáncer de mama, porque los pacientes potenciales de estudio podrían estratificarse según el pronóstico. Los estudios podrían limitarse entonces a los pacientes que tienen un pronóstico peor, facilitando a su vez el discernir si una terapia experimental es eficaz.

40 La incidencia del cáncer de mama, una causa principal de muerte en las mujeres, se ha incrementado gradualmente en los Estados Unidos durante los últimos treinta años. Su riesgo acumulativo es relativamente alto, 1 en 8 mujeres, por ejemplo, a la edad de 85 en los Estados Unidos. De hecho, el cáncer de mama es el cáncer más común en las mujeres y la segunda causa más común de muerte por cáncer en los Estados Unidos. En 1997, se estimó que se habían indicado 181.000 nuevos casos de cáncer en los EE.UU y que 44.000 personas morirían de cáncer de mama (Parker *et al.*, 1997, *CA Cancer J. Clin.* 47: 5; Chu *et al.*, 1996, *J. Nat. Cancer Inst.* 88: 1571).

45 El cáncer de mama surge de una malignidad de las células epiteliales en las mujeres, y ocasionalmente en los hombres, habitualmente de origen adenocarcinoma que se inicia en el epitelio ductal de la mama. El Cáncer de Mama es la malignidad no dérmica más común en las mujeres y se anticipan 192.200 casos en los EE.UU para el año que viene. A pesar de avances recientes en el diagnóstico temprano y en el tratamiento, 40.200 mujeres en los EE.UU han sucumbido a esta enfermedad en el año 2000 (Greenlee *et al.*, 2001, *Cancer Statistics* 51(1): 15).

50 Una estrategia basada en marcadores para la identificación y caracterización de los tumores promete un diagnóstico mejorado y un fiabilidad en el pronóstico. Típicamente, el diagnóstico del cáncer de mama y otros tipos de cáncer requiere una prueba histopatológica de la presencia del tumor. Además del diagnóstico, los exámenes histopatológicos también proporcionan información acerca del pronóstico y de la selección de los regímenes de tratamiento. El pronóstico

también puede establecerse tomando como base parámetros clínicos tales como tamaño del tumor, grado del tumor, la edad del paciente y metástasis en ganglios linfáticos.

5 Con los regímenes de fármacos convencionales disponibles y potentes así como la aparición de nuevas estrategias de terapia que están dirigidas a rutas biológicas específicas, la determinación del tratamiento óptimo para cáncer de mama
 10
 15
 20
 25
 30

Actualmente, aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer de mama primario no tienen una implicación de los ganglios linfáticos auxiliares y este porcentaje está incrementándose (Hellman et al., 2000, Diseases of the breast, 2a ed., Philadelphia; p. 407-23; Clark et al., 1988, Semin Oncol 15(2 Supl 1): 20-5). No es posible identificar de manera fiable a los pacientes de bajo riesgo (que pueden disponer de quimioterapia adyuvante) por características histomorfológicas y clínicas tradicionales, tales como tamaño del tumor, grado histológico, edad, estado del receptor de las hormonas esteroides o estado menopáusico. McGuire et al., 1992, N Engl J Med 326: 1756-61. Si estas características se usaran para seleccionar terapias para los pacientes, como se recomienda en las declaraciones de consenso de St. Gallen de 1998 y 2001 (Zujewski et al., 1998, J Natl Cancer Inst 90:1587-9; 7th International Consensus Conference on Adjuvant Therapy of Primary Breast Cancer, St. Gallen, Suiza, Febrero 2001), hasta el 90% de los pacientes con cáncer de mama ganglio linfático negativo serían candidatos para quimioterapia adyuvante, aunque sólo aproximadamente el 30% de los pacientes con cáncer de mama ganglio linfático negativo recaerían y necesitarían así quimioterapia adyuvante. Esta discrepancia ha impulsado una búsqueda para factores de pronóstico adicionales. Se han usado puntos de corte de 3 ng uPA/mg de proteína y 14 ng PAI-1/mg de proteína para distinguir entre niveles de antígeno altos y bajos en tejido de cáncer de mama. Usando uPA y PAI-1 fue posible dicotomizar a los pacientes con cáncer de mama en subpoblaciones de alto y bajo riesgo para tomar decisiones sobre qué régimen de terapia aplicar (Harbeck et al., Breast Cancer Res & Treatment vol. 54, 1999, p. 147-247 y Jänicke et al., J. Natl. Cancer Inst. vol. 93, no. 12, 2001, p. 913-920): Look et al., J. Natl. Cancer Inst., vol. 94, no. 2, Enero 2002, p. 116-128, presentan un análisis agrupado retrospectivo de uPA y PAI-1 como factor de pronóstico en pacientes con cáncer de mama.

35 Sería, por lo tanto, beneficioso proporcionar métodos específicos para seleccionar un régimen de tratamiento en un sujeto con cáncer, en particular, cáncer de mama, leucemia y plasmacitoma. El propósito de la presente invención es proporcionar un método para predecir una respuesta a un régimen de tratamiento para un sujeto basado en los niveles de uPA y PAI-1 o los ARNm que codifican uPA y PAI-1. Este método identifica a sujetos que pertenecen a un grupo de riesgo alto y un grupo de riesgo bajo para recurrencia de cáncer en particular cáncer de mama, leucemia y plasmacitoma y para predecir la supervivencia sin enfermedad y global bajo determinados regímenes de tratamiento. Así, el régimen de tratamiento apropiado puede implementarse para cada grupo. La presente invención también proporciona un método para predecir una respuesta a un régimen de tratamiento para un sujeto basado en los niveles de uPA y PAI-1 o los ARNm que codifican uPA y PAI-1. En el caso de los tumores sólidos o cáncer de mama, el método se basa además en el número de ganglios linfáticos que están afectados.

3. RESUMEN DE LA INVENCION

45 La presente invención se basa en la observación de los presentes inventores de que cuando el nivel de los factores de pronóstico, activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y su inhibidor, inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1) se ensayan en los tumores de pacientes con cáncer de mama, un nivel alto (es decir, por encima de un "valor de corte" especificado) de uno de los dos o de los dos factores indica que los pacientes son pacientes con cáncer de mama de alto riesgo, es decir, tienen un riesgo incrementado, en particular, para una recaída temprana. Estos pacientes se benefician significativamente de terapia agresiva, tal como quimioterapia sistémica adyuvante, después de la cirugía inicial para eliminar el tejido tumoral. Aquellos pacientes que tienen niveles bajos (es decir por debajo de un "valor de corte" específico) tanto de uPA como de PAI-1 podrían clasificarse como de "bajo riesgo", es decir, que tienen un riesgo bajo de recaída y no se beneficiaban significativamente de terapia agresiva a la vista del beneficio de supervivencia baja de estos tratamientos en pacientes de "bajo riesgo" comparado con los posibles efectos adversos para la salud del tratamiento agresivo, es decir, "beneficio total para el paciente de la terapia". Por el contrario, entre los pacientes que, según otros criterios o métodos de clasificación, podrían haberse clasificado como de "bajo riesgo", niveles altos de uno de los dos o de ambos de dichos factores puede indicar un beneficio esperado significativo, es decir, reducción del riesgo de recaída, de la terapia agresiva suficiente para sobrepasar los efectos adversos en la salud de los tratamientos en cuestión.

- La presente invención se refiere a un método para seleccionar entre dos o más regímenes de tratamiento, un régimen de tratamiento que tenga el mayor beneficio esperado para un paciente con cáncer de mama primario o, un método para predecir un beneficio esperado en una población comprable de pacientes con cáncer de mama seleccionado entre dos o más regímenes de tratamiento, un régimen de tratamiento que tenga el mayor beneficio esperado, tendiendo dicho paciente tejido tumoral primario, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o el ARNm que codifica uPA y el ARNm que codifica PAI-1 en una muestra de dicho tejido de tumor primario de dicho paciente;
- (b) clasificar a dicho paciente como de bajo riesgo si el nivel de uPA es menor que un valor de corte de uPA de al menos el percentil 55 y como máximo el percentil 75 de los niveles normalizados de uPA en una población aleatorizada de
10 pacientes con cáncer de mama y el nivel de PAI-1 es menor que un valor de corte de PAI-1 de al menos el percentil 61 y como máximo el percentil 81 de los niveles normalizados de PAI-1 en una población aleatorizada de pacientes con cáncer de mama o como de alto riesgo si el nivel de uPA es mayor que el valor de corte de uPA o el nivel de PAI-1 es mayor que el valor de corte de PAI-1;
- (c) si dicho paciente se clasifica como de bajo riesgo en la etapa (b), seleccionar un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de
15 pacientes con cáncer de bajo riesgo; y
- (d) si dicho paciente se clasifica como de alto riesgo en la etapa (b), seleccionar un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de alto riesgo.
- 20 La presente invención se refiere a métodos para seleccionar un régimen de tratamiento más allá de la eliminación quirúrgica del tejido tumoral para cualquier sujeto con cáncer de mama, incluyendo sujetos que tienen células cancerosas detectables en tejido de ganglio linfático (es decir, "pacientes ganglio positivo", que tienen células cancerosas detectadas en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ganglios linfáticos) y sujetos que no tienen células cancerosas detectables en tejido de ganglio linfático (es decir, "pacientes ganglio negativo").
- 25 El método comprende medir los niveles de uPA y PAI-1 o los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en un sujeto, preferiblemente tejido canceroso del sujeto (por ejemplo, recogido por cirugía) o una muestra de tejido que comprende células cancerosas (por ejemplo, recogida por biopsia core o aspiración de fluido corporal); y, utilizando estos valores, clasificar el sujeto como de "bajo riesgo" o de "alto riesgo" y seleccionar un tratamiento que tenga el mayor beneficio
30 esperado, que incluye supervivencia sin enfermedad, particularmente supervivencia sin enfermedad a largo plazo y/o supervivencia global, para una población comparable. En realizaciones particulares, el método de la invención se usa para determinar si un sujeto debe someterse a un régimen de tratamiento agresivo o a un régimen de tratamiento no agresivo tomando como base los resultados del beneficio esperado de sujetos en la misma clasificación, es decir, de bajo o alto riesgo, en una población comparable. En una realización particular, el método se usa para determinar si se administra un régimen de tratamiento distinto de quimioterapia CMF.
- 35 "Beneficio esperado" se define como la supervivencia global y/o supervivencia sin enfermedad media demostrada (incluyendo supervivencia sin enfermedad a largo plazo) equilibrada por el efecto negativo en la calidad de vida debido a los efectos secundarios de un tratamiento particular de cáncer.
- Una "población comparable" se define como una población que comparte factores clínicamente relevantes, tales como, pero no limitados a, número de ganglios linfáticos afectados (estado ganglionar), tamaño del tumor, grado del tumor,
40 edad del paciente, estado de receptor hormonal, estado menopáusico, otros factores biológicos tumorales (por ejemplo, expresión de Her-2) y cualesquiera otros factores que un experto en la técnica considera para clasificar a los pacientes con cáncer.
- "Supervivencia sin enfermedad a largo plazo" se define como un estado sin enfermedad o que carece de recurrencia del cáncer de mama durante un periodo de 3, 5, 6, 8, 10, 12, 15 ó 30 años o más. La supervivencia global a largo plazo se
45 define como un paciente que sobrevive durante un periodo de 3, 5, 6, 8, 10, 12, 15 ó 30 años o más después de que el paciente ha sido diagnosticado de cáncer.
- Los sujetos de alto riesgo se identifican por niveles altos tanto de uPA como de PAI-1 determinados por valores de corte para estos indicadores. Los sujetos de alto riesgo se identifican por niveles altos tanto de ARNm que codifica uPA como PAI-1 determinados por valores de corte para estos indicadores. Los sujetos de alto riesgo (particularmente, sujetos de
50 alto riesgo ganglio positivo) pueden tener 4 o más ganglios linfáticos afectados. En una realización específica, los niveles de uPA y PAI-1 pueden medirse por los niveles de antígeno en extractos de tejido tumoral primario. En una realización preferida, los niveles de uPA y PAI-1 o los ARNm que codifican uPA y PAI-1 se miden por cualquier método de ensayo. En una realización preferida, los ARNm que codifican uPA y PAI-1 se miden por amplificación con RT-PCR. En otras

realizaciones preferidas, la amplificación con RT-PCR se realiza en secciones de parafina de una muestra del paciente o una o más células únicas de dicha muestra del paciente. La muestra del paciente comprende una o más células cancerosas. En una realización específica, un nivel alto de uPA o ARNm que codifica uPA corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 55 y no más de aproximadamente el percentil 75 de niveles de uPA o ARNm que codifica uPA normalizados (es decir, ajustados para diferencias en los valores medidos debido a diferencias en los métodos de ensayo) para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo. En realizaciones específicas, un nivel alto de uPA o ARNm que codifica uPA corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 60, 65 ó 70. En una realización específica, un nivel alto de PAI-1 o ARNm que codifica PAI-1 corresponde a niveles de PAI-1 por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 61 y no más de aproximadamente el percentil 81 de niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo. En una realización específica, un nivel alto de PAI-1 o ARNm que codifica PAI-1 corresponde a un nivel de PAI-1 por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75 de niveles de PAI-1 normalizados.

Los sujetos de bajo riesgo se identifican por niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1 o ARNm que codifican uPA y PAI-1, es decir, por debajo de los valores determinados como los valores "de corte" para uPA y PAI-1 o ARNm que codifican uPA y PAI-1. Los sujetos de bajo riesgo también se identifican como pacientes ganglio negativo que tienen niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1. Los sujetos de bajo riesgo ganglio positivo pueden tener 3 o menos ganglios linfáticos afectados y tienen niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1. En una realización preferida, los ARNm que codifican uPA y PAI-1 se miden por amplificación con RT-PCR. En realizaciones preferidas, la amplificación con RT-PCR se realiza en secciones de parafina de una muestra del paciente o una o más células únicas de dicha muestra del paciente. La muestra del paciente comprende una o más células cancerosas. En una realización específica, un nivel bajo de uPA o ARNm que codifica uPA corresponde a niveles por debajo del valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 55 y no más de aproximadamente el percentil 75 de niveles de uPA normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo. En realizaciones específicas, un nivel bajo de uPA o ARNm que codifica uPA corresponde a niveles por debajo del valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 60, 65 ó 70. En una realización específica, un nivel bajo de PAI-1 o ARNm que codifica PAI-1 corresponde a niveles de PAI-1 por debajo de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 65, 70, 75 de niveles de PAI-1 normalizados. En realizaciones específicas, un nivel bajo de PAI-1 o ARNm que codifica PAI-1 corresponde a niveles por debajo de un valor de corte de aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75.

Los regímenes de tratamiento post-quirúrgicos agresivos son regímenes de tratamiento que tienen efectos secundarios significativos. Estos regímenes de tratamiento pueden incluir, pero no están limitados a, quimioterapia, quimioterapia adyuvante, quimioterapia CMF adyuvante, quimioterapia no CMF adyuvante, quimioterapia que contiene antraciclina adyuvante, y quimioterapia que contiene taxanos adyuvante y puede incluir terapia endocrina adyuvante, incluyendo por ejemplo, anti-estrógenos, inhibidores de aromataasa, gestágenos, y también incluye terapia con radiación o terapia génica. Aunque estos regímenes de tratamiento se seleccionan habitualmente para pacientes de alto riesgo, determinados tratamientos agresivos pueden ser muy eficaces incluso en pacientes de bajo riesgo.

Los regímenes de tratamiento post-quirúrgicos no agresivos son regímenes de tratamiento que tienen menos efectos secundarios significativos. Estos regímenes de tratamiento pueden incluir, pero no están limitados a, sin tratamiento, terapia con radiación y terapia endocrina adyuvante, tal como , anti-estrógenos (por ejemplo, terapia con tamoxifeno), inhibidores de aromataasa, gestágenos, inmunoterapia y terapia biológica tumoral, por ejemplo, HERCEPTIN®, terapias anti-uPA, incluyendo anticuerpos monoclonales anti-uPA y anti-PAI-1, y péptidos uPA (y receptor de uPA) y PAI-1 y moléculas pequeñas inhibitoras. Aunque estos regímenes de tratamiento se seleccionan habitualmente para pacientes de bajo riesgo, determinados tratamientos no agresivos pueden ser muy eficaces e incluso significativamente eficaces en pacientes de alto riesgo.

La presente invención se refiere a métodos para predecir un beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama proporcionando quimioterapia sobre terapia hormonal para pacientes con cáncer de mama que están clasificados como de alto riesgo midiendo los niveles de uPA, PAI-1 o uPA y PAI-1 o los niveles de ARNm que codifican uPA y PAI-1. Pueden usarse otros factores clínicos para clasificar a los pacientes con cáncer de mama conjuntamente con estos dos factores.

La presente invención se refiere a métodos para predecir un beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer seleccionando un paciente con cáncer para tratamiento preventivo para recaída de cáncer posterior a la administración de un primer régimen de tratamiento. En realizaciones preferidas, el cáncer es cáncer de mama, leucemia o plasmacitoma. El método comprende medir los niveles de uPA, PAI-1 o uPA y PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en los pacientes con cáncer o en una muestra de tejido del paciente con cáncer; clasificar a los pacientes como de bajo o de alto riesgo tomando como base los niveles de uPA, PAI-1 o uPA y PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1; y seleccionar uno o más sujetos de alto riesgo para un primer régimen de tratamiento. En una realización específica, la muestra se obtiene de un tumor primario del paciente con

cáncer. Posteriormente, los pacientes que se han clasificado como de alto riesgo para recaída del cáncer se tratan adicionalmente con un tratamiento preventivo. El tratamiento preventivo seleccionado se basa en el sitio de recaída específico. En una realización específica, la recaída ocurre en los huesos. En una realización específica, el tratamiento preventivo comprende la administración de fármacos bisfosfonato al paciente.

5 La presente invención también se refiere a un método para predecir un beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama después de la eliminación de tejido tumoral primario. El método comprende medir el nivel de uPA y PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en dicho tejido tumoral primario de dicho paciente. El paciente se clasifica como de bajo riesgo si los niveles de PAI-1 son bajos. Un nivel bajo de PAI-1
10 corresponde a niveles por debajo de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 61 y no más de aproximadamente el percentil 81 de niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo. En realizaciones específicas, un nivel bajo de uPA corresponde a niveles por debajo de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 60, 65 ó 70. En realizaciones específicas, un nivel bajo de PAI-1
15 corresponde a niveles por debajo de un valor de corte de aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75. Un paciente se clasifica como de alto riesgo si el nivel de PAI-1 es alto. El paciente se clasifica como de alto riesgo si el nivel de PAI-1 corresponde a un valor de corte por encima de al menos aproximadamente el percentil 61 y no más de aproximadamente el percentil 81 de niveles de PAI-1 normalizados para un grupo de pacientes aleatorizado usando cualquier ensayo. En realizaciones preferidas, los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 se miden por
20 amplificación con RT-PCR. En realizaciones específicas, un nivel alto de PAI-1 corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento no agresivo si ese régimen de tratamiento resulta en el mayor beneficio esperado de tratamiento en una población comparable de pacientes de bajo riesgo; y si el paciente se clasifica como de alto riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento agresivo si ese régimen de tratamiento resulta en el mayor beneficio
25 esperado de tratamiento en una población comparable de pacientes de alto riesgo. En una realización específica, el tratamiento agresivo es quimioterapia.

25 El sujeto puede ser cualquier animal pero, preferiblemente, el sujeto es un mamífero y, lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano. En una realización, el método de la presente invención es aplicable a pacientes ganglio negativo. En otra realización, el método de la presente invención es aplicable a pacientes ganglio positivo. En una realización, el método de la presente invención es aplicable a pacientes metastásicos. En otra realización, el método de la presente invención es aplicable a pacientes no metastásicos.

30 En una realización, los métodos de la presente invención incluyen medir las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas uPA y PAI-1 o sus variantes naturales que son indicativas de la expresión de uPA y PAI-1. Los métodos de la presente invención también engloban medir los productos génicos uPA y PAI-1 usando anticuerpos dirigidos frente a dichos productos génicos uPA y PAI-1 o variantes o fragmentos conservados de éstos. En una realización, el método emplea anticuerpos dirigidos frente a un fragmento u otro derivado de las proteínas uPA y PAI-1 que tienen al menos
35 una longitud de 10 aminoácidos. En una realización específica, el método emplea ELISA para medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1. En una realización más específica, el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 se miden usando Imubind #821 (American Diagnostica, Inc., Greenwich CT), respectivamente.

40 En un ejemplo no limitativo, las moléculas de ácido nucleico de uPA y PAI-1 pueden usarse como sondas de hibridación en diagnóstico o como cebadores para el análisis cuantitativo por RT-PCR para determinar los niveles de expresión de los productos génicos uPA y PAI-1. En una realización específica, el análisis por RT-PCR se realiza en secciones de parafina de una muestra de tejido del paciente con cáncer o en una o más células únicas de dicha muestra de tejido. En realizaciones específicas, la muestra de tejido comprende una o más células cancerosas.

También se proporcionan métodos de obtención de imágenes, para obtener imágenes de la localización y/o cantidades de los productos génicos uPA y PAI-1 en un paciente, para uso diagnóstico y de pronóstico.

45 4. DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

FIGS. 1A y 1B. (A) La secuencia de nucleótidos del ADNc de uPA (SEQ ID NO: 1). (B) La secuencia de aminoácidos de uPA (SEQ ID NO: 2).

FIGS 2A y 2B. (A) La secuencia de nucleótidos del ADNc de PAI-1 (SEQ ID NO: 3). (B) La secuencia de aminoácidos de PAI-1 (SEQ ID NO: 4).

50 FIGS. 3A y 3B. (A) Separación incrementada del grupo de riesgo conseguida por PAI-1 en pacientes con uPA bajo. (B) Separación incrementada del grupo de riesgo conseguida por uPA en pacientes con PAI-1 bajo. Impacto en la supervivencia sin enfermedad (DFS) en cáncer de mama *ganglio negativo* (sin terapia sistémica adyuvante).

FIG. 4. Impacto en el pronóstico de las cuatro combinaciones diferentes de uPA y PAI-1 en supervivencia sin enfermedad (DFS) en cáncer de mama *ganglio negativo* (sin terapia sistémica adyuvante).

FIG. 5. Riesgo relativo (RR) de recurrencia asociado con uPA/PAI-1 alto en subgrupos clínicamente relevantes de pacientes con cáncer de mama *ganglio negativo* (sin terapia sistémica adyuvante).

5 FIGS. 6A y 6B. El impacto de uPA/PAI-1 en la supervivencia sin enfermedad (DFS) refleja el efecto de la terapia sistémica adyuvante en pacientes con cáncer de mama *primario*.

FIG. 7. Los beneficios de la terapia para cuatro grupos diferentes de pacientes se ilustran en términos de proporciones de riesgo de recaída por los niveles de uPA/PAI-1 (alto frente a bajo) y por grupos de tratamiento (quimioterapia (CT) frente a terapia hormonal (HT)). Los intervalos representados incluyen sólo los errores estándar en los efectos principales.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Es la observación de los presentes inventores que los niveles tumorales del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA) y de su inhibidor el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 (PAI-1) son factores predictivos para los resultados de pacientes con cáncer de mama ganglios linfáticos positivos y ganglios linfáticos negativos. Los pacientes con niveles altos de uPA y/o PAI-1 en sus tumores primarios, como se define por los valores de corte determinados de uPA y PAI-1, tuvieron una supervivencia sin enfermedad (DFS) significativamente más corta, incluyendo la supervivencia sin enfermedad a largo plazo, y una supervivencia global (OS), incluyendo supervivencia global a largo plazo, que los pacientes con niveles tumorales bajos tanto de uPA como de PAI-1. En la presente invención, el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en un paciente se usan para evaluar varias opciones de tratamiento, incluyendo sin tratamiento, opcionalmente, después de la eliminación del tejido tumoral, con el fin de seleccionar un régimen de tratamiento que proporcione beneficio a un paciente. En un aspecto de la invención, el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en un paciente, junto con el estado ganglionar, se usan para evaluar varias opciones de tratamiento con el fin de seleccionar un régimen de tratamiento que proporcione beneficio óptimo a un paciente. El beneficio incluye supervivencia sin enfermedad y supervivencia global prolongadas después de la implementación de un régimen de tratamiento seleccionado equilibrado por los efectos secundarios potenciales del tratamiento.

5.1. MÉTODO PARA SELECCIONAR UN RÉGIMEN DE TRATAMIENTO

La evaluación adecuada del grupo de riesgo para decisiones sobre la terapia de cáncer y la predicción de la respuesta al tratamiento son prerequisites para la terapia individualizada diseñada para los pacientes con cáncer. Los métodos de la presente invención pueden usarse para determinar un régimen de tratamiento midiendo los niveles de uPA y PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en un sujeto. La relevancia clínica de los dos factores de invasión tumoral es mayor cuando se usan en combinación, aunque cada factor solo puede tener un valor predictivo para un beneficio esperado en una población comparable. La combinación particular, uPA/PAI-1 es superior a cualquier factor solo y apoya las decisiones de terapia individualizada adaptadas al riesgo. Estos dos factores predicen fuertemente la supervivencia sin enfermedad, incluyendo supervivencia sin enfermedad a largo plazo, y la supervivencia global en una población. Tomando como base estos valores, puede hacerse la predicción de la duración de la supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia global para el paciente sin tratamiento o con un tratamiento particular. Además, los niveles de uPA/PAI-1 tienen un impacto predictivo significativo en la respuesta a la quimioterapia adyuvante. Por lo tanto, puede seleccionarse un régimen de tratamiento más apropiado para el sujeto. Dependiendo de si los niveles de uPA y/o PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 están por encima o por debajo de un valor de corte determinado, los sujetos pueden clasificarse como de alto riesgo o de bajo riesgo. De alto riesgo significa que el sujeto puede padecer una recaída temprana. Para pacientes con una alta probabilidad de recaída temprana, puede administrarse un tratamiento preventivo adicional después de que se haya administrado un tratamiento particular. De bajo riesgo indica que el sujeto tiene bajo riesgo de recaída, así, el sujeto puede no beneficiarse significativamente de determinados tratamientos agresivos del cáncer.

El paciente puede clasificarse como de alto riesgo o de bajo riesgo dependiendo del nivel de uPA y del nivel de PAI-1 o de los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 medidos como un percentil para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando uno o más ensayos para uPA y PAI-1 o ARNm que codifican uPA y PAI-1. Un nivel alto de uPA corresponde a niveles que son más altos que un nivel de corte ajustado a un valor de al menos aproximadamente el percentil 55 y no más de aproximadamente el percentil 75 de niveles de uPA normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando cualquier ensayo. En realizaciones específicas, un nivel alto de uPA corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 60, 65 ó 70. En una realización, el valor de corte de uPA es al menos aproximadamente el percentil 65 de los niveles de uPA normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando cualquier ensayo. En otra realización, el valor de corte para uPA es al

- menos aproximadamente el percentil 70 de los niveles de uPA normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando cualquier ensayo. Un nivel alto de PAI-1 corresponde a niveles que son más altos que un nivel de corte ajustado a un valor al menos aproximadamente del percentil 61 y a menos de aproximadamente el percentil 81 de los niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo. En realizaciones específicas, un nivel alto de PAI-1 corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75. En una realización, el valor de corte para PAI-1 es al menos aproximadamente el percentil 65 de los niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando cualquier ensayo. En otra realización, el valor de corte para PAI-1 es al menos aproximadamente el percentil 70 de los niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando cualquier ensayo. En otra realización, el valor de corte para PAI-1 es al menos aproximadamente el percentil 75 de los niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando cualquier ensayo. Un paciente se clasifica como de alto riesgo si uno o los dos de los niveles de uPA y PAI-1 son altos. Por el contrario, un nivel bajo de uPA y un nivel bajo de PAI-1 corresponden a niveles que son menores que el valor de corte ajustado para el indicador. Un paciente se clasifica como de bajo riesgo si tanto los niveles de uPA como de PAI-1 son bajos, es decir, por debajo del valor de corte.
- Los niveles de antígeno de uPA y PAI-1 en los análisis de extractos de tejido tumoral primario de un grupo aleatorizado de pacientes se miden usando un ensayo ELISA. Los niveles altos de uPA y/o PAI-1 pueden definirse como por encima de los niveles de corte ajustados a un valor para cada uno de uPA y PAI-1 (no es parte de la invención reivindicada). Los niveles bajos de uPA y/o PAI-1 pueden definirse como por debajo del valor de corte ajustado para cada uno de uPA y PAI-1. Un nivel alto de uPA puede definirse como por encima de un nivel de corte ajustado a un valor de al menos aproximadamente 2,4 ng/mg de proteína y no más de aproximadamente 4 ng/uPA/mg de proteína. Específicamente, un nivel alto de uPA puede definirse como por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente 2,6, 2,8, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6 ó 3,8 ng uPA/mg de proteína. El valor de corte para uPA puede ser al menos aproximadamente 3 ng/uPA/mg de proteína o al menos aproximadamente 3,5 ng/uPA/mg de proteína. Un nivel alto de PAI-1 puede definirse como por encima de un nivel de corte ajustado a un valor de al menos aproximadamente 11 ng/mg de proteína y no más de aproximadamente 19 ng/PAI-1/mg de proteína. Un nivel alto de PAI-1 puede definirse como por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente 13, 15 ó 17 ng PAI-1/mg de proteína. Un nivel bajo se define como cuando los niveles tanto de uPA como de PAI-1 están por debajo del valor de corte. El número de pacientes que está por encima del valor de corte ajustado para uPA y PAI-1 corresponde a un porcentaje de pacientes que están por encima de los valores de corte para uPA y PAI-1 en el grupo aleatorizado de pacientes medidos por el ensayo. Un nivel alto de uPA se define como por encima de un nivel de corte ajustado a un valor de al menos aproximadamente el percentil 55 y no más de aproximadamente el percentil 75 para un grupo aleatorizado de pacientes con cáncer usando el ensayo. En realizaciones específicas, un nivel alto de uPA corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75. Un nivel alto de PAI-1 se define como por encima de un nivel de corte ajustado a un valor de al menos aproximadamente el percentil 61 y no más de aproximadamente el percentil 81 para un grupo aleatorizado de pacientes usando el ensayo. En realizaciones específicas, un nivel alto de PAI-1 corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 65, 70 ó 75. De bajo riesgo se define como cuando los niveles tanto de uPA como de PAI-1 están por debajo del valor de corte. Cuando se usan diferentes ensayos para medir los niveles de uPA y PAI-1 en un grupo aleatorizado de pacientes, los valores percentiles de corte para uPA y PAI-1 corresponden al porcentaje de pacientes que están por encima del conjunto de valores de corte medidos usando el ensayo inicial ELISA (o cualquier cantidad de ensayos, siempre que los valores se ajusten para diferencias en el ensayo) y los valores de uPA y PAI-1 obtenidos de un paciente pueden convertirse en percentil o incluso un valor análogo para un tipo diferente de ensayo usando métodos que son muy conocidos en la técnica para comparar y normalizar los resultados del ensayo. Por lo tanto, los niveles de corte pueden medirse como un percentil para un grupo aleatorizado de pacientes en el que los niveles de uPA y PAI-1 se miden usando cualquier ensayo.
- Un paciente puede clasificarse en un grupo de alto riesgo o de bajo riesgo dependiendo del nivel de uPA y el nivel de PAI-1 según se mide por los niveles de antígeno de los análisis en extractos de tejido tumoral primario del paciente usando ELISA, particularmente ELISA usando anticuerpos de American Diagnostica Inc. Un paciente también puede clasificarse en un grupo de alto riesgo o de bajo riesgo dependiendo del número de ganglios linfáticos afectados (estado ganglionar). El número de ganglios linfáticos afectados puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más de 10.
- En un grupo de riesgo particular, los pacientes pueden estratificarse además por otros criterios clínicamente relevantes tales como, pero no limitados a, estado menopáusico, tamaño del tumor, grado del tumor, edad del paciente, estado de receptores hormonales, otros factores biológicos tumorales y cualesquiera otros factores que un experto en la técnica considera para clasificar a los pacientes con cáncer. Estos factores también contribuyen al método de la presente invención para seleccionar un régimen de tratamiento para un paciente con cáncer de mama ganglio negativo o ganglio positivo. Dichos factores también pueden usarse para identificar una población de referencia comparable para los métodos predictivos de la invención.

El método de la presente invención se refiere a seleccionar de dos o más regímenes de tratamiento, incluyendo un régimen de no tratamiento, un régimen de tratamiento que tenga el mayor beneficio esperado para un paciente con

cáncer de mama primario ganglio positivo. Opcionalmente, el paciente ha sido sometido a cirugía para eliminar el tejido tumoral primario. El método comprende las etapas de medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en dicho paciente o en una muestra de tejido de dicho paciente, incluyendo tejido tumoral primario; clasificar a dicho paciente como de bajo riesgo o de alto riesgo dependiendo de los niveles de uPA y PAI-1, es decir, si los niveles están por encima o por debajo de un valor de corte ajustado para cada factor; y si dicho paciente se clasifica como de bajo riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento de los dos o más regímenes de tratamiento que resultan en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de bajo riesgo; y si dicho paciente se clasifica como de alto riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resultan en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo.

El método de la presente invención se refiere a seleccionar de dos o más regímenes de tratamiento, incluyendo un régimen de no tratamiento, un régimen de tratamiento que tenga la mayor supervivencia global demostrada para un paciente con cáncer. Opcionalmente, el paciente ha sido sometido a cirugía para eliminar el tejido tumoral primario. El método comprende medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en dicho paciente con cáncer o en una muestra de tejido de dicho paciente con cáncer; y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo dependiendo de si los niveles de uPA y PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 están por encima o por debajo de un nivel de corte ajustado para cada factor. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resultan en la mayor supervivencia global demostrada en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de bajo riesgo; y si dicho paciente se clasifica como de alto riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resultan en la mayor supervivencia global demostrada en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo.

El método de la presente invención se refiere a seleccionar de dos o más regímenes de tratamiento, incluyendo un régimen de no tratamiento, un régimen de tratamiento que tenga la mayor supervivencia sin enfermedad demostrada (preferiblemente, supervivencia sin enfermedad a largo plazo) para un paciente. Opcionalmente, el paciente ha sido sometido a cirugía para eliminar el tejido tumoral primario. El método comprende medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1, preferiblemente por ELISA, en dicho tejido tumoral primario de dicho paciente y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo; si dicho paciente se clasifica como de bajo riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resultan en la mayor supervivencia sin enfermedad demostrada en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de bajo riesgo; y si dicho paciente se clasifica como de alto riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resultan en la mayor supervivencia sin enfermedad demostrada en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo. En una realización particular, dichos dos o más regímenes de tratamiento no incluyen quimioterapia CMF adyuvante o, en otras realizaciones, quimioterapia adyuvante.

La presente invención también se refiere a métodos para identificar a sujetos para un régimen de tratamiento que beneficia a pacientes de alto riesgo. El método comprende las etapas de medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en uno o más sujetos o muestras de tejido de dichos sujetos; y clasificar a los sujetos como de bajo o de alto riesgo; después, uno o más de los sujetos de alto riesgo se seleccionan para un régimen de tratamiento, es decir, los sujetos en los que los niveles tanto de uPA como de PAI-1 están por encima de los valores de corte ajustados para uPA y PAI-1. El régimen de tratamiento puede incluir, pero no está limitado a, regímenes de tratamiento agresivos tales como, quimioterapia adyuvante, quimioterapia CMF adyuvante, quimioterapia no CMF adyuvante, quimioterapia que contiene antraciclina adyuvante, y quimioterapia que contiene taxanos adyuvante y cualesquiera otros tratamientos que están asociados con efectos secundarios significativos o debilitantes o desagradables.

La presente invención también se refiere a métodos para identificar a sujetos de bajo riesgo para un régimen de tratamiento. El método comprende medir los niveles de uPA y PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en un sujeto; clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo; y seleccionar a sujetos de bajo riesgo para el régimen de tratamiento. Los regímenes de tratamiento pueden incluir, pero no se limitan a, regímenes de tratamiento no agresivos tales como, pero sin limitarse a, no tratamiento (excepto la cirugía inicial para eliminar el tejido tumoral), terapia con radiación, terapia endocrina adyuvante tal como terapia con tamoxifeno, inmunoterapia y terapia biológica-tumoral, tal como inhibidores/antagonistas de uPA, y otros tratamientos que tengan efectos secundarios menores y/o tolerables.

La solicitud también describe un método para predecir la supervivencia global de un paciente con cáncer que se somete a un régimen de tratamiento. Opcionalmente, el tratamiento se proporciona después de que se ha eliminado un tejido tumoral primario. El método comprende medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 por cualquier ensayo en el paciente o una muestra de tejido del paciente; y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, la supervivencia global del paciente se predice

como la supervivencia global promediada o media o mediana de una población comparable de pacientes de bajo riesgo a los que se ha administrado dicho régimen de tratamiento; y si el paciente se clasifica como de alto riesgo, la supervivencia global del paciente se predice como la supervivencia global promediada o media o mediana de una población comparable de pacientes de alto riesgo a los que se ha administrado dicho régimen de tratamiento. En una realización preferida, el régimen de tratamiento para un paciente de alto riesgo es la quimioterapia.

También se describe un método para predecir la supervivencia sin enfermedad (preferiblemente supervivencia sin enfermedad a largo plazo) de un paciente con cáncer que se somete a un régimen de tratamiento. Opcionalmente, el tratamiento se proporciona después de que se ha eliminado un tejido tumoral primario. El método comprende medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1 en dicho paciente o una muestra de tejido de dicho paciente y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, la supervivencia sin enfermedad del paciente se predice como la supervivencia sin enfermedad promediada o media o mediana de una población comparable de pacientes de bajo riesgo a los que se ha administrado dicho régimen de tratamiento; y si el paciente se clasifica como de alto riesgo, la supervivencia sin enfermedad para dicho paciente se predice como la supervivencia sin enfermedad promediada o media o mediana de una población comparable de pacientes de alto riesgo a los que se ha administrado dicho régimen de tratamiento. En una realización particular, el régimen de tratamiento no incluye quimioterapia CMF adyuvante. En una realización preferida, el régimen de tratamiento para un paciente de alto riesgo es la quimioterapia.

La presente invención también se refiere a un método para determinar si se debe administrar un tratamiento agresivo a un paciente con cáncer. Opcionalmente, el tratamiento se proporciona después de que se ha eliminado un tejido tumoral primario. El método comprende medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o los niveles de los ARNm que codifican uPA y PAI-1, preferiblemente por ELISA, en dicho tejido tumoral primario de dicho paciente y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, el régimen de tratamiento agresivo se selecciona si resulta en un beneficio esperado del tratamiento en una población comparable de pacientes de bajo riesgo; y, si el paciente se clasifica como de alto riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento agresivo que resulta en el mayor beneficio esperado del tratamiento en una población comparable de pacientes de alto riesgo.

Los métodos de la presente invención pueden usarse para determinar si puede administrarse a un sujeto un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro candidato a fármaco) para tratar el cáncer u otra enfermedad o trastorno asociado con niveles altos de uPA y PAI-1 para pacientes con cáncer. Por ejemplo, dichos métodos pueden usarse para determinar si un sujeto puede tratarse eficazmente con un agente o clase de agentes específica (por ejemplo, agentes de un tipo que disminuya el nivel de actividad o de expresión de los transcritos o polipéptidos uPA y PAI-1). En particular, la decisión sobre el tratamiento incluyendo terapia tal como terapia sistémica adyuvante para grupos de alto y de bajo riesgo puede tomarse cuando el beneficio del tratamiento se evalúa para pacientes que reciben el régimen de tratamiento comparado con aquellos sin dicho régimen de tratamiento.

La presente invención también se refiere a un método para predecir respuestas de un paciente con cáncer a un régimen de tratamiento. El método comprende medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 en dicho paciente o una muestra de tejido de dicho paciente y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, el beneficio del tratamiento para el paciente se predice como el promedio o media o mediana del beneficio esperado en una población comparable de pacientes de bajo riesgo a los que se ha administrado dicho régimen de tratamiento; y, si el paciente se clasifica como de alto riesgo, el beneficio del tratamiento para el paciente se predice como el promedio o media o mediana del beneficio esperado en una población comparable de pacientes de alto riesgo a los que se ha administrado dicho régimen de tratamiento. En una realización preferida, el régimen de tratamiento para los pacientes de alto riesgo es la quimioterapia.

Además, los niveles de las moléculas de ácido nucleico o polipéptidos de uPA y PAI-1 pueden correlacionarse con la presencia o nivel de expresión de otras proteínas relacionadas con el cáncer, tales como por ejemplo, receptor de andrógenos, receptor de estrógenos, moléculas de adhesión (por ejemplo, E-cadherina), marcadores de proliferación (por ejemplo, MIB-1), genes supresores de tumores (por ejemplo, TP53, producto del gen de retinoblastoma), factor de crecimiento del endotelio vascular (Lissoni *et al.*, 2000, *Int J Biol Markers*. 15(4): 308), Rad51 (Maacke *et al.*, 2000, *Int J Cancer*. 88(6): 907), ciclina D1, BRCA1, BRCA2 o antígeno carcinoembrionario. Estos factores de pronóstico combinados pueden facilitar adicionalmente la clasificación de los sujetos de alto y de bajo riesgo y usando esta información se selecciona un régimen de tratamiento que es adecuado para cada grupo. En una realización preferida, se usa quimioterapia en combinación con otra terapia tal como terapia hormonal.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de diagnóstico pre-ensavados que comprenden al menos un reactivo que es una sonda de ácido nucleico o anticuerpo descrito en la presente memoria, que puede usarse convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos. Además, puede utilizarse

cualquier tipo de célula o tejido, por ejemplo, preferiblemente células o tejido cancerosos de mama, en los que se expresa el gen relacionado con el cáncer para medir los niveles de los productos génicos uPA y PAI-1.

5.2. TIPOS DE CÁNCERES

5 En varias realizaciones, la presente invención proporciona métodos para determinar los regímenes de tratamiento para sujetos con cáncer de mama.

En una realización preferida, los métodos de la invención están dirigidos a determinar un régimen de tratamiento más allá de la eliminación quirúrgica del tejido tumoral para un sujeto con cáncer de mama que no tiene células cancerosas detectadas en el tejido de ganglios linfáticos.

10 El método comprende una etapa de medir los niveles de uPA y PAI-1 en el tejido tumoral en un grupo colectivo representativo de pacientes con dicha malignidad. Los niveles de corte para uPA y PAI-1 se determinan para los pacientes con la malignidad usando métodos muy conocidos para un experto en la técnica, tal como un ensayo de rango logarítmico. Los pacientes se clasifican como de alto riesgo (es decir, pacientes en los que los niveles de uPA o de PAI-1, o de los dos, están por encima de los valores de corte ajustados para uPA y PAI-1) o de bajo riesgo (es decir, pacientes en los que los niveles tanto de uPA como de PAI-1 están por debajo de los valores de corte ajustados para uPA y PAI-1). Entonces se selecciona un régimen de tratamiento de dos o más regímenes de tratamiento para el grupo de bajo riesgo que resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de bajo riesgo. Se selecciona un régimen de tratamiento de dos o más regímenes de tratamiento para el grupo de alto riesgo que resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama de alto riesgo. El método comprende además considerar otros factores clínicamente relevantes incluyendo estado ganglionar, tamaño del tumor, grado del tumor, edad del paciente, estado de los receptores hormonales y estado menopáusico para seleccionar un régimen de tratamiento con el mayor beneficio esperado.

25 La presente invención proporciona un método para seleccionar un régimen de tratamiento para un paciente con cáncer de mama de dos o más regímenes de tratamiento que proporciona el mayor beneficio esperado a un paciente con dicho cáncer maligno, comprendiendo dicho método las etapas de medir el nivel de uPA y PAI-1, preferiblemente por ELISA, en un tejido tumoral primario del paciente y clasificar al paciente como de bajo o de alto riesgo. Si el paciente se clasifica como de bajo riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento si resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes de bajo riesgo con la malignidad; y si el paciente se clasifica como de alto riesgo, se selecciona un régimen de tratamiento si resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes de alto riesgo con la malignidad.

30 5.3. DETECCIÓN Y ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER EN UN SUJETO

Los métodos de la presente invención incluyen la medición de los niveles de polipéptidos uPA y PAI-1 naturales o variantes naturales de éstos, para clasificar a pacientes con cáncer de mama como de alto o de bajo riesgo, de manera que se selecciona un régimen de tratamiento para el cáncer de mama en un sujeto tomando como base los resultados predichos en poblaciones comparables de bajo o de alto riesgo. Las poblaciones comparables se identifican usando parámetros clínicamente relevantes tales como el estadio del cáncer de mama como se ha discutido anteriormente.

40 La estadificación se refiere al agrupamiento de los pacientes según la magnitud de su enfermedad. La estadificación es útil para elegir el tratamiento para pacientes individuales, estimar el pronóstico y comparar los resultados de diferentes programas de tratamiento. La estadificación del cáncer de mama por ejemplo se realiza inicialmente según una base clínica, según el examen físico y evaluación radiológica en el laboratorio. El sistema de estadificación clínica usado más ampliamente es el adoptado por la International Union against Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging and End Results Reporting. Se basa en el sistema de tumor-ganglios-metástasis (TNM) como se detalla en el *Manual for Staging of Cancer* de 1988. Las enfermedades o afecciones de cáncer de mama que pueden detectarse y/o estadificarse en un sujeto según la presente invención incluyen pero no están limitadas a las listadas en la Tabla 2.

TABLA 2

ESTADIFICACIÓN DEL CÁNCER DE MAMA

T TUMORES PRIMARIOS

TX No puede evaluarse el tumor primario

T0 Sin evidencia de tumor primario

Tis Carcinoma in situ: carcinoma intraductal, carcinoma lobular o enfermedad de Paget sin tumor

T1 Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión

- a. 0,5 cm o menos en su mayor dimensión
- b. Mayor de 0,5 cm, pero no mayor de 1 cm en su mayor dimensión
- c. Mayor de 1 cm, pero no mayor de 2 cm en su mayor dimensión

T2 Tumor de más de 2 cm pero no de más de 5 cm en su mayor dimensión

T3 Tumor de más de 5 cm en su mayor dimensión

T4 Tumor de cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica o a la piel. La pared torácica incluye costillas, músculos intercostales y músculo serrato anterior pero no el músculo pectoral.

- a. Extensión a la pared torácica
- b. Edema (incluyendo piel de naranja), ulceración de la piel de la mama o nódulos de la piel satélite confinados en la misma mama
- c. Los dos anteriores
- d. Carcinoma inflamatorio

Hoyuelos en la piel, retracción del pezón, o cualesquiera otros cambios en la piel excepto aquellos de T4b pueden ocurrir en T1, T2 o T3 sin afectar a la clasificación.

N GANGLIOS LINFÁTICOS REGIONALES

NX No pueden evaluarse los ganglios linfáticos regionales (por ejemplo, se han eliminado previamente)

N0 Sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales

N1 Metástasis en ganglio(s) axilares ipsilaterales móviles

N2 Metástasis en ganglios axilares ipsilaterales fijadas entre sí o a otras estructuras

N3 Metástasis en ganglio(s) linfáticos mamarios ipsilaterales internos

M METÁSTASIS DISTANTE

M0 Sin evidencia de metástasis distante

M1 Metástasis distante (incluyendo metástasis en ganglios linfáticos supraclaviculares ipsilaterales)

5 Un aspecto de la estadificación es evaluar el estado ganglionar. Específicamente, los pacientes se evalúan respecto a si su estado ganglionar es ganglio negativo o ganglio positivo. Los pacientes ganglio negativo no tienen metástasis en los ganglios linfáticos regionales. Para los pacientes ganglio positivo, el número de ganglios linfáticos afectados puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

5.4. MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

10 A continuación se describen métodos para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, cáncer de mama. El resultado deseado del tratamiento es al menos producir en un sujeto tratado un beneficio en la salud, que en el caso del cáncer, incluyendo el cáncer de mama, incluye, pero no se limita a, remisión del cáncer, alivio de los síntomas del cáncer, y/o control de la diseminación metastásica del cáncer, mejora de, o extensión del periodo de supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia global.

5.4.1. REGÍMENES DE TRATAMIENTO DEL CÁNCER

15 Los regímenes de tratamiento del cáncer que pueden usarse en la presente invención incluyen el uso de una o más moléculas, compuestos o tratamientos para el tratamiento del cáncer (es decir, terapéuticos del cáncer), incluyendo estas moléculas, compuestos o tratamiento, pero sin estar limitados a, cirugía para eliminar el tumor, quimioagentes,

inmunoterapéuticos, vacunas contra el cáncer, agentes anti-angiogénicos, citoquinas, terapias hormonales, terapias génicas, transfusión de células sanguíneas, transfusión de componentes sanguíneos y radioterapias.

En una realización, uno o más quimioagentes se administran para tratar a un paciente con cáncer. En una realización preferida, el quimioagente no es CMF. Un quimioagente (o "agente anti-canceroso" o "agente anti-tumoral" o "terapéutico del cáncer") se refiere a cualquier molécula o compuesto que ayuda en el tratamiento de tumores o cáncer. Los ejemplos de quimioagentes incluyen, pero no están limitados a, bisfosfonato, citosina arabinósido, taxoides (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), agentes anti-tubulina (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, epotilona B o sus análogos), macrólidos (por ejemplo, rizoxina), cisplatino, carboplatino, adriamicina, tenopósido, mitozantrona, discodermólido, eleuterobina, 2-clorodesoxiadenosina, agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, tiorepa, clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), lormustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP), cisplatino, tiotepa), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina), antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, flavopiridol, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbazina, temozolamida), asparaginasa, toxina de la difteria, hexametilmelamina, hidroxiourea, LYSODREN®, análogos de nucleósidos, alcaloides de plantas (por ejemplo, Taxol, paclitaxel, camptotecina, topotecán, irinotecán (CAMPTOSAR, CPT-11), vincristina, alcaloides de vinca tal como vinblastina), podofilotoxina (incluyendo derivados tales como epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), VM-26 (tenipósido)), citocalasina B, colchicina, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, procarbazona, mecloretamina, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina), doxorubicina, doxorubicina liposomal), dihidroxiantracindiona, mitozantrona, mitramicina, actinomicina D, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, agentes anti-mitóticos, abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, aldesleuquina, alutamina, anastrazol, bicalutamida, bioomicina, busulfán, capecitabina, carboplatino, clorabusilo, cladribina, cilarabina, daclinomina, estramusina, floxurida, gemcitabina, gosereína, idarrubicina, itosfamida, acetato de lauprólido, levamisol, lomuslina, mecloretamina, magestrol, acetato, mecaptopurino, mesna, mitolanc, pegaspergasa, pentoslatina, picamicina, riuxlmab, campat-1, estropozocina, tioguanina, tretinoína, vinorebina, o cualquier fragmento, miembros de la familia, o derivados de éstos, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables de éstos. Las composiciones que comprenden una combinación de quimioagentes (por ejemplo, AC, EC, FEC, ET, E-Docetaxel, Docetaxel-Xeloda, etc.) también pueden usarse para tratar el cáncer. AC y EC comprenden adriamicina o epirubicina y ciclofosfamida; FAC y FEC comprenden fluorouracilo, adriamicina o epirubicina, y ciclofosfamida; y ET comprende epirubicina y taxol.

Los agentes citotóxicos o citostáticos individuales que pueden usarse para tratar el cáncer incluyen pero no están limitados a un andrógeno, asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, butionina sulfoximina, CC-1065, clorambucilo, colchicina, un estrógeno, 5-fluorodesoxiuridina, nitroimidazol y tioTEPA.

En otras realizaciones, los regímenes de tratamiento para cáncer de mama incluyen composiciones farmacéuticas que comprenden 5-fluorouracilo, cisplatino, docetaxel, doxorubicina, Herceptin®, gemcitabina (Seidman, 2001, Oncology 15: 11-14)), IL-2, paclitaxel, y/o VP-16 (etopósido).

En una realización preferida, el régimen de tratamiento comprende quimioterapia usando cualquiera de los quimioagentes listados anteriormente en combinación con otros regímenes de tratamiento para cáncer de mama listados anteriormente. En otra realización preferida, el régimen de tratamiento comprende quimioterapia en combinación con HERCEPTIN® y/o fármacos o moléculas pequeñas que tienen como diana uPA y/o PAI-1 como se discute más adelante.

En una realización, el quimioagente usado es gemcitabina a una dosis en el intervalo de 100 a 1.000 mg/m²/ciclo. En una realización, el quimioagente usado es dacarbazina a una dosis en el intervalo de 200 a 4.000 mg/m²/ciclo. En una realización preferida, la dosis varía de 700 a 1.000 mg/m²/ciclo. En otra realización, el quimioagente usado es fludarabina a una dosis en el intervalo de 25 a 50 mg/m²/ciclo. En otra realización, el quimioagente usado es citosina arabinósido (Ara-C) a una dosis en el intervalo de 200 a 2.000 mg/m²/ciclo. En otra realización, el quimioagente usado es docetaxel a una dosis en el intervalo de 1,5 a 7,5 mg/kg/ciclo. En otra realización, el quimioagente usado es paclitaxel a una dosis en el intervalo de 5 a 15 mg/kg/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es cisplatino a una dosis en el intervalo de 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es 5-fluorouracilo a una dosis en el intervalo de 5 a 20 mg/kg/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es doxorubicina a una dosis en el intervalo de 2 a 8 mg/kg/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es epipodofilotoxina a una dosis en el intervalo de 40 a 160 mg/kg/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es ciclofosfamida a una dosis en el intervalo de 5 a 200 mg/kg/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es irinotecán a una dosis en el intervalo de 5 a 75, 75 a 100, 100 a 125 ó 125 a 150 mg/m²/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es vinblastina a una dosis en el intervalo de 3,7 a 5,4, 5,5 a 7,4, 7,5 a 11 ó 11 a 18,5 mg/m²/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es vincristina a una dosis en el intervalo de 0,7 a 1,4 ó 1,5 a 2 mg/m²/ciclo. En otra realización más, el quimioagente usado es metotrexato a una dosis en el intervalo de 3,3 a 5, 5 a 10, 10 a 100 ó 100 a 1.000 mg/m²/ciclo.

Las dosificaciones para cáncer de mama pueden encontrarse en cualquier libro médico estándar (por ejemplo, Breast Disease (J. Harris, editor) y las directrices actuales proporcionadas por St. Gallen o el National Institute of Health.

5 En una realización preferida, la invención engloba además el uso de dosis bajas de un régimen de tratamiento con quimioagentes. Por ejemplo, una dosis baja (por ejemplo, 6 a 60 mg/m²/día o menos) de docetaxel se administra a un paciente con cáncer. En otra realización, una dosis baja (por ejemplo, 10 a 135 mg/m²/día o menos) de paclitaxel se administra a un paciente con cáncer. En otra realización más, una dosis baja (por ejemplo, 2,5 a 25 mg/m²/día o menos) de fludarabina se administra a un paciente con cáncer. En otra realización más, una dosis baja (por ejemplo, 0,5 a 1,5 g/m²/día o menos) de citosina arabinósido (Ara-C) se administra a un paciente con cáncer.

10 En una realización, el quimioagente usado es cisplatino, por ejemplo, PLATINOL™ o PLATINOL-AQ™ (Bristol Myers) a una dosis en el intervalo de 5 a 10, 10 a 20, 20 a 40, ó 40 a 75 mg/m²/ciclo. En otra realización, una dosis de cisplatino en el intervalo de 7,5 a 75 mg/m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de ovario u otro cáncer. En otra realización, una dosis de cisplatino en el intervalo de 5 a 50 mg/m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de vejiga u otro cáncer.

15 En otra realización, el quimioagente usado es carboplatino, por ejemplo, PARAPLATIN™ (Bristol Myers) a una dosis en el intervalo de 2 a 4, 4 a 8, 8 a 16, 16 a 35 ó 35 a 75 mg/m²/ciclo. En otra realización, una dosis de carboplatino en el intervalo de 7,5 a 75 mg/m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de ovario u otro cáncer. En otra realización, una dosis de carboplatino en el intervalo de 5 a 50 mg/m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer de vejiga u otro cáncer. En otra realización, una dosis de carboplatino en el intervalo de 2 a 20 mg/m²/ciclo se administra a un paciente con cáncer testicular u otro cáncer.

20 En otra realización, el quimioagente usado es docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE™ (Rhône Poulenc Rorer) a una dosis en el intervalo de 6 a 10, 10 a 30 ó 30 a 60 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el quimioagente usado es paclitaxel, por ejemplo, TAXOL™ (Bristol Myers Squibb) a una dosis en el intervalo de 10 a 20, 20 a 40, 40 a 70 ó 70 a 135 mg/kgciclo.

En otra realización, el quimioagente usado es 5-fluorouracilo a una dosis en el intervalo de 0,5 a 5 mg/kgciclo.

25 En otra realización, el quimioagente usado es doxorubicina, por ejemplo, ADRIAMICINA™ (Pharmacia & Upjohn), DOCIL (Alza), RUBEX™ (Bristol Myers Squibb), a una dosis en el intervalo de 2 a 4, 4 a 8, 8 a 15, 15 a 30 ó 30 a 60 mg/kg/ciclo.

30 En otra realización, el régimen de tratamiento incluye uno o más agentes inmunoterapéuticos, tales como anticuerpos e inmunomoduladores, que incluyen, pero no están limitados a, HERCEPTIN®, RITUXAN®, OVAREX™, PANOREX®, BEC2, IMC-C225, VITAXIN™, CAMPATH® I/H, Smart M195, LYMPHOCIDE™, Smart I D10, y ONCOLYM™, rituximab, gemtuzumab o trastuzumab.

35 En otra realización, el régimen de tratamiento incluye uno o más agentes anti-angiogénicos, que incluyen, pero no están limitados a, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpina (Inhibidor de Serina Proteasa), anti-trombina, fragmentos proteolíticos de fibronectina de 29 kDa N.-terminal y 40 kDa C-terminal, fragmento proteolítico de prolactina de 16 kDa, fragmento proteolítico del factor de crecimiento de plaquetas 4 de 7,8 kDa, un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a un fragmento del factor de plaquetas 4 (Maione et al., 1990, *Cancer Res*, 51: 2077), un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento de colágeno I (Tolma et al., 1993, *J. Cell Biol.* 122: 497), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de Trombospondina I (Tolsma et al., 1993, *J. Cell Biol.* 122: 497), un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de SPARC (Sage et al., 1995, *J. Cell. Biochem.* 57: 1329-), o cualesquiera fragmentos, miembros de la familia o derivados de éstos, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de éstos.

40 También se han descrito otros péptidos que inhiben la angiogénesis y corresponden a fragmentos de laminina, fibronectina, procolágeno y EGF (véase la revisión de Cao, 1998, *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 20: 161). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales y pentapéptidos cíclicos, por ejemplo, VITAXIN™, que bloquean determinadas integrinas que unen proteínas RGD (es decir, poseen el resto peptídico Arg-Gly-Asp) tienen actividades de anti-vascularización (Brooks, et al., 1994, *Science* 264: 569; Hammes et al., 1996, *Nature Medicine* 2: 529).

45 Además la inhibición del receptor del activador del plasminógeno uroquinasa por antagonistas del receptor inhibe la angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis (Min et al., 1996, *Cancer Res.* 56: 2428-33; Crowley et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 5021). El uso de dichos agentes anti-angiogénicos también se contempla por la presente invención.

50 En otra realización, el régimen de tratamiento incluye radiación.

En otra realización, el régimen de tratamiento incluye la administración de una o más citoquinas, que incluye, pero no está limitado a, linfoquinas, factores de necrosis tumoral, citoquinas semejantes al factor de necrosis tumoral, linfotóxina-a, linfotóxina-b, interferón-a, interferón-b, proteínas inflamatorias de macrófagos, factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos, interleuquinas (incluyendo, pero sin limitarse a, interleuquina-1, interleuquina-2, interleuquina-6, interleuquina-12, interleuquina-15, interleuquina-18), OX40, ligandos CD27, CD30, CD40 o CD137, ligando Fas-Fas, 4-1BBL, proteína activadora de monocitos endotelial o cualesquiera fragmentos, miembros de la familia o derivados de éstos, incluyendo las sales farmacéuticamente aceptables de éstos.

En otra realización más, el régimen de tratamiento incluye tratamiento hormonal. Los tratamientos terapéuticos hormonales comprenden agonistas hormonales, antagonistas hormonales (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolido (LUPRON™), antagonistas LH-RH), inhibidores de la biosíntesis y procesamiento de hormonas, esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, deshidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógeno, testosterona, progestinas), antigestágenos (por ejemplo, mifepristona, onapristona) y antiandrógenos (por ejemplo, acetato de ciproterona).

En una realización, el régimen de tratamiento incluye la administración de al menos un agente terapéutico del cáncer, durante un ciclo de tratamiento corto a un paciente con cáncer para tratar el cáncer. La duración del tratamiento con el agente terapéutico del cáncer puede variar según el agente terapéutico del cáncer particular usado. La invención también contempla la administración discontinua o con dosis diarias divididas en varias administraciones parciales. Un tiempo de tratamiento apropiado para un agente terapéutico particular del cáncer será apreciado por el experto en la técnica y la invención contempla la evaluación continuada de los programas de tratamiento óptimos para cada agente terapéutico del cáncer.

La presente invención contempla al menos un ciclo, preferiblemente más de un ciclo durante el cual se lleva a cabo el régimen de tratamiento. Un periodo de tiempo apropiado para un ciclo será apreciado por el experto en la técnica, como lo será el número total de ciclos y el intervalo entre los ciclos. La invención contempla la evaluación continuada del régimen de tratamiento óptimo y del agente terapéutico de cáncer.

5.4.2. TERAPIA GÉNICA

Cualesquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede usarse según la presente invención. Los métodos ejemplares se describen a continuación.

Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véanse Golspiel *et al.*, 1993, *Clinical Pharmacy* 12: 488-505; Wu y Wu, 1991, *Biotherapy* 3: 87-95; Tolstoshev, 1993, *Anu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260: 926-932; y Morgan y Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 191-217; Mayo, 1993, *TIBTECH* 11(5): 155-215). Los métodos conocidos comúnmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en Ausubel *et al.* (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY; y en los Capítulos 12 y 13, Dracopoli *et al.* (eds.), 1994, *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY.

Se pueden usar moléculas antisentido y ribozimas que inhiben la expresión de oncogenes o genes que están regulados al alza en las células cancerosas como ácidos nucleicos terapéuticos según la invención para el tratamiento del cáncer. Las técnicas para la producción y uso de dichas moléculas son muy conocidos para los expertos en la técnica.

En una realización específica, ácidos nucleicos que comprenden una secuencia que codifica una molécula antisentido o ribozima que inhibe la expresión de oncogenes o genes que están regulados al alza en células cancerosas se administran para tratar el cáncer.

En un aspecto, el ácido nucleico terapéutico comprende un vector de expresión que expresa la molécula antisentido o ribozima (o fragmento de ésta) en un huésped adecuado. En particular, dicho ácido nucleico comprende un promotor, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específico de tejido.

La administración del ácido nucleico a un paciente puede ser directa, en cuyo caso el paciente se expone directamente al ácido nucleico o el vector que porta el ácido nucleico o un complejo de administración, o indirecta, en cuyo caso las células se transforman en primer lugar con el ácido nucleico *in vitro*, y se trasplantan al paciente. Estas dos estrategias son conocidas, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

En una realización específica, el ácido nucleico se administra directamente *in vivo*, donde se expresa para producir las moléculas antisentido o ribozimas. Esto puede conseguirse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de manera que se vuelve intracelular, por ejemplo, por infección usando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otro vector viral (véase la patente U.S. No. 4.980.286) o por inyección directa de ADN desnudo, o por el

5 uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes; Biolística, Dupont) o recubriendo con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, encapsulación en biopolímeros (por ejemplo, polisacárido poli- β -1- \rightarrow 4-N-acetilglucosamina; véase la Patente U.S. No. 5.635.493), encapsulación en liposomas, micropartículas, o microcápsulas, o administrándolo unido a un péptido que se sabe que entra en el núcleo, administrándolo unido a un receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432), etc. En otra realización puede formarse un complejo ácido nucleico-ligando en el que el ligando comprende un péptido viral fusogénico para interrumpir los endosomas, lo que permite que el ácido nucleico evite la degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico puede estar dirigido *in vivo* para una captación y expresión específicas de célula, dirigiendo a un receptor específico (véase, por ejemplo, Publicaciones PCT WO 92/06180 fechada el 16 de abril, 1992 (Wu et al.); WO 92/22635 fechada el 23 de diciembre, 1992 (Wilson et al.); WO 92/20316 fechada el 26 de noviembre, 1992 (Findeis et al.); WO 93/14188 fechada el 22 de julio, 1993 (Young). Alternativamente, el ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse en el ADN de la célula huésped para expresión por recombinación homóloga (Koller y Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342: 435-438).

15 Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes al epitelio respiratorio en el que causan una enfermedad suave. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Kozarsky y Wilson, 1993, *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 499-503 presenta una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout et al., 1994, *Human Gene Therapy* 5: 3-10 demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de monos rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en Rosenfeld et al., 1991, *Science* 252: 431-434; Rosenfeld et al., 1992, *Cell* 68: 143-155; y Mastrangeli et al., 1993, *J. Clin. Invest.* 91: 225-234. Los virus adeno-asociados (AAV) también se han propuesto para usarse en terapia génica (Walsh et al., 1993, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300).

25 Las estrategias antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (bien ADN o ARN) que son complementarios a un ARNm diana, por ejemplo, oncogenes, genes que están regulados al alza en las células cancerosas, tales como uPA o PAI-1. Los oligonucleótidos antisentido se unirán a los transcritos complementarios de ARNm del oncogén y evitarán la traducción. No se requiere la complementariedad absoluta, aunque se prefiere. Una secuencia "complementaria" a una parte de un ARN, como se refiere en la presente memoria, significa una secuencia que tiene la suficiente complementariedad como para ser capaz de hibridar con la parte no poli-A del ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido bicatenarios, una única cadena del dúplex de ADN puede ensayarse así o puede ensayarse la formación de tríplex. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico que hibrida, más emparejamientos erróneos de bases con un ARN puede contener y aún así forma un dúplex estable (o tríplex, como puede ser el caso). Un experto en la técnica puede establecer un grado tolerable de emparejamiento erróneo por el uso de procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

35 Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del mensajero, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta e incluyendo el codón de inicio AUG, deberían funcionar muy eficazmente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, también se ha mostrado que las secuencias complementarias a las secuencias no traducidas en 3' de los ARNm son eficaces en la inhibición de la traducción de los ARNm (Véase de manera general, Wagner, R., 1994, *Nature* 372: 333).

40 Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida en 5' del ARNm deberían incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a las regiones codificadoras del ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción pero podrían usarse según la invención. Los ácidos nucleicos antisentido deberían tener una longitud de al menos seis nucleótidos y son preferiblemente oligonucleótidos que tienen una longitud que varía de 6 a aproximadamente 50 nucleótidos. En aspectos específicos, el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

45 Independientemente de la elección de la secuencia diana, se prefiere que los estudios *in vitro* se realicen en primer lugar para cuantificar la capacidad del oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión génica. Se prefiere que estos estudios utilicen controles que distingan entre la inhibición génica antisentido y los efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También se prefiere que estos estudios comparen los niveles del ARN o proteína diana con los de un ARN o proteína control interno. Además, se prevé que los resultados obtenidos usando el oligonucleótido antisentido se comparen con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Se prefiere que el oligonucleótido control tenga aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido de ensayo y que la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido se diferencie de la secuencia antisentido no más de lo necesario para evitar hibridación específica con la secuencia diana.

Los oligonucleótidos que pueden usarse en conexión con el método de tratamiento pueden sintetizarse por métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, por el uso de un sintetizador de ADN automático (tal como los disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos fosforotioato por el método de Stein *et al.* (1988, *Nucl. Acids Res.* 16: 3209), pueden prepararse oligonucleótidos metilfosfonato por el uso de soportes de polímero de vidrio con poro controlado (Sarin *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 7448), etc.

Sin embargo, frecuentemente es difícil conseguir concentraciones intracelulares del antisentido suficientes para suprimir la traducción de los ARNm endógenos. Por lo tanto, una estrategia preferida utiliza una construcción de ADN recombinante en la que el oligonucleótido antisentido se pone bajo el control de un promotor fuerte pol III o pol II. El uso de dicha construcción para transfectar células diana en el paciente resultará en la transcripción de cantidades suficientes de ARN monocatenarios que formarán pares de bases complementarios con los transcritos del gen diana y de esta manera evitan la traducción del ARNm del gen diana. Por ejemplo, puede introducirse un vector *in vivo* de manera que sea captado por una célula y dirija la transcripción de un ARN antisentido. Dicho vector puede permanecer episomal o integrarse en los cromosomas, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Dichos vectores pueden construirse por métodos de tecnología de ADN recombinante estándar en la técnica. Los vectores pueden ser plasmídicos, virales u otros conocidos en la técnica, usados para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la secuencia que codifica el ARN antisentido puede ser por cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en células de mamífero, preferiblemente humanas. Dichos promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Dichos promotores incluyen pero no están limitados a: la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, 1981, *Nature* 290: 304), el promotor contenido en la repetición larga 3' terminal del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22: 787), el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1441), las secuencias reguladoras del gen de la metalotioneína (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296: 39), etc. Puede usarse cualquier tipo de vector de plásmido, cósmido, YAC o viral para preparar la construcción de ADN recombinante que puede introducirse directamente en el sitio del tejido. Alternativamente, pueden usarse vectores virales que infectan selectivamente el tejido deseado.

La dosis eficaz del oligonucleótido antisentido diana que se va a administrar durante un ciclo de tratamiento está en el intervalo de 0,01 a 0,1, 0,1 a 1 ó 1 a 10 mg/kg/día. La dosis del oligonucleótido antisentido diana que se va a administrar puede depender del modo de administración. Por ejemplo, la administración intravenosa de un oligonucleótido antisentido diana resultará probablemente en una dosis en cuerpo completo significativamente mayor que una dosis de cuerpo completo que resulta de un implante local que contiene una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido diana. En una realización, el oligonucleótido antisentido diana se administra subcutáneamente a una dosis de 0,01 a 10 mg/kg/día. En otra realización, el oligonucleótido antisentido diana se administra intravenosamente a una dosis de 0,01 a 10 mg/kg/día. En otra realización más, el oligonucleótido antisentido diana se administra localmente a una dosis de 0,01 a 10 mg/kg/día. Será evidente para un experto en la técnica que las administraciones locales pueden resultar en dosis corporales totales menores. Por ejemplo, los métodos de administración local tales como administración intratumoral, inyección intraocular, o implante, pueden producir concentraciones localmente altas del oligonucleótido antisentido diana, pero representan una dosis relativamente baja respecto al peso corporal total. Así, en dichos casos, la administración local del oligonucleótido antisentido diana se contempla para resultar en una dosis corporal total de aproximadamente 0,01 a 5 mg/kg/día.

En otra realización, una dosis particularmente alta del oligonucleótido antisentido diana, que está en el intervalo de aproximadamente 10 a 50 mg/kg/día, se administra durante un ciclo de tratamiento.

Además, la dosis eficaz de un oligonucleótido antisentido diana particular puede depender de factores adicionales, incluyendo el tipo de cáncer, el estadio del cáncer, la toxicidad del oligonucleótido, la velocidad de captación del oligonucleótido por las células cancerosas, así como el peso, la edad y la salud del individuo al que se va a administrar el oligonucleótido antisentido. Debido a que los numerosos factores presentes *in vivo* pueden interferir con la acción o actividad biológica del oligonucleótido antisentido diana, un experto en la técnica puede apreciar que una cantidad eficaz del oligonucleótido antisentido diana puede variar para cada individuo.

Una "dosis baja" o "dosis reducida" se refiere a una dosis que está por debajo del intervalo administrado normalmente, es decir, por debajo de la dosis estándar sugerida por Physicians's Desk Reference, 54 Edición (2000) o una referencia similar. Dicha dosis puede ser suficiente para inhibir la proliferación celular o demostrar efectos de mejora en un ser humano o demostrar eficacia con menos efectos secundarios comparado con los tratamientos estándar del cáncer. Los intervalos de dosis normales usados para agentes terapéuticos particulares y tratamientos estándar del cáncer empleados para enfermedades específicas pueden encontrarse en Physicians's Desk Reference, 54 Edición (2000) o en Cancer: Principles & Practice of Oncology, DeVita, Jr., Hellman y Rosenberg (eds.), 2ª edición, Philadelphia, PA: J.B. Lippincott Co., 1985.

Un "ciclo de tratamiento" o "ciclo" se refiere a un periodo durante el cual se administra un único terapéutico o secuencia de terapéuticos. En algunos casos, puede desearse un ciclo de tratamiento, tal como, por ejemplo, en el caso en el que se obtiene un efecto terapéutico significativo después de un ciclo de tratamiento. La presente invención contempla al menos un ciclo de tratamiento, generalmente preferiblemente más de un ciclo de tratamiento.

5 Otros factores que deben considerarse para determinar una dosis eficaz del oligonucleótido antisentido diana incluyen si el oligonucleótido se administrará en combinación con otros terapéuticos. En dichos casos, la toxicidad relativa de los otros terapéuticos puede indicar el uso del oligonucleótido antisentido diana a dosis bajas. Alternativamente, el tratamiento con una dosis alta del oligonucleótido antisentido diana puede resultar en terapias de combinación con dosis reducidas de los terapéuticos. En una realización específica, el tratamiento con una dosis particularmente alta del oligonucleótido antisentido diana puede resultar en terapias de combinación con dosis reducidas de manera importante de los terapéuticos del cáncer. Por ejemplo, el tratamiento de un paciente con 10, 20, 30, 40 ó 50 mg/kg/día del oligonucleótido antisentido diana puede incrementar más la sensibilidad de un sujeto a los terapéuticos del cáncer. En dichos casos, la dosis particularmente alta del oligonucleótido antisentido diana se combina, por ejemplo, con un programa de terapia con radiación mucho más corto. En otro ejemplo, la dosis particularmente alta del oligonucleótido antisentido diana produce un incremento significativo de la potencia de los agentes terapéuticos del cáncer.

En una realización, la terapia génica con células recombinantes que secretan interleuquina-2 se administra para prevenir o tratar el cáncer, particularmente el cáncer de mama (Véase, por ejemplo, Deshmukh et al., 2001, J. Neurosurg. 94: 287).

20 La invención contempla otros regímenes de tratamiento dependiendo del oligonucleótido antisentido diana particular que se va a usar, o dependiendo del modo particular de administración, o dependiendo de si el oligonucleótido antisentido diana se administra como parte de una terapia de combinación, por ejemplo, en combinación con un agente terapéutico del cáncer. La dosis diaria puede administrarse en uno o más tratamientos.

25 Las moléculas de ribozima que son complementarias a secuencias de ARN codificadas por un gen diana tal como un oncogén o genes que están regulados al alza en las células cancerosas pueden usarse para tratar cualquier cáncer, incluyendo el cáncer de mama.

30 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN (Para una revisión véase, por ejemplo, Rossi, J., 1994, *Current Biology* 4: 469). El mecanismo de la acción de las ribozimas implica una hibridación específica de secuencia o selectiva de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido de una escisión endonucleolítica. La composición de las moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias al ARNm del gen diana, y debe incluir la secuencia catalítica muy conocida responsable de la escisión del ARNm (Véase la Pat. U.S. No. 5.093.246). Como tales, las moléculas de ribozima útiles pueden ser moléculas de ribozima con resto de cabeza de martillo obtenidas por ingeniería que catalizan específicamente y eficazmente la escisión endonucleolítica de secuencias de ARN que codifican las proteínas del gen diana. Las moléculas de ribozima diseñadas para escindir catalíticamente los transcritos del ARNm diana también pueden usarse para evitar la traducción del ARNm diana y la expresión del gen o ruta génica diana. (Véase la Publicación Internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre, 1990; Sarver *et al.*, 1990, *Science* 247: 1222). Aunque pueden usarse las ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio para destruir ARNm dianas, se prefiere el uso de ribozimas cabeza de martillo. Las ribozimas cabeza de martillo escinden los ARNm en localizaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. El único requerimiento es que el ARNm diana tenga la secuencia siguiente de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo es muy conocida en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, 1988, *Nature* 334: 585. Preferiblemente, la ribozima se modifica por ingeniería de manera que el sitio de reconocimiento de la escisión está localizado cerca del extremo 5' del ARNm diana; es decir, para incrementar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales.

45 Como en la estrategia antisentido, las ribozimas pueden estar compuestas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo, para mejorar la estabilidad, direccionamiento, etc.) y deben administrarse a células que expresan el gen diana *in vivo*. Un método de administración preferido implica el uso de una construcción de ADN "que codifica" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte pol III o pol II, de manera que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir los mensajeros del gen diana endógenos e inhibirán la traducción. Como las ribozimas, a diferencia de la molécula antisentido, son catalíticas, se requiere una menor concentración intracelular para conseguir eficacia.

55 Los ARN, ADN, ribozima antisentido pueden prepararse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ADN y ARN. Éstas incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligodesoxiribonucleótidos y oligoribonucleótidos muy conocidas en la técnica tales como por ejemplo síntesis química con fosforamidita en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN pueden generarse por la transcripción *in vitro* e *in vivo* de secuencias de

ADN que codifican la molécula de ARN antisentido. Dichas secuencias de ADN pueden incorporarse en una amplia variedad de vectores que incorporan promotores de ARN polimerasa adecuados tales como los promotores de la polimerasa T7 o SP6. Alternativamente, pueden introducirse de manera estable construcciones de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido de manera constitutiva o inducible, dependiendo del promotor usado, en líneas celulares.

5 5.4.3. ANTICUERPOS TERAPÉUTICOS

Los anticuerpos que se unen específicamente a proteínas diana tales como oncogenes, genes que están regulados al alza en células cancerosas, incluyendo, por ejemplo, uPA y PAI-1, o antígenos de cáncer, pueden utilizarse para tratar el cáncer de mama. Dichos anticuerpos pueden generarse usando técnicas estándar descritas en la Sección 5.7.2, más adelante, frente a proteínas diana de longitud completa de tipo salvaje o mutantes, o frente a péptidos que corresponden a partes de las proteínas. Los anticuerpos incluyen pero no están limitados a policlonales, monoclonales, fragmentos Fab, anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos y sementejantes.

Los anticuerpos que reconocen cualquier epítipo en la proteína diana pueden usarse como terapia frente al cáncer.

Para proteínas diana que se expresan como proteínas intracelulares, se prefiere usar anticuerpos que se internalizan. Sin embargo, puede usarse lipofectina o liposomas para administrar el anticuerpo o un fragmento de la región Fab que se une al epítipo diana en las células. Cuando se usan fragmentos del anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une a la proteína diana. Por ejemplo, pueden usarse péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente al dominio de la región variable del anticuerpo que se une a una proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente o producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando métodos muy conocidos en la técnica (por ejemplo, véase Creighton, 1983, más arriba; y Sambrook *et al.*, 1989, más arriba). Alternativamente, también pueden administrarse anticuerpos de cadena única, tales como anticuerpos neutralizantes, que se unen a epítipos intracelulares. Dichos anticuerpos de cadena única pueden administrarse, por ejemplo, expresando secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos de cadena única en la población de células diana utilizando, por ejemplo, técnicas tales como las descritas en Marasco *et al.* (Marasco, *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889).

Por ejemplo, pero no como limitación, los cánceres y los tumores asociados con los antígenos de cáncer y de tumor siguientes pueden tratarse por administración de anticuerpos terapéuticos que reconocen estos antígenos de cáncer: antígeno KS 1/4 de pan-carcinoma (Perez y Walker, 1990, *J. Immunol.* 142: 3662-3667; Bumal, 1988, *Hybridoma* 7(4): 407-415), antígeno del carcinoma de ovario (CA125) (Yu *et al.*, 1991, *Cancer Res.* 51(2): 468-475), fosfato del ácido prostático (Tailor *et al.*, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18(16): 4928), antígeno específico de la próstata (Henttu y Vihko, 1989, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 160(2): 903-910; Israeli *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 227-230), antígeno asociado a melanoma p97 (Estin *et al.*, 1989, *J. Natl. Cancer Instit.* 81(6): 445-446), antígeno de melanoma gp75 (Vijayasardahl *et al.*, 1990, *J. Exp. Med.* 171(4): 1375-1380), antígeno de melanoma de alto peso molecular (HMW-MAA) (Natali *et al.*, 1987, *Cancer* 59: 55-63; Mittelman *et al.*, 1990, *J. Clin. Invest.* 86: 2136-2144), antígeno de la próstata específico de membrana, antígeno carcinoembrionario (CEA) (Foon *et al.*, 1994, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 13: 294), antígeno de mucina epitelial polimórfico, antígeno globular de la grasa de la leche humana, antígenos asociados a tumor colorrectal tales como: CEA, TAG-72 (Yokata *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 3402-3408), CO17-1A (Ragnhammar *et al.*, 1993, *Int. J. Cancer* 53: 751-758); GICA 19-9 (Herlyn *et al.*, 1982, *J. Clin. Immunol.* 2: 135), CTA-1 y LEA, antígeno del linfoma de Burkitt 38.13, CD19 (Ghetie *et al.*, 1994, *Blood* 83: 1329-1336), antígeno del linfoma B humano CD20 (Reff *et al.*, 1994, *Blood* 83: 435-445), CD33 (Sgouros *et al.*, 1993, *J. Nucl. Med.* 34: 422-430), antígenos específicos de melanoma tales como gangliósido GD2 (Saleh *et al.*, 1993, *J. Immunol.*, 151, 3390-3398), gangliósido GD3 (Shitara *et al.*, 1993, *Cancer Immunol. Immunother.* 36: 373-380), gangliósido GM2 (Livingston *et al.*, 1994, *J. Clin. Oncol.* 12: 1036-1044), gangliósido GM3 (Hoon *et al.*, 1993, *Cancer Res.* 53: 5244-5250), antígenos de la superficie celular específicos tumorales de tipo trasplante (TSTA) tal como antígenos tumorales inducidos por virus incluyendo virus tumorales ADN antígeno T y antígenos de cubierta de virus tumorales ARN, antígeno-alfa-fetoproteína oncofetal tal como CEA de colon, antígeno oncofetal de tumor de vejiga (Hellstrom *et al.*, 1985, *Cancer Res.* 45: 2210-2188), antígeno de diferenciación tal como antígeno de carcinoma de pulmón humano L6, L20 (Hellstrom *et al.*, 1986, *Cancer Res.* 46: 3917-3923), antígenos de fibrosarcoma, antígeno de leucemia de células T humana Gp37 (Bhattacharya-Chatterjee *et al.*, 1988, *J. of Immunospecificity.* 141: 1398-1403), neoglicoproteína, esfingolípidos, antígeno de cáncer de mama tal como EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), antígeno HER2 (p185^{HER2}), mucina epitelial polimórfica (PEM) (Hilkens *et al.*, 1992, *Trends in Bio. Chem. Sci.* 17: 359), antígeno de linfocitos humanos maligno APO-1 (Bernhard *et al.*, 1989, *Science* 245: 301-304), antígeno de diferenciación (Feizi, 1985, *Nature* 314: 53-57) tal como antígeno I encontrado en eritrocitos fetales, endodermo primario, antígeno I encontrado en eritrocitos adultos, embriones de preimplantación, I(Ma) encontrado en adenocarcinomas gástricos, M18, M39 encontrado en epitelio de mama, SSEA-1 encontrado en células mieloides, VE98, VE9, Myl, VIM-D5, D,56-22 encontrado en cáncer colorrectal, TRA-1-85 (grupo sanguíneo H), C14 encontrado en adenocarcinoma colónico, F3 encontrado en adenocarcinoma de pulmón, AH6 encontrado en cáncer gástrico, hapteno Y, Le^y encontrado en células de carcinoma embrionario, TL5 (grupo sanguíneo A), receptor de EGF encontrado en células A431, serie E₁ (grupo sanguíneo B) encontrado en cáncer pancreático, FC10.2 encontrado en células de carcinoma embrionario, antígeno de adenocarcinoma gástrico, CO-514 (grupo sanguíneo Le^a) encontrado en

Adenocarcinoma, NS-10 encontrado en adenocarcinomas, CO-43 (grupo sanguíneo Le^b), G49 encontrado en el receptor de EGF de células A431, MH2 (grupo sanguíneo AL^e/^b/Le^y) encontrado en adenocarcinoma colónico, 19.9 encontrado en cáncer de colon, mucinas de cáncer gástrico, T₅A₇ encontrado en células mieloides, R₂₄ encontrado en melanoma, 4.2, G_{D3}, D1.1, OFA-1, G_{M2}, OFA-2, G_{D2} y M1:22:25:8 encontrado en células de carcinoma embrionario, y SSEA-3 y SSEA-4 encontrados en embriones de estadio 4 a 8 células. En una realización, el antígeno es un péptido derivado de un receptor de las células T de un Linfoma de Células T Cutáneo (véase, Edelson, 1998, *The Cancer Journal* 4:62).

El sujeto que se está tratando con un tratamiento de cáncer puede, opcionalmente, ser tratado con otros tratamiento de cáncer tales como terapia con radiación o quimioterapia. En particular, el régimen de tratamiento que puede usarse en la presente invención puede administrarse conjuntamente con uno o una combinación de agentes quimioterapéuticos como se ha descrito anteriormente.

Los anticuerpos que están conjugados con un agente citostático y/o citotóxico pueden usarse en el tratamiento del cáncer. Una clase útil de agentes citotóxicos o citostáticos para llevar a la práctica los regímenes terapéuticos de la presente invención, por conjugación con un anticuerpo, incluyen, pero no están limitados a, las clases de agentes no mutuamente exclusivas siguientes: agentes alquilantes, antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, agentes antitubulina, auristatinas, sensibilizantes de quimioterapia, que se unen al surco menor del ADN, inhibidores de la replicación del ADN, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, lexitropsinas, nitrosoureas, platinoles, antimetabolitos de purina, puromicinas, sensibilizantes de la radiación, esteroides, toxina ricina, radionúclidos, taxanos, inhibidores de topoisomerasa y alcaloides de vinca o cualquier otro agente eficaz para matar y parar el crecimiento de las células cancerosas o tumorales.

En un tratamiento de cáncer preferido, el agente citotóxico o citostático que se une a un anticuerpo terapéutico es un antimetabolito. El antimetabolito puede ser un antagonista de purina (por ejemplo, azotioprina) o micofenolato mofetil, un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (por ejemplo, metotrexato), aciclovir, gangciclovir, zidovudina, vidarabina, ribavarina, azidotimidina, citidina arabinósido, amantadina, didesoxiuridina, yododesoxiuridina, poscarnet y trifluridina.

Las técnicas para conjugar dichos restos terapéuticos a proteínas, y en particular a anticuerpos, son muy conocidos, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), p. 243-56 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson *et al.*, (eds.), p. 623-53 (Marcel Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), p. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), p. 303-16 (Academic Press 1985) y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62: 119-58.

5.4.4. TERAPIA CON VACUNAS

El régimen de tratamiento también puede incluir la administración de vacunas a un sujeto que estimulan eficazmente una respuesta inmune frente a antígenos cancerosos tales como los listados en la Sección 5.4.3. La invención contempla así el uso de un régimen de tratamiento de vacunación de un sujeto frente al cáncer en el que dicho sujeto presenta riesgo de una recurrencia de cáncer de mama.

Pueden usarse muchos métodos para introducir las formulaciones de vacunas, éstos incluyen pero no están limitados a la ruta intranasal, intratraqueal, oral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea. Pueden usarse varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica e incluyen pero no están limitados a, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son muy conocidos en la técnica.

En una realización, el régimen de tratamiento para carcinoma metastásico incluye terapia génica *ex vivo* o "vacuna de cáncer". Las células cancerosas se aíslan de pacientes, se transducen con varios vectores de genes y se expanden *in vitro*. Después de irradiación, las células se transplantan autólogamente para incrementar la respuesta inmune del paciente frente al tumor.

Otro régimen de tratamiento que puede usarse incluye inmunización genética. La inmunización genética es particularmente ventajosa ya que estimula una respuesta de células T citotóxicas pero no utiliza vacunas vivas atenuadas, que pueden revertir a una forma virulenta e infectar al huésped causando complicaciones de la infección. Tal y como se usa en la presente memoria, la inmunización genética comprende insertar los nucleótidos de un gen diana, tal como un oncogén, o cualquier antígeno listado en la Sección 5.4.3, en un huésped, de manera que los nucleótidos sean captados por las células del huésped y las proteínas codificadas por los nucleótidos se traduzcan. Estas proteínas traducidas se secretan o se procesan por la célula del huésped para su presentación a las células inmunes y se estimula

una reacción inmune. Preferiblemente, la reacción inmune es una respuesta de células T citotóxicas, sin embargo, una respuesta humoral o estimulación de macrófagos también es útil para prevenir el crecimiento tumoral inicial o adicional y las metástasis o la diseminación del cáncer. El experto en la técnica apreciará que hay varios métodos para introducir nucleótidos extraños en un animal huésped y posteriormente en las células para la inmunización genética, por ejemplo, por inyección intramuscular de aproximadamente 50 mg de ADN plasmídico que codifica las proteínas de un oncogén solubilizado en 50 ml de disolución salina estéril, con un adyuvante adecuado (Véase, por ejemplo, Weiner y Kennedy, 1999, *Scientific American* 7: 50-57; Lowrie et al., 1999, *Nature* 400: 269-271).

El régimen de tratamiento que puede usarse incluye una formulación de vacuna que comprende una cantidad inmunogénica de un producto de oncogén.

5.5. DOSIS EFICAZ

La toxicidad y eficacia terapéutica de los compuestos puede determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos altos. Aunque los compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos pueden usarse, debe tenerse cuidado para diseñar un sistema de administración que dirija dichos compuestos al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no afectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios.

Los datos obtenidos a partir de ensayos con cultivos celulares y estudios en animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en los seres humanos. La dosificación de dichos compuestos está preferiblemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier compuesto usado en el método de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de los ensayos de cultivo celular. Una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración plasmática circulante que incluye la CI_{50} (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición mitad de la máxima de los síntomas) según se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar más precisamente las dosis útiles en los seres humanos. Los niveles en el plasma pueden medirse por cualquier técnica conocida en la técnica, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

Además, los datos obtenidos a partir de pacientes después de la administración de un régimen de tratamiento y su impacto en la supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia global en una población comparable pueden usarse para determinar la dosis eficaz de un determinado régimen de tratamiento.

5.6. MONITORIZACIÓN DEL EFECTO DE UN TRATAMIENTO TERAPÉUTICO

La presente solicitud también describe un método para monitorizar el efecto de un régimen de tratamiento terapéutico seleccionado en un paciente con cáncer durante y después del tratamiento.

Los médicos necesitan en gran medida un procedimiento que pueda usarse para monitorizar la eficacia de los tratamientos de cáncer. Los polipéptidos y/o transcritos uPA y PAI-1, otros indicadores o marcadores que son detectables en los pacientes con cáncer, y particularmente en pacientes con cáncer de mama, pueden usarse para medir la regresión de la enfermedad en pacientes con cáncer de mama. Los tratamientos terapéuticos que pueden evaluarse incluyen pero no están limitados a radioterapia, cirugía, quimioterapia, administración de vacunas, terapia endocrina, inmunoterapia y terapia génica, etc. Los regímenes quimioterapéuticos incluyen, pero no están limitados a, la administración de fármacos tales como, por ejemplo, metotrexato, fluorouracilo, ciclofosfamida, doxorubicina y taxol. Los regímenes terapéuticos endocrinos incluyen, pero no están limitados a, la administración de tamoxifeno, progestinas, etc. Una descripción más detallada de los métodos de tratamiento se discute más adelante en la sección 5.4.

El método comprende medir a intervalos de tiempo adecuados antes, durante o después de la terapia, la cantidad de transcritos o polipéptidos uPA y PAI-1 u otros indicadores o marcadores que son detectables en los pacientes con cáncer. Cualquier cambio o ausencia de cambio en las cantidades absolutas o relativas de los productos génicos uPA y PAI-1, u otros indicadores o marcadores que son detectables en los pacientes con cáncer puede medirse y correlacionarse con el efecto del tratamiento en el sujeto.

En un aspecto preferido, la estrategia que puede tomarse es determinar los niveles del polipéptido uPA y PAI-1 a diferentes puntos de tiempo para comparar estos valores con un nivel de línea base. El nivel de línea base puede ser el nivel de los polipéptidos uPA y PAI-1 presente en individuos sin enfermedad, normales; y/o los niveles presentes antes del tratamiento, o durante la remisión de la enfermedad, o durante periodos de estabilidad. Estos niveles pueden correlacionarse con el curso de la enfermedad o el resultado del tratamiento.

Otros métodos para detectar, monitorizar y obtener imágenes del cáncer que pueden usarse se discuten en la Sección 5.7.6 más adelante.

5.7. ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO DE TIPO UROQUINASA (UPA) E INHIBIDOR DEL ACTIVADOR DEL PLASMINÓGENO TIPO 1 (PAI-1)

5 Los métodos de la presente invención comprenden medir las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas uPA y PAI-1 o sus variantes naturales en sujetos. Según los niveles de uPA y PAI-1, los sujetos se dividen en grupos de alto o de bajo riesgo de recaída de cáncer. Se implementan diferentes regímenes de tratamiento para los sujetos que pertenecen a estos dos grupos. La Figura 1A muestra el ADNc de longitud completa de uPA (1.296 pb) (SEQ ID NO: 1) con su secuencia de aminoácidos (431 a.a.) (SEQ ID NO: 2). La Figura 2A muestra la región codificadora de PAI-1
10 (1.209 pb) (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de aminoácidos (402 a.a.) (SEQ ID NO: 4) que codifica.

Una molécula de ácido nucleico incluye moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc, ADN genómico), moléculas de ARN (por ejemplo, ARNhn, pre-ARNm, ARNm) y análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos.

15 La invención incluye el uso de fragmentos o derivados de cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente memoria. En varias realizaciones, un fragmento o derivado comprende 10, 20, 50, 100 ó 200 nucleótidos, o múltiples fragmentos de éste, que son complementarios a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, o que su complemento codifica todo o un fragmento de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. En realizaciones alternativas, un ácido nucleico tiene un tamaño de no más de 300, 1.000, 2.000, 5.000, 7.500 ó 10.000 nucleótidos.

20 Las moléculas de ácido nucleico que pueden usarse en la presente invención incluyen pero no están limitadas a los ácidos nucleicos que son complementarios a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3; un ácido nucleico que comprende una secuencia que puede hibridar, bajo condiciones astringentes como se ha descrito anteriormente, con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3; o complementaria a un ácido nucleico al menos 90% homólogo a SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 (por ejemplo, como se determina usando el algoritmo NBLAST con parámetros por defecto).

25 Los métodos de la invención comprenden medir los productos génicos uPA y PAI-1 en una muestra obtenida de un sujeto. Pueden medirse los niveles de los productos génicos uPA y PAI-1 naturales, incluyendo, pero sin limitarse a los productos génicos uPA y PAI-1 de tipo salvaje así como mutantes, variantes alélicas, variantes de corte y empalme, variantes polimórficas, etc. Pueden usarse moléculas de ácido nucleico aisladas como sondas para medir las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína o polipéptido variante. Dichos mutantes y variantes son altamente homólogos a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, por ejemplo, al menos 90% homólogos y/o pueden hibridar bajo
30 condiciones de alta astringencia. En realizaciones específicas, los mutantes y variantes que se están midiendo comprenden no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 mutaciones puntuales (sustituciones) comparados con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3.

5.7.1. PROTEÍNAS UPA Y PAI-1 PARA LA GENERACIÓN DE ANTICUERPOS

35 Los anticuerpos que se generan frente a uPA y PAI-1, o fragmento peptídicos de éstas, pueden usarse para medir los niveles de UPA y PAI-1 en un sujeto.

La FIG. 1B muestra la secuencia de aminoácidos de uPA (SEQ ID NO: 2) y la Figura 2B muestra la secuencia de aminoácidos de PAI-1 (SEQ ID NO: 4). Las proteínas uPA y PAI-1 y derivados que pueden usarse para generar anticuerpos usados en la presente invención incluyen, pero no están limitados a, proteínas (y otras moléculas) que comprenden SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, proteínas que comprenden una secuencia codificada por un ácido nucleico que puede hibridar con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 bajo condiciones de alta astringencia, y proteínas codificadas por un ácido nucleico al menos 90% homólogo a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, por ejemplo, como se determina usando el algoritmo NBLAST. Debido a la degeneración de las secuencias de nucleótidos codificadoras, pueden usarse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos como un gen o ADNc componente. Los derivados de una proteína que pueden usarse para generar anticuerpos usados en la invención
40 incluyen, pero no están limitados a, los que contienen una secuencia de aminoácidos, toda o parte de la secuencia de aminoácidos de la proteína uPA o PAI-1, incluyendo secuencias alteradas en las que restos de aminoácidos funcionalmente equivalentes se sustituyen por restos en la secuencia lo que resulta en un cambio silencioso. Por ejemplo, uno o más restos de aminoácidos en la secuencia pueden sustituirse por otro aminoácido con una polaridad similar (una "sustitución de aminoácidos conservativa") que actúa como un equivalente funcional, lo que resulta en una alteración silenciosa. Los sustitutos para un aminoácido en la secuencia pueden seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. Los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.
50

Los derivados de uPA y PAI-1 pueden incluir proteínas que tienen sustituciones de aminoácidos conservativas y/o que presentan una actividad funcional de los productos génicos uPA y PAI-1. Dichos derivados pueden contener deleciones, adiciones o sustituciones de restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias génicas uPA y PAI-1 descritas, más adelante en la Sección 5.7, pero que resultan en un cambio silencioso, produciendo así un equivalente funcional de los productos génicos uPA y PAI-1.

Las secuencias de los productos génicos uPA y PAI-1 comprenden preferiblemente una secuencia de aminoácidos que presenta al menos 90% de similitud de secuencia con uPA y PAI-1.

Las proteínas que comprenden al menos 10, 20, 30, 40 ó 50 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, o al menos 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100 ó 200 aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 pueden usarse para generar anticuerpos para usarse en la presente invención. Estas proteínas son capaces de presentar una o más actividades funcionales conocidas asociadas con las proteínas de longitud completa (tipo salvaje) uPA o PAI-1. Dichas actividades funcionales incluyen pero no están limitadas a, antigenicidad, capacidad de unirse a su anticuerpo e inmunogenicidad (capacidad para generar anticuerpos).

5.7.2. ANTICUERPOS FRENTE A LOS PRODUCTOS GÉNICOS uPA Y PAI-1

Los métodos de la presente invención engloban el uso de anticuerpos o fragmentos de éstos capaces de reconocer específicamente o selectivamente uno o más epítomos de los productos génicos uPA o PAI-1 o epítomos de variantes conservadas. Dichos anticuerpos pueden incluir, pero no están limitados a, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (mAb), anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id) y fragmentos de unión a epítomos de cualquiera de los anteriores. Dichos anticuerpos pueden usarse para medir el nivel del producto génico uPA o PAI-1 en una muestra biológica de un paciente. Los anticuerpos también pueden incluirse como un reactivo en un kit para usarse en un método de la presente invención.

En una realización específica, como se describe adicionalmente en la Sección 5.4.3, los anticuerpos generados frente a fragmentos, derivados y análogos de uPA y PAI-1 pueden usarse para tratar el cáncer.

En la presente memoria se describen métodos para la producción de anticuerpos o fragmentos de éstos. Cualquiera de dichos anticuerpos o fragmentos de éstos pueden producirse por métodos inmunológicos estándar o por la expresión recombinante de moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo o fragmentos de éste en un organismo huésped apropiado.

Para la producción de anticuerpos frente al producto génico uPA o PAI-1, pueden inmunizarse varios animales huésped por inyección con un producto génico uPA o PAI-1, o una parte de éste. Dichos animales huésped pueden incluir pero no están limitados a conejos, ratones y ratas por nombrar sólo unos pocos. Pueden usarse varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie de huésped, incluyendo pero sin limitarse a Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo obtenidas del suero de animales inmunizados con un antígeno, tal como el producto génico uPA o PAI-1, o un derivado antigénico funcional de éste. Para la producción de anticuerpos policlonales, pueden inmunizarse animales huésped tales como los descritos anteriormente por inyección con el producto génico uPA o PAI-1 suplementado con adyuvantes también como se ha descrito anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de anticuerpos frente a un antígeno particular, pueden obtenerse por cualquier técnica que proporciona la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen pero no están limitadas a, la técnica de hibridoma de Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256: 495; y la Patente de U.S. No. 4.376.110), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kosbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4: 72; Cole *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026) y la técnica de hibridoma EBV (Cole *et al.*, 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., p. 77). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de éstas. Los hibridomas que producen el mAb de esta invención pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo*. La producción de altas titulaciones de mAb *in vivo* hace de éste el método de producción preferido actualmente.

Pueden usarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, 6851-6855; Neuberger *et al.*, 1984, *Nature* 312, 604-608; Takeda *et al.*, 1985, *Nature* 314, 452-454) por corte y empalme de los genes de una molécula de anticuerpo de ratón con la especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana con una actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico

es una molécula en la que diferentes partes se obtienen de diferentes especies de animales, tales como los que tienen una región variable obtenida de un mAb murino y una región constante de una inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., Patente U.S. No. 4.816.567; y Boss et al., Patente U.S. No. 5.816.397). La invención contempla así anticuerpos quiméricos que son específicos o selectivos para el producto génico uPA o PAI-1.

5 Los ejemplos de técnicas que se han desarrollado para la producción de anticuerpos humanizados son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Queen, Patente U.S. No. 5.585.089 y Winter, Patente U.S. No. 5.225.539). Una región variable de cadena ligera o pesada de una inmunoglobulina consiste en una región "marco" interrumpida por tres regiones hipervariables, referidas como regiones determinantes de la complementariedad (CDR). La magnitud de la región marco y de las CDR se ha definido con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. et al., U.S. Department of Health and Human Services (1983). Brevemente, los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que tienen una o más CDR de la especie no humana y regiones marco de una molécula de inmunoglobulina humana. La invención incluye el uso de anticuerpos humanizados que son específicos o selectivos para el producto génico uPA o PAI-1 en los métodos de la invención.

15 La tecnología de exposición en fago puede usarse para incrementar la afinidad de un anticuerpo frente al producto génico uPA o PAI-1. Esta técnica será útil para obtener anticuerpos con alta afinidad frente al producto génico uPA o PAI-1 usado en el método de la presente invención. La tecnología, referida como maduración por afinidad, emplea mutagénesis o paseo de CDR y re-selección usando como antígeno el producto génico uPA o PAI-1 para identificar a los anticuerpos que se unen con mayor afinidad al antígeno cuando se compara con el anticuerpo inicial o parental (véase, por ejemplo, Glaser et al., 1992, *J. Immunology* 149: 3903). La mutagenización de codones completos en lugar de nucleótidos únicos resulta en un repertorio semi-aleatorizado de mutaciones de aminoácidos. Pueden construirse bibliotecas que consisten en un conjunto de clones variantes cada uno de los cuales se diferencia por una única alteración de aminoácidos en una única CDR y que contiene variantes que representan cada sustitución de aminoácido posible para cada resto CDR. Los mutantes con una afinidad de unión incrementada para el antígeno pueden cribarse poniendo en contacto los mutantes inmovilizados con antígeno marcado. Puede usarse cualquier método de cribado conocido en la técnica para identificar a los anticuerpos mutantes con una avidez incrementada por el antígeno (por ejemplo, ELISA) (Véase Wu et al., 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6037; Yelton et al., 1995, *J. Immunology* 155: 1994). También es posible el paseo de CDR que aleatoriza la cadena ligera (Véase Schier et al., 1996, *J. Mol. Bio.* 263: 551).

30 Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena única (Patente U.S. 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242: 423; Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879; y Ward et al., 1989, *Nature* 334: 544) pueden adaptarse para producir anticuerpos de cadena única frente al producto génico uPA o PAI-1. Los anticuerpos de cadena única se forman uniendo los fragmentos de la cadena pesada y ligera a la región Fv mediante un puente de aminoácidos, lo que resulta en un polipéptido de cadena única. También pueden usarse las técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., *Science* 242: 1038).

35 Como se discute en la Sección 5.4.3, los métodos de terapia incluyen usar un anticuerpo frente a un polipéptido, péptido u otro derivado de uPA o PAI-1 o análogo de éstos, que es un anticuerpo biespecífico (véase generalmente, por ejemplo, Fanger y Drakeman, 1995, *Drug News and Perspectives* 8: 133-137) para tratar cáncer en un sujeto que expresa niveles elevados del producto génico uPA o PAI-1. Un anticuerpo biespecífico se obtiene por ingeniería genética para reconocer tanto (1) un epítipo como (2) una de una variedad de moléculas "desencadenantes", por ejemplo, receptores Fc en células mieloides, y CD3 y CD2 en células T, que se ha identificado que son capaces de causar que una célula T citotóxica destruya una diana particular. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden prepararse por conjugación química, hibridoma o técnicas de biología molecular recombinante conocidas para el experto en la técnica.

45 Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen pero no están limitados a: los fragmentos F(ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., 1989, *Science* 246: 1275-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

5.7.3. MEDICIÓN DE LOS PRODUCTOS GÉNICOS uPA Y PAI-1

50 Los métodos descritos en la presente memoria pueden realizarse, por ejemplo, utilizando kits de ensayo diagnóstico pre-ensavados que comprenden al menos un ácido nucleico específico del gen uPA y PAI-1 o anticuerpos anti-uPA y anti-PAI-1, que pueden usarse convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos o en entornos caseros, para medir los niveles de uPA y PAI-1 de pacientes y para cribar e identificar a aquellos individuos que pertenecen a un grupo de alto riesgo para un régimen de tratamiento y a aquellos que pertenecen a un grupo de bajo riesgo para otro régimen de tratamiento.

Las técnicas de detección basadas en ácidos nucleicos se describen, más adelante, en la Sección 5.7.4. Las técnicas de detección de péptidos se describen, más adelante, en la Sección 5.7.5.

5.7.4. MEDICIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO uPA Y PAI-1

5 La invención se refiere a métodos para determinar un régimen de tratamiento para un sujeto midiendo cuantitativamente los niveles de uPA y PAI-1 en un sujeto. La medición cuantitativa puede incluir medir la cantidad exacta de uPA o PAI-1 en una muestra o la cantidad relativa de uPA o PAI-1 en una muestra comparada con un estándar. Tomando como base los valores, pueden hacerse predicciones respecto a la supervivencia sin enfermedad y/o supervivencia global para un paciente con o sin un tratamiento particular. Usando esta información, puede determinarse un régimen de tratamiento para el sujeto.

10 El sujeto de alto riesgo se identifica por niveles altos tanto de uPA como de PAI-1, nivel alto de uPA y nivel bajo de PAI-1 o nivel bajo de uPA y nivel alto de PAI-1. En una realización, los niveles de uPA y PAI-1 pueden medirse en el fluido corporal de un sujeto. Pueden usarse técnicas muy conocidas en la técnica, por ejemplo, RT PCR cuantitativa o transferencia Northern para medir los niveles de uPA y PAI-1 en un sujeto. Castello et al., 2002, *Clinical Chemistry* 48(8): 1228-1295; Spyrtos et al., 2002, *Anticancer Res.* 22(5) 2997-3003; Noack et al., 1999, *Int. J. Oncol.* 15(4): 617-23; y Luther et al., 2003, *Throm. and Hemst* (En prensa). Los métodos que describen mediciones cuantitativas de los niveles de uPA y PAI-1 en un sujeto se describen con detalle en los ejemplos siguientes. La medición de los niveles de uPA y PAI-1 puede incluir medir transcritos naturales de uPA y PAI-1 y variantes de éstos.

20 Un nivel alto de uPA se define como por encima de 3 ng uPA/mg de proteína en extractos de tejido tumoral primario medido por ELISA. Un nivel alto de PAI-1 se define como por encima de 14 ng PAI-1/mg de proteína. Un experto en la técnica puede determinar si un sujeto tiene un nivel alto de uPA o de PAI-1 en cualquier método de ensayo comparando una muestra de ensayo con una muestra estándar con niveles de uPA y PAI-1 conocidos, tal como, en los valores de corte respectivos de uPA y PAI-1. Dicha comparación pone una muestra de ensayo por debajo, igual a o por encima de los valores de corte. Por lo tanto, los niveles de uPA o PAI-1 pueden estandarizarse en diferentes sistemas de ensayo.

25 Las opciones de tratamiento para sujetos de alto riesgo incluyen, pero no están limitadas a, quimioterapia CMF adyuvante, quimioterapia no CMF adyuvante, terapia endocrina adyuvante, quimioterapia con adriamicina adyuvante, terapia con radiación y terapia génica. Otras opciones de tratamiento para sujetos de alto riesgo pueden incluir terapias como las que se discuten en la Sección 5.4.

30 Las opciones de tratamiento para sujetos de bajo riesgo incluyen, pero no están limitadas a, no tratamiento y terapia con tamoxifeno. Otras opciones de tratamiento para sujetos de bajo riesgo pueden incluir terapias como las que se discuten en la Sección 5.4.

En otro ejemplo, el ARN de un tipo celular o tejido conocido, para expresar el gen uPA y PAI-1, tal como células de cáncer de mama, u otros tipos de células cancerosas, incluyendo metástasis, puede aislarse y ensayarse utilizando técnicas de hibridación o de PCR como se ha descrito anteriormente. Las células aisladas pueden obtenerse de cultivo celular o de un paciente.

35 En una realización, una molécula de ADNc se sintetiza a partir de una molécula de ARN de interés por transcripción inversa. Todo o parte del ADNc resultante se usa como el molde para una reacción de amplificación de ácido nucleico, tal como PCR o semejantes. Los reactivos de ácido nucleico usados como reactivos iniciadores de la síntesis (por ejemplo, cebadores) en la transcripción inversa y las etapas de amplificación del ácido nucleico de este método se eligen de entre los ácidos nucleicos de los genes uPA y PAI-1 descritos en la Sección 5.7. Las longitudes preferidas de dichos ácidos nucleicos son al menos 9-30 nucleótidos.

40 Las técnicas de amplificación por RT-PCR pueden utilizarse para medir cuantitativamente los niveles de los transcritos de uPA y PAI-1 en un sujeto. Los niveles de uPA y PAI-1 en una muestra de ensayo de un sujeto pueden calibrarse frente a los niveles de uPA y PAI-1 en sujetos estándar con niveles conocidos de uPA y PAI-1. Un experto en la técnica puede estandarizar los niveles de uPA y PAI-1 en varios métodos de ensayo para determinar si el sujeto de ensayo está dentro del grupo de alto riesgo o del grupo de bajo riesgo.

45 Como una alternativa a las técnicas de amplificación, puede realizarse análisis Northern estándar. La longitud preferida de una sonda usada en análisis Northern es 9-50 nucleótidos. Utilizando dichas técnicas, también puede determinarse la medición cuantitativa de los transcritos de uPA y PAI-1.

50 Adicionalmente, es posible medir los niveles de uPA y PAI-1 usando ensayos *in situ*, es decir, directamente en secciones de tejido (fijadas y/o congeladas, por ejemplo, secciones de parafina) de tejido del paciente obtenido de biopsias o resecciones (por ejemplo, micro-dissección con láser de células únicas) de manera que no es necesaria una purificación del ácido nucleico. Noack et al., 1999, *Int. J. Oncol.* 15(4): 617-23. Los reactivos de ácido nucleico tales como los

descritos en la Sección 5.7 pueden usarse como sondas y/o cebadores para dichos procedimientos *in situ* (véase, por ejemplo, Nuovo, G.J., 1992, *PCR In Situ Hybridization: Protocols And Applications*, Raven Press, NY).

5.7.5. MEDICIÓN DE LAS PROTEÍNAS uPA Y PAI-1

5 Los anticuerpos dirigidos frente a uPA y PAI-1 naturales y variantes naturales de éstas que se han discutido anteriormente en la Sección 5.7.1, pueden usarse en inmunoensayos de uPA y PAI-1.

10 El tipo de tejido o célula que se va a analizar incluirá generalmente aquellos que se sabe que expresan el gen uPA y PAI-1, tal como, por ejemplo, células cancerosas incluyendo células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario, células de cáncer linfóide y formas metastásicas de éstas. Preferiblemente, tumor de cáncer de mama primario escindido. Los métodos de aislamiento de proteínas empleados en la presente memoria pueden ser, por ejemplo, como los descritos en Harlow y Lane (Harlow, E. y Lane, D., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).

15 Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos, tales como los descritos anteriormente en la Sección 5.7.2, para medir cuantitativamente los polipéptidos uPA y PAI-1 o variantes naturales de éstos. Los anticuerpos (o fragmentos de éstos) útiles en la presente invención pueden emplearse, adicionalmente, histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica, para la detección y cuantificación *in situ* de los productos génicos uPA y PAI-1 o variantes conservadas de éstos. La detección y cuantificación *in situ* pueden conseguirse extrayendo un espécimen histológico de un sujeto, tal como secciones de tejido incluidas en parafina, por ejemplo tejidos de mama y aplicando a éste un anticuerpo marcado de la presente invención. Los niveles de uPA y PAI-1 pueden medirse cuantitativamente contando el número de granos de marcaje usados en las secciones. El anticuerpo (o fragmento) se aplica preferiblemente superponiendo el anticuerpo (o fragmento) marcado en una muestra biológica.

20 Los inmunoensayos para polipéptidos o variantes conservadas de éstos comprenderán típicamente poner en contacto una muestra, tal como un fluido biológico, tejido o un extracto de tejido, células recién recogidas o lisados de células que se han incubado en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo que se une específicamente o selectivamente al producto génico uPA y PAI-1, por ejemplo, un anticuerpo marcado de manera detectable capaz de identificar los polipéptidos uPA y PAI-1 o las variantes conservadas de éstos, y detectar el anticuerpo unido por cualquiera de varias técnicas muy conocidas en la técnica (por ejemplo, transferencia Western, ELISA, FACS).

30 En una realización específica, los niveles de uPA y PAI-1 pueden medirse por los niveles de antígeno de los analitos en extractos de tejido tumoral primario. En una realización preferida, los niveles de uPA y PAI-1 se miden por cualquier método de ensayo. En una realización específica, un nivel alto de uPA corresponde a niveles por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 55 y no más de aproximadamente el percentil 75 del nivel de uPA normalizado para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo. En una realización específica, un nivel alto de PAI-1 corresponde a niveles de PAI-1 por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente el percentil 61 y no más de aproximadamente el percentil 81 de niveles de PAI-1 normalizados para un grupo aleatorizado de pacientes usando cualquier ensayo.

35 Los niveles de uPA y PAI-1 también pueden medirse por los niveles de antígeno de analitos en extractos de tejido tumoral primario (no parte de la invención reivindicada). Preferiblemente, los niveles de uPA y PAI-1 se miden por ELISA. Un nivel alto de uPA puede definirse como por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente 2,4 ng/mg de proteína y no más de 4 ng/uPA/mg de proteína. De manera similar, un nivel alto de uPA puede definirse como un valor de corte por encima de 3 ng/uPA/mg de proteína. Específicamente, un nivel alto de PAI-1 se define como por encima de un valor de corte de al menos aproximadamente 11 ng/mg de proteína y no más de 19 ng PAI-1/mg de proteína. Preferiblemente, un nivel alto de PAI-1 se define como por encima de un valor de corte de 14 ng PAI-1/mg de proteína.

45 La muestra biológica puede ponerse en contacto con e inmovilizarse en un soporte o vehículo de fase sólida tal como nitrocelulosa u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte puede lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de manera detectable que se une selectivamente o específicamente a los polipéptidos uPA y PAI-1. El soporte de fase sólida puede lavarse con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de marcaje unida al soporte sólido puede detectarse por medios convencionales.

50 Por "soporte o vehículo en fase sólida" se pretende cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Los soportes o vehículos muy conocidos incluyen vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nilon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, gabros y magnetita. La naturaleza del vehículo puede ser soluble en algún grado o insoluble para los propósitos de la presente invención. El material del soporte puede tener virtualmente cualquier configuración estructural posible siempre que la molécula acoplada sea capaz de unirse a un antígeno o anticuerpo. Así, la configuración del soporte puede ser esférica, como en un lecho, o cilíndrica, como en la superficie interior de un tubo de ensayo, o la superficie externa de una varilla. Alternativamente, la superficie puede ser plana tal

como una lámina, tira de ensayo, etc. Los soportes preferidos incluyen lechos de poliestireno. Los expertos en la técnica conocerán muchos otros vehículos adecuados para unir anticuerpos o antígenos, o serán capaces de establecer los mismos por el uso de la experimentación rutinaria.

5 Los anticuerpos anti-uPA y anti-PAI-1 pueden marcarse de manera detectable uniéndolos a una enzima y usando el anticuerpo marcado en un inmunoensayo enzimático (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)", 1978, *Diagnostic Horizons* 2: 1, Microbiological Associates Quaterly Publication, Walkersville, MD); Voller, A. *et al.*, 1978, *J. Clin. Pathol.* 31: 507-520; Butler, J.E., 1981, *Meth. Enzymol.* 73: 482; Maggio, E. (ed.), 1980, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL; Ishikawa, E. *et al.*, (eds.), 1981, *Enzyme Immunoassay*, Kigaku Shoin, Tokio).
 10 La enzima que está unida al anticuerpo reaccionará con un sustrato apropiado, preferiblemente un sustrato cromogénico, de manera tal que produce un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por medios espectrofotométricos, fluorimétricos o visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de manera detectable el anticuerpo, incluyen, pero no están limitadas a, malato deshidrogenasa, nucleasa de staphylococcus, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerofosfato, deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa. La detección puede conseguirse por métodos colorimétricos que emplean un sustrato cromogénico para la enzima. La medida de los niveles de las proteínas puede conseguirse por comparación visual o calibrador de escaneo eléctrico del grado de la reacción enzimática de un sustrato en comparación con estándar preparados de manera similar. Los estándar pueden prepararse a partir de muestras de pacientes normales, o de muestras que contienen niveles conocidos de uPA y PAI-1 o niveles en o aproximadamente en los
 15 valores de corte para sujetos de alto riesgo y de bajo riesgo. Alternativamente, pueden usarse estándar que contienen niveles conocidos de uPA y PAI-1 para calibrar los niveles de uPA y PAI-1 medidos usando los diferentes sistemas de ensayo.

25 Los niveles de uPA y PAI-1 también pueden medirse usando cualquiera de varios inmunoensayos más. Por ejemplo, marcando radiactivamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, es posible detectar los polipéptidos uPA y PAI-1 mediante el uso de un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, Marzo, 1986). El isótopo radiactivo puede detectarse por medios tales como el uso de un contador gamma o un contador de centelleo o por autorradiografía.

30 También es posible marcar el anticuerpo con un compuesto fluorescente. Cuando el anticuerpo marcado con fluorescencia se expone a la luz de una longitud de onda apropiada, puede medirse la cantidad de fluorescencia que indica el nivel de la proteína al que se une el anticuerpo. Entre los compuestos de marcaje de fluorescencia usados más comúnmente están isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina.

35 El anticuerpo también puede marcarse de manera detectable usando metales que emiten fluorescencia tales como ¹⁵²Eu u otros de la serie de los lantánidos. Estos metales pueden unirse al anticuerpo usando grupos quelantes de metales como ácido dietilenaminopentacético (DTPA) o ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

El anticuerpo también puede marcarse de manera detectable acoplándolo a un compuesto quimioluminiscente. La presencia del anticuerpo con etiqueta quimioluminiscente se determina detectando la presencia de luminiscencia que aparece durante el curso de una reacción química. Los ejemplos de compuestos de marcaje quimioluminiscente particularmente útiles son luminol, isoluminol, éster teromático acridinio, imidazol, sal de acridinio y éster oxalato.

40 Asimismo, puede usarse un compuesto bioluminiscente para marcar el anticuerpo usado en la presente invención. La bioluminiscencia es un tipo de quimioluminiscencia encontrada en sistemas biológicos en los que una proteína catalítica incrementa la eficacia de la reacción de quimioluminiscencia. El nivel de proteína bioluminiscente se determina detectando la cantidad de luminiscencia. Los compuestos bioluminiscentes importantes para los propósitos de marcaje son luciferina, luciferasa y aecuorina.

45 Los métodos de la presente invención implican la medición de los polipéptidos uPA y PAI-1 en el sujeto y es valioso en la estadificación del cáncer de mama y otros cánceres en un sujeto de manera que pueda implementarse un régimen de tratamiento terapéutico apropiado en un sujeto.

50 Además del polipéptido uPA y PAI-1 también puede medirse al menos un marcador más, tal como receptores o antígenos de diferenciación. Por ejemplo, pueden medirse marcadores séricos seleccionados, por ejemplo, de pero no limitados a, antígeno carcinoembrionario (CEA), CA15-3, CA549, CAM26, M29, CA27.29, y MCA en combinación con los polipéptidos uPA y PAI-1. Tomando como base los valores, puede predecirse la supervivencia sin enfermedad y/o la supervivencia global para el paciente sin tratamiento o con un tratamiento particular. Usando esta información, puede seleccionarse un régimen de tratamiento para un sujeto. En otra realización, el indicador de pronóstico es el cambio

observado en los niveles de los diferentes marcadores uno respecto del otro, en lugar de los niveles absolutos de los marcadores presentes en un determinado momento.

5 En una realización específica de la invención, los polipéptidos uPA y PAI-1 o en combinación con otros marcadores pueden medirse en cualquier fluido corporal del sujeto incluyendo pero sin limitarse a sangre, suero, plasma, leche, orina, saliva, efusiones pleurales, fluido sinovial, fluido espinal, infiltraciones de tejido e infiltrados tumorales. En otra
10 realización los polipéptidos uPA y PAI-1 se miden en muestras de tejido o en células directamente. La presente invención también contempla un kit para medir los niveles de uPA y PAI-1 en una muestra biológica. El resultado se usa para poner a un sujeto en un grupo de alto riesgo o un grupo de bajo riesgo en el que puede implementarse un régimen de tratamiento del cáncer específico de ese grupo. El kit puede comprender además instrucciones para interpretar los
15 resultados y predecir la supervivencia global y/o la supervivencia sin enfermedad para un paciente con o sin un tratamiento particular de cáncer de mama después de la eliminación quirúrgica del tejido tumoral.

Cualquiera de los numerosos inmunoensayos puede usarse en la práctica de los métodos de la presente invención, tales como los descritos en la Sección 5.7.5. Los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo que contienen el dominio de unión, que pueden emplearse incluyen pero no están limitados a anticuerpos adecuados entre los de la Sección 5.7.2. y otros
20 anticuerpos conocidos en la técnica o que pueden obtenerse por procedimientos estándar en la técnica tales como los descritos en la Sección 5.7.2.

Cualquier ensayo, tal como los descritos en la Sección 5.7.5, puede usarse para medir la cantidad de los polipéptidos uPA y PAI-1, mediciones que se comparan con un nivel de línea base. Este nivel de línea base puede ser la cantidad que está presente en un sujeto normal sin cáncer. La cantidad de los polipéptidos uPA y PAI-1 también puede
25 compararse con una cantidad conocida o una cantidad que se establece para ser los niveles de corte de uPA y PAI-1 en el tejido o fluido corporal de sujetos de alto riesgo y de bajo riesgo. Una cantidad presente en el tejido o fluido corporal del sujeto que es mayor que el nivel de corte de uPA y PAI-1, mayor nivel de uPA y menor nivel de PAI-1, o menor nivel de uPA y mayor nivel de PAI-1, indica que el sujeto está en el grupo de alto riesgo. Una cantidad presente en el tejido o fluido corporal del sujeto que es menor que el nivel de corte de uPA y PAI-1 indica que el sujeto está en el grupo de bajo riesgo.

5.7.6. FORMACIÓN DE IMÁGENES IN VIVO USANDO ANTICUERPOS FRENTE A LOS POLIPÉPTIDOS uPA Y PAI-1

Los métodos actuales de diagnóstico y terapéuticos usan anticuerpos para dirigir agentes de formación de imágenes o sustancias terapéuticas, por ejemplo, a los tumores. Así, pueden usarse anticuerpos marcados específicos o selectivos para el polipéptido uPA o PAI-1 para la formación de imágenes *in vivo*, medición de los niveles de uPA o PAI-1 y
30 tratamiento del cáncer en un sujeto.

Los anticuerpos pueden unirse a quelantes tales como los descritos en la Patente U.S. No. 4.741.900 o Patente U.S. No. 5.326.856. El complejo anticuerpo-quelante puede marcarse radiactivamente para proporcionar un agente de formación de imágenes para el diagnóstico o tratamiento de la enfermedad. Los anticuerpos también pueden usarse en los métodos que están descritos en la Patente U.S. No. 5.449.761 para crear un anticuerpo marcado radiactivamente para usarse en la formación de imágenes o radioterapia.
35

En las aplicaciones de diagnóstico *in vivo*, pueden formarse imágenes de tejidos específicos o incluso de trastornos celulares específicos, por ejemplo, cáncer por la administración de una cantidad suficiente de anticuerpos marcados.

Se ha ensayado y utilizado clínicamente una amplia variedad de iones metálicos adecuados para la formación de imágenes de tejidos *in vivo*. Para la formación de imágenes con radioisótopos, son deseables generalmente las características siguientes: (a) dosis de radiación baja al paciente; (b) alto rendimiento fotónico que permite realizar un procedimiento de medicina nuclear en un periodo de tiempo corto; (c) capacidad de producirse en cantidades suficientes; (d) coste aceptable; (e) preparación sencilla para la administración; y (f) que no haya requerimiento de que el paciente sea secuestrado posteriormente. Estas características se trasladan generalmente a lo siguiente: (a) la exposición a la radiación del órgano más crítico es menos de 5 rad; (b) puede obtenerse una única imagen en varias horas después de la infusión; (c) el radioisótopo no se desintegra por emisión de una partícula; (d) el isótopo puede detectarse fácilmente; y (e) la vida media es menor de cuatro días (Lamb y Kramer, "Commercial Production of Radioisotopes for Nuclear Medicine", En Radiotracers For Medical Applications, Vol. 1, Rayudu (Ed.), CRC Press, Inc., Boca Raton, p. 17-62). Preferiblemente, el metal es tecnecio-99m.
40
45

Como ilustración, las dianas de las que se puede obtener imágenes incluyen cualquier neoplasma sólido, determinados órganos como mama, ganglios linfáticos, paratiroides, bazo y riñón, sitios de inflamación o infección (por ejemplo, macrófagos en dichos sitios), infarto de miocardio o trombosis (determinantes neoantigénicos en fibrina o plaquetas) y semejantes evidentes para un experto en la técnica.
50

Como también es evidente para un experto en la técnica, se pueden usar terapéuticos *in vivo* (por ejemplo, usando complejos metálicos radioterapéuticos), especialmente después de haber diagnosticado una afección patológica mediante el método de diagnóstico *in vivo* descrito anteriormente o la aplicación de diagnóstico *in vitro* (por ejemplo, usando un complejo radiometálico o metálico fluorescente).

- 5 Consecuentemente, un método para medir los niveles de uPA y PAI-1 por obtención de una imagen de una región interna de un sujeto comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición de anticuerpo específico o selectivo para el polipéptido uPA o PAI-1 conjugado con un metal en el que el metal es radiactivo y registrar la imagen escintigráfica obtenida de la desintegración del metal radiactivo. Asimismo, es posible incrementar una imagen de resonancia magnética (MR) de una región interna de un sujeto que comprende administrar a un sujeto una cantidad
- 10 eficaz de una composición de anticuerpo que contiene un metal en el que el metal es paramagnético y registrar la imagen de MR de una región interna del sujeto.

Otros métodos incluyen un método para incrementar una imagen sonográfica de una región interna de un sujeto que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una composición de anticuerpo que contiene un metal y registrar la imagen sonográfica de una región interna del sujeto. En esta última aplicación, el metal es preferiblemente cualquier ion metálico pesado no tóxico. También se proporciona un método para incrementar una imagen de rayos X de una región interna de un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición de anticuerpo que contiene un metal y registrar la imagen de rayos X de una región interna del sujeto. Se prefiere un ion metálico pesado, radiactivo, no tóxico.

5.8. KITS

20 En la presente memoria se describe el uso de un kit para medir los niveles de uPA y PAI-1 en un sujeto (por ejemplo, en una muestra tal como sangre, orina, cultivo celular). El kit comprende una pluralidad de reactivos, cada uno de los cuales es capaz de unirse específicamente a un ácido nucleico o polipéptido correspondiente a genes o productos génicos uPA o PAI-1 o fragmentos de éstos. Los reactivos adecuados para unirse a uPA o PAI-1 incluyen anticuerpos, derivados de anticuerpos, anticuerpos marcados, fragmentos de anticuerpos y semejantes. Los reactivos adecuados para unirse a un

25 ácido nucleico (por ejemplo, ARNm, ARNm sometido a corte y empalme, ADNc o semejantes) incluyen ácidos nucleicos complementarios. Por ejemplo, los reactivos de ácido nucleico pueden incluir oligonucleótidos (marcados o no marcados) fijados a un sustrato, oligonucleótidos marcados no unidos a un sustrato, pares de cebadores de PCR, sondas moleculares beacon y semejantes. El kit también contiene instrucciones para los métodos de diagnóstico, pronóstico y predictivos de la invención.

30 El kit comprende además composiciones para la administración a un paciente. Pueden administrarse diferentes composiciones dependiendo de si el paciente se identifica como de alto riesgo de de bajo riesgo.

El kit puede comprender opcionalmente componentes adicionales útiles para realizar los métodos de la invención. Como ejemplo, el kit puede comprender fluidos (por ejemplo, tampón SSC) adecuados para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios o para unir un anticuerpo con una proteína a la que se une específicamente, uno o más

35 compartimentos de muestra, un material de instrucciones para interpretar los resultados y resultados del tratamiento predictivo tales como la supervivencia global y/o la supervivencia sin enfermedad para un paciente.

6. EJEMPLOS

6.1. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1. PACIENTES

40 El primer estudio evaluó la relevancia clínica de la combinación de uPA y PAI-1 en 761 pacientes individuales con cáncer de mama primario (Tabla 3). Los pacientes fueron sometidos a una mastectomía radical modificada (n=389) o a cirugía conservadora de la mama con irradiación posterior de la mama (n=372) en el Department of Obstetrics and Gynecology, Technical University de Munich, Alemania, entre 1987 y 1998. En la cirugía primaria se obtuvo el consentimiento informado para el análisis de factores biológicos tumorales. Las decisiones sobre la terapia se basaron únicamente en

45 las recomendaciones consenso en ese momento pero no en uPA y PAI-1. Para 745 pacientes, estuvo disponible información sobre terapia sistémica adyuvante (Tabla 3). La edad media de los pacientes en el momento de la cirugía primaria fue 56 años (intervalo: 28-92 años). En el momento de la terapia primaria, ningún paciente tenía ninguna evidencia clínica o por rayos X de metástasis distante. El tiempo medio de seguimiento de todos los pacientes todavía vivos en el momento del análisis fue 48 meses (intervalo: 1-142 meses). En el periodo de seguimiento, 194 pacientes

50 (26%) experimentaron recurrencia de la enfermedad y 164 pacientes (22%) murieron. Además del colectivo como un todo, el subconjunto de pacientes ganglio negativo sin terapia sistémica adyuvante (n=269; seguimiento medio 60 meses) se analizó separadamente. (Tabla 3). Para algunos pacientes, no estaba disponible toda la información. Además

de estos pacientes ganglio negativo, 12 pacientes ganglio positivo (y 1 con estado ganglionar desconocido) no recibieron terapia sistémica adyuvante.

Tabla 3: Características de los pacientes del primer estudio. Todos los pacientes presentaban cáncer de mama primario sin ninguna evidencia de enfermedad distante.

Factores de pronóstico		Todos los pacientes (n=761)	Pacientes ganglio negativo sin terapia sistémica adyuvante (n=269)
Estado de los ganglios linfáticos	Negativo	387 (51%)	-
	Positivo	371 (48%)	-
Tamaño del tumor	≤ 2 cm	305 (40%)	160 (60%)
	> 2 cm	446 (60%)	107 (40%)
Grado	1/2	414 (54%)	187 (70%)
	3/4	347 (46%)	82 (30%)
Estado del receptor de hormonas esteroideas	Negativo	151 (20%)	50 (19%)
	Positivo	608 (80%)	218 (81%)
Estado menopáusico	Pre/perimenopáusico	270 (36%)	105 (39%)
	Postmenopáusico	490 (64%)	163 (61%)
uPA/PAI-1	Ambos bajos	418 (55%)	171 (64%)
	uPA alto, PAI-1 bajo	134 (17%)	40 (15%)
	uPA bajo, PAI-1 alto	81 (11%)	23 (8%)
	Ambos altos	128 (17%)	35 (13%)
Terapia sistémica adyuvante	Ninguna	282 (38%)	269 (100%)
	Quimioterapia	203 (27%)	
	Terapia hormonal	201 (27%)	
	Ambas	59 (8%)	

El segundo estudio implicó un total de 3.424 pacientes con cáncer de mama primario de dos diferentes conjuntos de datos. Un conjunto se recogió del Department of Obstetrics and Gynecology, Technical University de Munich, Alemania y el otro fue del Department of Medical Oncology, Rotterdam Cancer Institute y University Hospital Rotterdam, Holanda. Los pacientes habían sido tratados pata cáncer de mama primario entre 1987 y 1999. Las características de los dos conjuntos de datos se resumen en las Tablas 4 y 5. Las decisiones sobre el tratamiento respecto a cirugía primaria y terapia sistémica adyuvante se basaron principalmente en las recomendaciones de consenso en el momento. Las estrategias de tratamiento eran diferentes entre Munich y Rotterdam, particularmente respecto a la administración de la terapia sistémica adyuvante a pacientes ganglio positivo (Tabla 4b) (Harbeck *et al.*, 2002, *J. Clin. Oncology* 20: 1000-1009; Foekens *et al.*, 2000, *Cancer Res.* 60: 636-643). De aquellos pacientes tratados con quimioterapia adyuvante, la mayoría recibió CMF (Rotterdam: 76%, Munich: 65%); aproximadamente un quinto de ambos colectivos recibió regímenes que contenían antraciclina (Rotterdam: 24%, Munich: 21%); y el resto de los pacientes de Munich se trató con otros regímenes de quimioterapia. El tratamiento endocrino usado en ambos colectivos fue tamoxifeno.

La edad media de los pacientes en el momento de la cirugía primaria fue 56 años (intervalo: 22-94 años). Ambos conjuntos de datos contenían factores clínicos e histo-morfológicos establecidos tal como número de ganglios linfáticos axilares implicados, estadio pT, estado del receptor de estrógeno, estado del receptor de progesterona, exposición a quimioterapia adyuvante (CT), terapia endocrina adyuvante (HT) o radioterapia adyuvante (RT) así como mediciones de uPA y PAI-1. Como los sistemas de puntuación para la evaluación del grado diferían sustancialmente entre los centros y podría representar así diferentes características tumorales biológicas, el grado no se incluyó en el análisis estratificado combinado. Las variables se re-codificaron como se describe más adelante en la Sección 6.1.3. Los pacientes con un número indeterminado de ganglios linfáticos afectados se incluyeron para computar las distribuciones univariante de las variables clasificadas pero no en análisis de supervivencia multivariante. Cuarenta y cinco pacientes de Rotterdam con un número indeterminado de ganglios linfáticos afectados y tres pacientes de Munich con falta de información sobre quimioterapia no se incluyeron. En el momento de la terapia primaria, ningún paciente tenía ninguna evidencia clínica o radiológica de metástasis distante. Los datos de seguimiento se obtuvieron a intervalos regulares. El tiempo medio de seguimiento de todos los pacientes aún vivos en el momento del análisis fue 83 meses (intervalo: 1-183 meses). En el periodo de seguimiento, 1.319 pacientes (39%) experimentaron recurrencia de la enfermedad y 1.200 pacientes (35%) murieron.

Tabla 4: a) Vista global de las características de los pacientes y del tratamiento en el segundo estudio b) Endocrina adyuvante y quimioterapia por estado ganglionar y centro

Factores		Munich	Rotterdam	Total
Tamaño del tumor	pT1	289 (38%)	1.128 (42%)	1.417 (41%)
	pT2	360 (47%)	1.246 (47%)	1.606 (47%)
	pT3/4	118 (15%)	283 (11%)	401 (12%)
Ganglios linfáticos implicados	0	399 (52%)	1.337 (50%)	1.736 (51%)
	1-3	189 (25%)	668 (25%)	857 (25%)
	≥ 4	179 (23%)	607 (23%)	786 (24%)
	indeterminado	0	45 (2%)	45 (1%)
uPA/PAI-1	bajo	414 (54%)	1.427 (54%)	1.841 (54%)
	alto	353 (46%)	1.230 (46%)	1.583 (46%)

Terapia adyuvante	Munich		Rotterdam	
	N0	N1	N0	N1
Ninguna	271 (67,9%)	12 (3,3%)	1.337 (100%)	663 (52,0%)
sólo endocrina	69 (17,3%)	140 (38,4%)	0	161 (12,6%)
sólo quimio	56 (14,0%)	160 (43,8%)	0	430 (33,7%)
quimio y endocrina	3 (0,8%)	53 (14,5%)	0	21 (1,6%)

Tabla 5: Frecuencia de la terapia sistémica adyuvante en conjuntos de datos por niveles de uPA/PAI-1

Terapia sistémica adyuvante por uPA/PAI-1	Munich		Rotterdam	
	bajo	alto	bajo	Alto
ninguna	179 (43%)	104 (30%)	1.036 (76%)	945 (77%)
sólo endocrina	106 (26%)	103 (29%)	83 (6%)	85 (7%)
sólo quimio	96 (23%)	120 (34%)	243 (17%)	192 (16%)
quimio y endocrina	32 (8%)	24 (7%)	15 (1%)	8 (1%)

6.1.2. ENSAYOS DE LABORATORIO

En estudios que implican a pacientes de Munich, se midieron los antígenos uPA y PAI-1 de manera prospectiva por ELISA (uPA: Imubind #894. PAI-1: Imubind #821; ambos de American Diagnostica Inc., Greenwich, CT) desde 1987 en todos los pacientes con cáncer de mama primario tratados en nuestra institución. (Jänicke et al., 1994, *Cancer Res.* 54: 2527-2530). Los niveles de antígeno en extractos de detergente de tejido de cáncer de mama se expresan como ng de analito por mg de proteína tisular. En el estudio que implica a pacientes de Rotterdam, se midieron los antígenos uPA y PAI-1 por ELISA empleando los mismos anticuerpos que anteriormente, en preparaciones de citosol del tumor primario como describen Foekens *et al.*, 2000, *Cancer Res.*, 60: 636-643.

El grado del tumor se determinó usando los criterios bien establecidos de Bloom-Richardson. Los receptores de hormonas esteroides (receptor de estrógeno y de progesterona) se determinaron inicialmente bioquímicamente (EIA) en fracciones de citosol y se consideraron positivos si contenían al menos 20 fmoles por mg de proteína. Empezando en 1991, se realizó tinción inmunohistoquímica en secciones de tejido incluidas en parafina; la tinción positiva indicó positividad de receptor. El estado de los receptores de hormonas esteroides se consideró positivo si uno o los dos receptores eran positivos.

6.1.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las variables continuas uPA y PAI-1 se codificaron en primer lugar como variables binarias usando los valores de corte previamente optimizados y re-evaluados de 3 ng uPA/mg de proteína y 14 ng PAI-1/mg de proteína para distinguir entre niveles de antígeno altos y bajos de los analitos en extractos de tejido de tumor primario. Harbeck et al., 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 54: 147-157. Una nueva variable binaria "uPA/PAI-1", que representa la combinación de estos dos factores, se definió como los dos factores bajos frente a uno o los dos factores altos.

Debido a las diferencias en las técnicas de medición entre los conjuntos de datos de Munich y Rotterdam, se requirió una re-codificación de los datos. Para las mediciones de laboratorio de uPA, PAI-1, receptor de estrógenos y receptor de progesterona, se computaron rangos fraccionarios respecto a cada distribución. Los rangos fraccionarios también mantienen a las variables en una escala conveniente de cero a uno, facilitando así la comparación de los coeficientes β de los diferentes factores. En particular, las mediciones clasificadas del receptor de estrógenos y del receptor de progesterona se incluyeron como variables continuas en los modelos estadísticos, a pesar de que se usaron ensayos bioquímicos e inmunohistoquímicos. Las bajas correlaciones encontradas entre estas mediciones de laboratorio y el resto de los factores de estadificación "clásicos" apoyan la inferencia de que rangos similares implican características biológicas similares incluso entre conjuntos de datos.

Una variable binaria para uPA/PAI-1 se definió 0 para uPA y PAI-1 ambos por debajo de sus puntos de corte respectivos y 1 de otra manera (es decir, uno o los dos por encima de su punto de corte respectivo) (Harbeck *et al.*, 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 54: 147-157). Los valores de corte univariante determinados y validados previamente por el grupo de Munich (Jänicke *et al.*, 2001, *Int. J. Natl. Cancer Inst.* 93: 913-920; Harbeck *et al.*, 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 54: 147-157) se aplicaron a los datos de Rotterdam transformando los puntos de corte de Munich en rangos fraccionarios y aplicando éstos a los datos de Rotterdam, lo que resulta en casi exactamente el mismo porcentaje de uPA/PAI-1 "alto" frente a "bajo" en cada cohorte (véase la Tabla 4a).

El estadio pT (Harris, 2000, "Staging and natural history of breast cancer", en *Diseases of the Breast*, 2a ed., Harris, eds., 403-406) se codificó usando dos variables binarias auxiliares: 1) pT1 (codificada 0) frente a todas las demás (codificadas 1) y 2) pT1 y 2 (codificadas 0) frente a pT3 y 4 (codificadas 1). Los rangos fraccionarios se asignaron separadamente en los dos conjuntos de datos para el número de ganglios linfáticos afectados (variable indicada como "ganglios linfáticos"), Los números iguales de ganglios corresponden a rangos fraccionarios iguales a lo largo de los conjuntos de datos, dentro de un pequeño porcentaje. Para la edad de los pacientes, se computaron en primer lugar rangos fraccionarios para el conjunto de datos de Rotterdam y las edades de Munich se transformaron a esta escala. Con el fin de modelar la dependencia no lineal de HR en la edad tan cercano como fue posible, tanto el rango fraccionario en sí mismo como su cuadrado se incluyeron en los modelos. Las tres variables binarias para la terapia adyuvante (RT, HT, CT) se codificaron de manera que el valor 1 representa "se sabe que ha sido tratado con la clase respectiva de terapia adyuvante". Una variable binaria "conjunto de datos" se introdujo y se usó para estratificar el análisis como se discute más adelante. Esta variable es responsable de las diferencias sistemáticas en las influencias demográficas, factores no observados que contribuyen al estadio de la enfermedad, o estrategias de terapia sistémica adyuvante.

Los factores de pronóstico establecidos se dicotomizaron como se describe en otra parte. Harbeck *et al.*, 1999, *Br. J. Cancer.* 80: 419-426. Para análisis univariante de supervivencia sin enfermedad (DFS) y supervivencia global (OS), se representaron curvas de Kaplan-Meier y se compararon usando estadísticas de rango log. Los análisis multivariante se realizaron de forma directa por etapas aplicando el modelo de riesgo proporcional de Cox y los modelos de Cox con covariantes que varían en el tiempo usando el paquete de software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). Se incluyeron

interacciones en los modelos de Cox en el segundo estadio del modelo usando selección directa. El modelo de riesgo proporcional de Cox se usó con variables clasificadas continuas y variables binarias como se ha descrito anteriormente. Las variables se incluyeron según las razones de probabilidad de una manera directa por etapas usando el paquete de software SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL). A no ser que se indique otra cosa, los efectos principales (es decir, lineales) se incluyeron siempre en un primer bloque, mientras que las interacciones se incluyeron como un segundo bloque en el análisis. Este método implica que un efecto principal que es significativo en el primer bloque se retendrá en el modelo, incluso si una interacción en el segundo bloque es tan fuerte que reduce el coeficiente del efecto principal por debajo del nivel de significancia. Todos los modelos se estratificaron por el conjunto de datos. El paquete de software SPSS también se usó para computar los rangos fraccionarios, coeficientes de correlación, asociaciones y otras propiedades estadísticas. Todos los ensayos se realizaron a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$. Los intervalos de confianza se refieren al nivel 95%. Las correlaciones significativas (coeficiente de Pearson) que superaron 0,1 entre los factores clasificados se encontraron entre el receptor de estrógeno y el receptor de progesterona (0,53); el receptor de estrógeno y la edad (0,36); ganglios linfáticos y estadio del tumor (0,36); y uPA y PAI-1 (0,58).

6.2. RESULTADOS

6.2.1. LA COMBINACIÓN UPA/PAI-1 IDENTIFICA A LOS PACIENTES DE BAJO RIESGO MEJOR QUE CUALQUIERA DE LOS FACTORES SOLO

Con el fin de tratar la cuestión de la discriminación mejorada en grupos de riesgo por la combinación de uPA y PAI-1, los pacientes ganglio negativo sin terapia sistémica adyuvante se examinaron ya que en este subconjunto el impacto del pronóstico refleja el curso natural de la enfermedad. Tanto uPA ($p=0,022$; RR 2,3; 95% CI 1,1-4,1) como PAI-1 ($p=0,049$; RR 2,0; 95% CI 1,0-4,0) separadamente así como grado ($p=0,026$; RR 2,1; 95% CI 1,1-4,0) son significativos en una regresión multivariante de Cox para DFS (incluyendo los factores establecidos tamaño del tumor, grado, receptor hormonal y estado menopáusico). Sin embargo, si la combinación dicotomizada uPA/PAI-1 (bajo-bajo frente a uno o ambos altos) se introduce en la regresión de Cox en este cohorte, uPA y PAI-1 los dos se salen del modelo. Con el fin de entender el papel especial de la combinación uPA/PAI-1, cada uno de los dos factores se estratificó y se realizó una regresión de Cox en los factores restantes en el subgrupo de bajo riesgo respectivo: En pacientes con uPA bajo, sólo PAI-1, pero ninguno de los factores establecidos, proporciona una discriminación de riesgo adicional ($p<0,001$; RR 5,9; 95% CI 2,2-16,0). De manera similar, en pacientes con PAI-1 bajo, uPA proporciona una información de pronóstico adicional ($p=0,001$; RR 4,2; 95% CI 1,9-9,6) incluso en análisis multivariante. Este comportamiento se ilustra por las curvas de Kaplan-Meier respectivas en la Figura 3. Como se muestra en los paneles superiores, PAI-1 proporciona una separación en grupo de riesgo estadísticamente significativa (PAI-1 bajo: $n=171$, 13 eventos; PAI-1 alto: $n=23$, 6 eventos) en pacientes considerados de bajo riesgo por los niveles de uPA en su tejido tumoral primario (uPA bajo: $n=194$, 19 eventos; uPA alto: $n=75$, 25 eventos). En los paneles inferiores, se ve que uPA proporciona una separación en grupo de riesgo estadísticamente significativa (uPA bajo: 171 pacientes, 13 eventos; uPA alto: 40 pacientes, 12 eventos) en pacientes considerados de bajo riesgo según PAI-1 (PAI-1 bajo: $n=211$, 25 eventos; PAI-1 alto: $n=58$, 19 eventos). De forma interesante, la influencia de cada uno de estos dos factores no es uniforme respecto al otro, sino que sólo es significativo en el subgrupo de *bajo riesgo* del otro.

La Figura 4 muestra las curvas de Kaplan-Meier respectivas para las cuatro posibles combinaciones de ambos factores. Los niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1 ($n=171$, 13 eventos) identifican a pacientes de bajo riesgo y superan significativamente a todas las demás combinaciones (uPA alto, PAI-1 bajo: $n=40$, 12 eventos; uPA bajo, PAI-1 alto: $n=23$, 6 eventos; uPA y PAI-1 altos: $n=35$, 13 eventos). Las recaídas en los pacientes con uPA o PAI-1 alto o ambos tienden a ocurrir en los primeros 3-4 años, especialmente si PAI-1 es alto. El impacto de pronóstico disminuido con el tiempo, que también se encuentra en otros factores de pronóstico muy conocidos, sugiere una salida de "riesgo proporcional" estricto. Con el fin de modelizar este comportamiento más de cerca, se incluyó una variación de tiempo $F(T)$ para describir la interacción de los factores uPA y PAI-1. Se usa una forma logística $F(T) = 1/(1+EXP((T-36)/6))$, en la que T es el tiempo en meses. Esta forma funcional permite que la contribución de uPA/PAI-1 permanezca fuerte a lo largo de aproximadamente 3 años y que disminuya rápidamente hacia cero con un seguimiento más largo; la forma precisa de $F(T)$ afecta el ajuste pero de otra manera proporciona una diferencia cualitativa pequeña en la comprensión de la interacción. Se construyeron modelos incluyendo todos los factores establecidos dicotomizados y uPA* $F(T)$, PAI-1* $F(T)$ dicotomizados, el término de interacción uPA*(PAI-1)* $F(T)$ así como estos factores sin la dependencia del tiempo. El modelo con el mejor ajuste incluye sólo grado, uPA* $F(T)$, PAI-1* $F(T)$ y uPA*(PAI-1)* $F(T)$. Los coeficientes beta de los tres términos son el mismo en magnitud, aproximadamente 2,7 (correspondiente a un riesgo relativo de aproximadamente 1,5) pero el coeficiente de la interacción es *negativo*. Este resultado significa que el log del riesgo relativo (R.R.) asociado con la combinación de uPA alto y PAI-1 alto no es el doble del log de riesgo relativo que podría esperarse de un modelo lineal, sino que es cercano al del de cada factor solo. Estas relaciones se reflejan en la FIG. 4. Estos resultados apoyan la declaración de que la combinación particular uPA/PAI-1 tal y como se usa aquí (uno de los dos o ambos altos frente a ambos bajos) caracteriza correctamente el riesgo asociado con uPA y PAI-1.

6.2.2. IMPACTO EN EL PRONÓSTICO DE UPA/PAI-1 EN PACIENTES *GANGLIO NEGATIVO* SIN TERAPIA ADYUVANTE

La combinación uPA/PAI-1 es un discriminador altamente significativo entre pacientes de bajo riesgo y aquellos de alto riesgo no sólo para recaída sino también para muerte en análisis univariante en este subgrupo clínicamente relevante.

5 En análisis multivariante, uPA/PAI-1 es el factor de pronóstico más fuerte no sólo para DFS sino también para OS (Tabla 6). Además, uPA/PAI-1 permite la identificación de pacientes de alto riesgo incluso en grupos de riesgo establecidos definidos por tamaño del tumor, grado, receptor de hormonas esteroides o estado menopáusico. En la Figura 5 se proporciona el riesgo relativo (RR) de recurrencia como una función de unos niveles altos de antígeno de uno o de
10 ambos factores frente a niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1 según se determina en extractos de tejido tumoral primario.

Tabla 6: Análisis univariante y multivariante para supervivencia sin enfermedad y supervivencia global en pacientes con cáncer de mama ganglio negativo sin terapia sistémica adyuvante (n=269; tiempo medio de seguimiento 60 meses).

Factores de pronóstico	Supervivencia sin enfermedad (DFS)				Supervivencia global (OS)			
	Univariante valor p	riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)	multivariante valor p	Riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)	univariante valor p	riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)	multivariante valor p	riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)
uPA/PAI-1	<0,001	4,8 (2,5-9,1)	<0,001	3,9 (2,0-7,5)	<0,001	3,9 (1,9-7,8)	0,005	2,8 (1,4-5,9)
Grado	<0,001	3,3 (1,8-5,9)	0,007	2,3 (1,3-4,3)	<0,001	3,5 (1,8-6,8)	0,003	2,8 (1,4-5,6)
Estado menopáusico	n.s. [§]	-	n.s.	-	0,047	2,2 (1,9-4,9)	0,037	2,3 (1,1-5,1)
Estado del receptor de hormonas esteroideas	n.s.	-	n.s.	-	0,022	0,5 (0,2-0,9)	n.s.	-
Tamaño del tumor	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-

§ n.s. = no significativo (p>0,05)

6.2.3. IMPACTO EN EL PRONÓSTICO DE UPA/PAI-1 EN EL COLECTIVO *COMPLETO* DE PACIENTES

En los análisis multivariante del *colectivo completo* (n=761) de pacientes con cáncer de mama primario, uPA/PAI-1 surge como el factor de pronóstico estadísticamente independiente más fuerte para supervivencia sin enfermedad (DFS) y supervivencia global (OS) cerca del estado ganglionar (Tabla 7). Además uPA/PAI-1 proporciona una separación de los grupos de riesgo significativa incluso en subgrupos clínicamente importantes como se estratifican por factores de pronóstico establecidos. Para los subgrupos siguientes, los riesgos relativos de recurrencia se proporcionan como una función de uPA/PAI-1 alto frente a uPA/PAI-1 bajo: Estado ganglionar (negativo RR 3,8; 95% CI 2,1-6,8. positivo: RR 1,5; 95% CI 1,1-2,1), tamaño del tumor (≤ 2 cm: RR 1,9; 95% CI 1,1-3,4. > 2 cm: RR 1,8; 95% CI 1,3-2,6), grado (G 1/2: RR 2,3; 95% CI 1,5-3,6), estado de receptor hormonal (positivo: RR 1,8; 95% CI 1,3-2,5) y estado menopáusico (pre/peri: RR 2,8; 95% CI 1,8-4,4. post: RR 1,5; 95% CI 1,1-2,2).

Tabla 7: Análisis univariante y multivariante para supervivencia sin enfermedad y supervivencia global en pacientes con cáncer de mama *primario* (n=761); tiempo medio de seguimiento 48 meses).

Factores de pronóstico	Supervivencia sin enfermedad (DFS)				Supervivencia global (OS)			
	Univariante valor p	riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)	multivariante valor p	Riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)	univariante valor p	riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)	multivariante valor p	riesgo relativo (95% Intervalo de confianza)
Estado de ganglios linfáticos	<0,001	2,7 (2,0-3,7)	<0,001	3,7 (2,3-5,8)	<0,001	2,6 (1,8-3,6)	<0,001	2,3 (1,6-3,2)
uPA/PAI-1	<0,001	1,9 (1,4-2,5)	<0,001	1,9 (1,4-2,5)	<0,001	2,0 (1,5-2,7)	<0,001	2,0 (1,4-2,7)
Tamaño del tumor	<0,001	2,2 (1,6-3,0)	0,006	1,6 (1,2-3,0)	<0,001	2,2 (1,5-3,2)	0,032	1,5 (1,0-2,2)
Grado	<0,001	2,3 (1,7-3,0)	0,004	1,6 (1,2-2,2)	<0,001	2,2 (1,6-3,1)	0,004	1,6 (1,2-2,4)
Terapia endocrina adyuvante	n.s. §	-	0,001	0,5 (0,3-0,7)	n.s.	-	n.s.	-
Quimioterapia adyuvante	<0,001	1,7 (1,3-2,3)	0,019	0,6 (0,4-0,9)	n.s.	-	n.s.	-
Estado del receptor de hormonas esteroides	0,008	0,6 (0,5-0,9)	n.s.	-	0,001	0,6 (0,4-0,8)	n.s.	-
Estado menopáusico	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-	n.s.	-

§ n.s. = no significativo (p>0,05)

6.2.4. INTERACCIÓN DE LA TERAPIA SISTÉMICA ADYUVANTE CON EL IMPACTO EN EL PRONÓSTICO DE UPA/PAI-1

El impacto en el pronóstico de uPA/PAI-1 depende en gran medida de la administración de terapia sistémica adyuvante. En pacientes que no han recibido ninguna terapia sistémica adyuvante, uPA/PAI-1 permite una discriminación altamente significativa entre los pacientes de bajo riesgo y los de alto riesgo para recurrencia de la enfermedad (p<0,001; RR 4,6; 95% CI 2,6-8,3) (Figura 6, panel superior). En pacientes que han recibido terapia sistémica adyuvante, se pierde la significancia en el pronóstico (p=0,165; RR 1,3; 95% CI 0,9-1,8) (Figura 6, panel inferior). Esto permanece cierto incluso si se distingue entre quimioterapia adyuvante (p=0,260; RR 1,3; 95% CI 0,8-2,2) o terapia endocrina adyuvante (p=0,404; RR 1,3; 95% CI 0,7-2,2) de forma separada.

La Tabla 8 presenta los resultados de un modelo de Cox que incluye todos los factores establecidos dicotomizados, uPA/PAI-1, una variable de la terapia dicotomizada (tratamiento sistémico adyuvante sí/no), la interacción entre la variable de la terapia y uPA/PAI-1, así como una interacción hipotética del estado ganglionar con uPA/PAI-1. Las interacciones se incluyeron en el segundo estadio del modelo usando selección directa. En el primer (lineal) estadio, el estado ganglionar, tamaño del tumor, grado, uPA/PAI-1 y "terapia" fueron todos significativos. Después del segundo estadio, sin embargo, se consideran las interacciones, la interacción entre la variable de la terapia y uPA/PAI-1 entra en el modelo, con la terapia sola perdiendo su significancia. La interacción hipotética del estado ganglionar con uPA/PAI-1 no entra en este modelo. Sin embargo, en modelos similares en los que no se incluye la interacción de la terapia, la interacción del estado ganglionar no entra. Este efecto estadístico es consistente con la confusión fuerte del estado ganglionar y el estado del tratamiento adyuvante. Para OS, uPA/PAI-1 muestra de nuevo un impacto significativo en el pronóstico en pacientes sin terapia sistémica adyuvante (p<0,0001; RR 3,8; 95% CI 2,1-7,2), mientras su fuerza en el pronóstico disminuye en pacientes que han recibido quimioterapia adyuvante (p=0,023; RR 2,0; 95% CI 1,1-3,7) o terapia endocrina adyuvante (p=0,467; RR 1,2; 95% CI 0,7-2,0).

Tabla 8: Modelo de Cox multivariante (DFS) que incluye la interacción de uPA/PAI-1 con el tratamiento en cáncer de mama primario. El primer estadio del análisis incluyó factores de pronóstico establecidos, uPA/PAI-1 y terapia sistémica adyuvante (sí frente a no). El segundo estadio incluyó las interacciones: Terapia adyuvante con uPA/PAI-1 y estado ganglionar con uPA/PAI-1.

Factores	Modelo final	
	valor p	Riesgo Relativo (95% Intervalo de confianza)
Estado de los ganglios linfáticos	<0,001	4,5 (2,2-8,2)
uPA/PAI-1	<0,001	4,3 (2,4-7,8)
Tamaño del tumor	0,003	1,7 (1,2-2,4)
Grado	0,002	1,7 (1,2-2,2)
Terapia sistémica adyuvante	0,404 [§]	0,7 (0,3-1,5)
Interacción "terapia" uPA/PAI-1"	0,001	0,3 (0,2-0,6)

[§] no significativo, mantenido en el modelo como "efecto principal"

6.2.5. DFS INCLUYENDO UPA/PAI-1 Y SUS INTERACCIONES CON TERAPIA EN TODOS LOS PACIENTES

Las proporciones de recaída a los 5 años asociadas con uPA/PAI-1 bajo y alto fueron 28% y 46%, respectivamente. Las probabilidades de ser tratados con CT o HT en los subgrupos definidos por uPA/PAI-1 se muestran en la Tabla 5 y en la Sección 6.1.

En la Tabla 9, se indican los resultados de un análisis de riesgos proporcionales para DFS en todos los pacientes, estratificado por los conjuntos de datos. El primer estadio incluyó factores de pronóstico establecidos (receptor de estrógeno, receptor de progesterona, edad, ganglios linfáticos, estadio pT, codificados como se ha descrito anteriormente en la Sección 6.1.3.) así como uPA/PAI-1, exposición a CT, HT o RT. El segundo estadio incluyó las interacciones CT y HT con uPA/PAI-1, y ganglios linfáticos con uPA/PAI-1, así como la "interacción del tratamiento", es decir, CT con HT. Para este análisis, 45 de un total de 3.424 pacientes se excluyeron debido a información incompleta del número de ganglios implicados, y tres se excluyeron debido a falta de información de quimioterapia adyuvante. Los factores significativos se codificaron como se ha indicado en la Sección 6.1. El análisis también se estratificó por centro:

46 pacientes se censuraron antes del primer evento en el estrato. Hubo 1.301 eventos en total. El primer estadio del análisis incluyó factores de pronóstico establecidos, uPA/PAI-1, radioterapia adyuvante, quimioterapia adyuvante y terapia endocrina adyuvante. El segundo estadio incluyó interacciones: quimioterapia y terapia endocrina con uPA/PAI-1, quimioterapia con terapia endocrina y ganglios linfáticos implicados con uPA/PAI-1.

- 5 Todos los efectos (factores) principales considerados en el modelo de la Tabla 9 son significativos excepto radioterapia y receptor de estrógeno. La HR (relación de riesgo) de uPA/PAI-1 es 2,0 (1,8-2,3), ($P < 0,001$). El efecto global de la edad - incluyendo el rango fraccionario cuadrado - en el modelo es una caída gradual, casi lineal, de HR desde los pacientes más jóvenes (definidos para tener $HR=1$), estabilizándose a aproximadamente $HR=0,5$ en la edad aproximada de 60 y elevándose aparentemente un poco por encima a la edad aproximada de 65. La interacción entre la implicación de los
- 10 ganglios linfáticos y uPA/PAI-1 no fue significativa en el análisis de todos los pacientes, ni lo fue $CT * HT$, lo que implica que no hay evidencia frente a un efecto aditivo de esta combinación de tratamiento.

El resultado clave es la interacción significativa (negativa) entre CT y la variable uPA/PAI-1. Esta interacción implica que un HR mayor de recaída (2,01) asociado con uPA/PAI-1 alto (comparado con uPA/PAI-1 bajo) está reducido significativamente ($0,68 * 2,01 = 1,36$) en los pacientes que reciben quimioterapia adyuvante. Este beneficio ocurre además de las reducciones de riesgo global independientes de aproximadamente un tercio debidas a CT ($HR=0,69$) - o HT ($HR=0,68$). No se encontró una interacción significativa entre HT y uPA/PAI-1 (95% CI para este HR: 0,66 - 1,28). Por lo tanto, los beneficios de ambas terapias son significativos, pero sólo para la quimioterapia se observa un beneficio adicional (incrementado) entre los pacientes con uPA/PAI-1 alto.

20 La FIG. 7 ilustra los HR de CT y HT teniendo en cuenta las interacciones significativas con uPA/PAI-1 según las Tablas 9-11 (para discusión de las Tablas 10 y 11, véanse las secciones siguientes). Para todos los pacientes, la interacción significativa $CT * uPA/PAI-1$ se observa en el panel superior de la FIG. 7 como una reducción del riesgo atribuible a CT que se ve fuertemente afectado por uPA/PAI-1. La ausencia de una interacción significativa $HT * uPA/PAI-1$ se manifiesta en sí misma en la figura en que la reducción del riesgo atribuible a HT no se ve afectada por uPA/PAI-1.

Tabla 9: Modelo de Cox multivariante (DFS) incluyendo la interacción de uPA/PAI-1 con tratamiento adyuvante en primario

Factores Significativos	Codificación para la interpretación de β	Modelo final		Relación de riesgo Intervalo de confianza (95%)
		valor p	β	
Ganglios linfáticos implicados	rango fraccionario	<0,001	2,47	
	1 ganglio frente a ganglio negativo			2,2 (2,0-2,3) ^a
	4 ganglios frente a ganglio negativo			3,7 (3,3-4,2) ^a
	10 ganglios frente a ganglio negativo			5,3 (4,5-6,2) ^a
Edad	rango fraccionario cuadrado	<0,001	1,29	3,65 (1,73-7,70) ^b
	rango fraccionario	<0,001	-1,94	0,14 (0,07-0,31) ^b
Estadio del tumor	resto (1) frente a pT1 (0)	<0,001	0,30	1,35 (1,19-1,54)
	resto (1) frente a pT1/pT2 (0)	0,008	0,22	1,24 (1,06-1,46)
Receptor de progesterona	rango fraccionario	<0,001	-0,42	0,66 (0,55-0,80) ^b
uPA/PAI-1	alto (1) frente a bajo (0)	<0,001	0,70	2,01 (1,77-2,28)
Quimioterapia adyuvante	sí (1) frente a no (0)	<0,001	-0,37	0,69 (0,56-0,85)
Terapia endocrina adyuvante	sí (1) frente a no (0)	<0,001	-0,38	0,68 (0,56-0,82)
Interacción: "quimioterapia*uPA/PAI-1"	ambos 1 frente a uno o ambos 0	0,003	-0,38	0,68 (0,53-0,88)

^a Relación de riesgo para pacientes con 1, 4, 10 ganglios positivos comparado con pacientes ganglio negativo, CI aproximado debido a rangos fraccionarios

rango fraccionario=1 comparado con rango fraccionario=0

6.2.6. DFS INCLUYENDO UPA/PAI-1 Y SUS INTERACCIONES CON TERAPIA EN PACIENTES CON 0-3 GANGLIOS IMPLICADOS

- 5 No fue factible un análisis separado del valor predictivo de uPA/PAI-1 en pacientes ganglio negativo ya que menos de aproximadamente 5% de los pacientes en cada subgrupo recibió HT o CT. No obstante, tiene un interés clínico considerar el grupo de pacientes con 0-3 ganglios implicados. La Tabla 10 muestra el análisis de riesgo proporcional para DFS, que se estratificó por conjunto de datos como en la Tabla 9 y que incluye los mismos factores. El análisis se estratificó por centro: 50 pacientes se censuraron antes del primer evento en el estrato, 800 eventos en total. Los estadios del análisis son los mismos que en la Tabla 9. Un paciente de 2.593 se excluyó debido a falta de información sobre quimioterapia adyuvante.
- 10 En este subgrupo de pacientes con 0-3 ganglios implicados, el receptor de estrógeno clasificado es significativo, estando asociados los valores mayores con HR mayor, mientras que el receptor de progesterona clasificado está asociado con HR menor. Para el estadio del tumor, sólo la distinción pT1 frente a los demás es significativa, pero no pT1/pT2 frente al resto. Los HR para la edad implican que una edad menor es un factor incluso más fuertemente desfavorable en este subgrupo que en todos los pacientes.
- 15 En los pacientes con 0-3 ganglios linfáticos afectados, los efectos que implican terapia y uPA/PAI-1 son cualitativamente e incluso cuantitativamente más cercanos a los observados en el análisis de todos los pacientes. El riesgo asociado con uPA/PAI-1 alto es ligeramente mayor; la terapia endocrina adyuvante tiene aproximadamente el mismo beneficio que en todos los pacientes; y la interacción entre quimioterapia adyuvante y uPA/PAI-1 es similar; véase la FIG. 7.

Tabla 10: Modelo de Cox multivariante (DFS) incluyendo la interacción de uPA/PAI-1 con tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama con 0-3 ganglios axilares implicados (n=2.592).

Factores Significativos ^b	Codificación para la interpretación de β	Modelo final		
		valor p	β	Relación de riesgo ^e (95% Intervalo de confianza)
Ganglios linfáticos implicados	rango fraccionario	<0,001	2,37	
	1 ganglio frente a ganglio negativo			2,10 (1,8-2,4) ^d
	2 ganglios frente a ganglio negativo			2,70 (2,2-3,3) ^d
	3 ganglios frente a ganglio negativo			3,19 (2,5-4,0) ^d
Edad	rango fraccionario cuadrado	<0,001	1,87	6,48 (2,52-16,66)
	rango fraccionario	<0,001	-2,63	0,07 (0,03-0,19)
Estadio del tumor	resto (1) frente a pT1 (0)	<0,001	0,35	1,42 (1,23-1,65)
Receptor de progesterona	rango fraccionario	<0,001	-0,58	0,56 (0,42-0,75) ^p
Receptor de estrógeno	rango fraccionario	0,008	0,43	1,53 (1,12-2,10)
uPA/PAI-1	alto (1) frente a bajo (0)	<0,001	0,79	2,21 (1,88-2,59)
Quimioterapia adyuvante	sí (1) frente a no (0)	0,034	-0,33	0,72 (0,53-0,98)
Terapia endocrina adyuvante	sí (1) frente a no (0)	0,005	-0,41	0,66 (0,48-0,90)
Interacción: "quimioterapia *uPA/PAI-1"	ambos 1 frente a uno o ambos 0	0,041	-0,36	0,70 (0,50-0,98)

^a Relación de riesgo para pacientes con 1, 2, 3 ganglios positivos comparado con pacientes ganglios negativo, CI aproximado debido a rangos fraccionarios

^e Riesgo para rango fraccionario=1 comparado con rango fraccionario=0

6.2.7. DFS INCLUYENDO uPA/PAI-1 Y SUS INTERACCIONES EN PACIENTES CON CUATRO O MÁS GANGLIOS IMPLICADOS

5 En los pacientes con cuatro o más ganglios linfáticos axilares implicados, los porcentajes de terapia adyuvante son como sigue: con uPA/PAI-1 bajo (n=398, proporción de recaída en 5 años 56%), 27% se trataron con terapia endocrina adyuvante y 36% con quimioterapia. Con uPA/PAI-1 alto (n=388, proporción de recaída a los 5 años 72%), estos porcentajes fueron ligeramente inferiores a 26% y 29% respectivamente. Los resultados de un análisis de Cox realizado para este subgrupo se indican en la Tabla 11. Los factores se incluyeron como en los modelos anteriores; el análisis se estratificó de nuevo por centro: 7 pacientes se censuraron antes del primer evento en el estrato, 501 eventos en total. La codificación de los factores significativos se realizó según la Sección 6.1. Los estadios del análisis son los mismos que en la Tabla 9. Dos pacientes se excluyeron debido a falta de información sobre quimioterapia adyuvante.

10 En estos pacientes, es notable que uPA/PAI-1 tiene un impacto enorme ($b=\log HR=3,02$) pero también hay una gran interacción negativa de uPA/PAI-1 con los ganglios linfáticos ($b=\log HR=2,79$). También hay (aparentemente) un riesgo alto ($b= \log HR=5,36$) asociado con los ganglios linfáticos en este subgrupo de pacientes con 4 o más ganglios afectados, pero este número es parcialmente un artefacto de la representación en rangos fraccionarios. Para facilitar la interpretación de este HR, así como la interacción de los ganglios linfáticos con uPA/PAI-1, comparamos el riesgo para 15 frente a 4 ganglios afectados. Para pacientes con uPA/PAI-1 bajo, el HR de los pacientes con 10 ganglios afectados es aproximadamente el doble de alto que para 4 ganglios afectados, como se observa en la Tabla 11. (Si esta mera duplicación del riesgo que va de 4 a 10 ganglios parece demasiado moderada a la vista de $b=5,36$, pensar que el rango fraccionario para los ganglios linfáticos para un paciente con 4 ganglios es ya bastante alto, aproximadamente 0,78). Por el contrario, para pacientes con uPA/PAI-1 alto, la interacción significa que el HR de los pacientes con 10 ganglios 20 afectados es sólo aproximadamente 1,5 veces el de los pacientes con 4 ganglios afectados. Resumiendo, los resultados (incluyendo la interacción de los ganglios linfáticos con uPA/PAI-1) implica que el número de ganglios afectados incluso por encima de 4 es importante, pero más para uPA/PAI-1 bajo que para uPA/PAI-1 alto. En pacientes con > 4 ganglios linfáticos afectados, los beneficios de CT y HT y su relación con uPA/PAI-1 son de nuevo cualitativamente e incluso 25 cuantitativamente muy cercanos a los observados en el análisis de todos los pacientes y en el grupo con 0-3 ganglios afectados; véase la FIG. 7.

Tabla 11: Modelo de Cox multivariante (DFS) incluyendo la interacción de uPA/PAI-1 con tratamiento adyuvante en pacientes con cáncer de mama con 4 o más ganglios axilares implicados (n=784).

Factores Significativos	Codificación para la interpretación de β	valor p	Modelo final	
			β	Relación de riesgo ^b (95% Intervalo de confianza)
Ganglios linfáticos implicados	10 ganglios frente a 4 ganglios	<0,001	5,36	2,1 (1,6-2,8) ^a
Edad	rango fraccionario	0,002	-0,62	0,54 (0,36-0,80)
Estadio del tumor	resto (1) frente a pT1/pT2 (0)	0,001	0,35	1,41 (1,16-1,73)
Receptor de progesterona	rango fraccionario	0,001	-0,54	0,59 (0,43-0,80)
uPA/PAI-1	alto (1) frente a bajo (0)	0,013	3,02	20,5 (1,9-220)
Quimioterapia adyuvante	si (1) frente a no (0)	0,034	-0,34	0,71 (0,52-0,97)
Terapia endocrina adyuvante	si (1) frente a no (0)	0,002	-0,39	0,68 (0,53-0,87)
Interacción "quimioterapia*uPA/PAI-1"	ambos 1 frente a uno o ambos 0	0,040	-0,42	0,66 (0,44-0,98)
Interacción linfáticos implicados*uPA/PAI-1"	"ganglios si uPA/PAI-1 bajo: cero si uPA/PAI-1 alto: rango fraccionario de ganglios	0,039	-2,79	0,061 (0,004-0,87)

^a Relación de riesgo para pacientes con 10 ganglios positivos comparado con pacientes con 4 ganglios positivos, intervalo de confianza aproximado debido a rangos fraccionarios

^b Riesgo para rango fraccionario=1 comparado con rango fraccionario=0

6.2.8. BENEFICIOS DE CT Y HT PARA DFS EN SUBGRUPOS SEGÚN UPA/PAI-1

El efecto de uPA/PAI-1 en respuesta a terapia también se observa construyendo modelos de Cox separados para uPA/PAI-1 alto y bajo (de nuevo estratificado por conjunto de datos). En todos los pacientes, el HR es 0,68 debido a CT y 0,74 debido a HT según un modelo multivariante para el subgrupo uPA/PAI-1 bajo. En el modelo multivariante para el subgrupo de uPA/PAI-1 alto, los HR correspondientes son 0,49 debido a CT y 0,63 debido a HT. (En términos de log HR, la diferencia en HR para CT entre uPA/PAI-1 bajo y alto es aproximadamente tres errores estándar, mientras que para HT la diferencia correspondiente es sólo un tercio de un error estándar). Por lo tanto, estos modelos son consistentes con la tendencia para un mayor beneficio relativo debido a CT en pacientes con uPA/PAI-1 alto que en pacientes con uPA/PAI-1 bajo después de controlar otros factores.

Los modelos de Cox también se realizaron separadamente para pacientes con uPA/PAI-1 alto y bajo en el subgrupo de pacientes con 0-3 ganglios linfáticos afectados. En el grupo de uPA/PAI-1 bajo (n=1.418, proporción de recaída en 5 años 20%, 9% recibiendo HT, 17% recibiendo CT), resulta que ninguna de las formas de terapia adyuvante es significativa: el 95% CI para el HR de CT es 0,60-1,22 y para HT es 0,59-1,44. Debido a la incertidumbre estadística, en este subgrupo no se descarta un beneficio de bajo a moderado de las terapias. Por el contrario, en el subgrupo de uPA/PAI-1 alto (n=1.174, proporción de recaída en 5 años 38%, 10% recibiendo HT, 19% recibiendo CT), ambas formas de terapia adyuvante son significativas y fuertes con un HR de 0,51 (0,33-0,78), HT disminuye a aproximadamente la mitad el riesgo); el beneficio de CT parece ser incluso más fuerte con un HR de 0,43 (95% CI, 0,31-0,59). Comparando el resultado en estos subgrupos con el análisis de interacción para 0-3 ganglios indicado anteriormente, la detección de una interacción significativa CT*uPA/PAI-1 se pone de manifiesto en sí misma en los subgrupos uPA/PAI-1 como HR claramente diferentes con intervalos de confianza que no se cruzan. En el caso de HT, el 95% CI para los HR en los dos grupos de riesgo se superponen sustancialmente y esto es consistente con la ausencia de una interacción significativa.

En pacientes con 4 o más ganglios afectados, una regresión de Cox separada (modelo de 2 etapas) para el subgrupo de uPA/PAI-1 bajo muestra que estos pacientes se benefician significativamente de HT adyuvante con un HR de 0,62 (95% CI, 0,43-0,90) y aparentemente también de CT con un HR de 0,70 (95% CI, 0,49-0,98). Los ganglios linfáticos son un factor muy fuerte en este grupo (log HR=5,68). El beneficio de CT derivado del modelo de regresión para el grupo con 4 o más ganglios y uPA/PAI-1 alto es HR 0,60 (95% CI, 0,44-0,81). Para HT el HR es 0,68 (95% CI, 0,49-0,95). Los ganglios linfáticos son más débiles en este modelo (log HR=2,43). Estos resultados tomados conjuntamente son consistentes con el modelo completo con interacciones para pacientes con 4 o más ganglios indicado anteriormente.

6.3. DISCUSIÓN

Los presentes inventores han demostrado que la combinación particular, uPA/PAI-1 (ambos bajos frente a uno o ambos altos), consigue una discriminación de grupo de riesgo clínicamente relevante respecto y por encima de la proporcionada por cualquiera de los dos factores solo, particularmente en cáncer de mama ganglio negativo. Además, la presente invención proporciona evidencia de un beneficio de la terapia sistémica adyuvante en pacientes de alto riesgo como se define por uPA/PAI-1.

El sistema del activador del plasminógeno juega un papel importante en la invasión y metástasis tumorales (Andreasen et al., 1997, *Int J Cancer* 72: 1-22; Schmitt et al., 1997, *Thromb Haemost* 78: 285-96; Stephens et al., 1998, *Breast Cancer Res Treat* 52: 99-111). Los pacientes con cáncer de mama ganglio linfático negativo que presentan riesgo de recurrencia de la enfermedad (pacientes de alto riesgo) pueden identificarse por los niveles de uPA y PAI-1 en su tumor primario. Aproximadamente el 45% de los pacientes con cáncer de mama ganglio linfático negativo pertenecen a este grupo de alto riesgo como se define por los niveles altos de uPA y/o PAI-1 en su tumor primario. Harbeck et al., 1999, *Br J Cancer* 80: 419-26. Los pacientes de bajo riesgo con cáncer de mama ganglio linfático negativo tienen niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1 en su tumor. Este grupo de bajo riesgo, aproximadamente el 55% de todos los pacientes con cáncer de mama ganglio linfático negativo, tienen un pronóstico excelente, con una probabilidad de recaída después de 5 años de menos del 5%. Harbeck et al., 1999, *Br J Cancer* 80: 419-26. Así, hay muy pocas razones para recomendar generalmente quimioterapia adyuvante a este grupo (Thomssen et al., 2000, *Eur J Cancer* 36: 293-8; Hayes et al., 2000, *Arbiter. Eur J Cancer* 36: 302-6), aunque, en una decisión de terapia individual, es necesario considerar las opiniones del paciente sobre las elecciones de calidad de vida. Ravdin et al., 1998, *J Clin Oncol* 16: 515-21.

Los ELISA para uPA y PAI-1 son lo suficientemente robustos para uso clínico rutinario, y se garantiza la seguridad de calidad internacional. Sweep et al., 1998, *Br J Cancer* 78: 1434-1441. Para el ensayo, es suficiente un mínimo de 100 µg de tejido tumoral (correspondiente a aproximadamente 1 µg de extracto de proteína). Por lo tanto, los ELISA también pueden aplicarse a extractos preparados a partir de especímenes de biopsia core o secciones de criostato. Los puntos de corte optimizados para los ensayos usados aquí son estables con el tiempo, se corresponden bien con los encontrados por otros investigadores usando los mismos ensayos bioquímicos (Foekens et al., 1994, *J Clin Oncology* 12: 1648-1658) y se han validado recientemente en una ensayo prospectivo multicentro, Jänicke et al., 2001, *J Natl Cancer Inst* 93: 913-920. Por el contrario, no se han generado datos clínicamente relevantes consistentes aplicando

inmunohistoquímica (IHC) u otras técnicas para la determinación de la expresión de las proteínas uPA y PAI-1 en tejido de carcinoma de mama. Un estudio reciente con IHC mostró que la expresión de uPA y PAI-1 en fibroblastos estromales tiene una mayor relevancia clínica que la expresión en las células tumorales en sí mismas, al menos para los anticuerpos usados. Dublin et al., 2000, Am J Pathol 157: 1219-1227. Dicha heterogeneidad de tejido respecto a la expresión de uPA y PAI-1 en diferentes tipos celulares diferentes está bien justificada usando el procedimiento ELISA.

El hecho de que no haya evidencia contradictoria en el impacto en el pronóstico de uPA y PAI-1 en cáncer de mama es bastante único para cualquier factor biológico tumoral, en particular teniendo en cuenta el hecho de que los datos se han generado bajo varias condiciones demográficas (Europa, EEUU y Japón). En un colectivo pequeño con ganglio negativo sin terapia sistémica adyuvante, el análisis CART muestra que la combinación de uPA y PAI-1 es superior a los factores de pronóstico establecidos respecto a la selección de pacientes de bajo riesgo. También supera a otros factores biológicos tumorales tales como la sobreexpresión de la proteína HER2, catepsina D, p53, fase S, MIB1 o ploidía de ADN. Harbeck et al., 1999, Br J Cancer 80: 419-26. Incluso la amplificación del gen HER2 determinada por FISH, que también es un factor de pronóstico fuerte en cáncer de mama ganglio negativo, es complementaria, aunque más débil que uPA/PAI-1, para la selección del grupo de riesgo en cáncer de mama ganglio negativo.

La presente invención describe el gran valor clínico de ensayar tanto los niveles de uPA como de PAI-1. En un colectivo de 269 pacientes ganglio negativo sin terapia sistémica adyuvante, la condición "uno de los dos o ambos altos" identifica con alta sensibilidad a aquellos pacientes que presentan un riesgo alto de recaída mientras que todavía se mantiene un grupo de bajo riesgo sustancial clínicamente relevante. Así, esta combinación captura y dicotomiza eficazmente la información esencial obtenida por los dos factores. La mejora significativa en la discriminación del riesgo (comparado con cualquiera de los factores tomado separadamente) es notable.

En la presente invención, se detectó una interacción de uPA y PAI-1 tanto usando la asunción de riesgos proporcionales como usando un modelo de tiempo variable. El impacto de uPA y PAI-1 puede describirse frugalmente por la combinación particular uPA/PAI-1. La variación del tiempo implica que las recaídas en el grupo de alto riesgo tenderán a ocurrir en los primeros 3-4 años. Así, el no medir uno de estos dos factores podría significar perder pacientes de alto riesgo para enfermedad sistémica posterior, y en particular aquellos con riesgo de recaída *temprana*. Incluso en los grupos de riesgo definidos por los factores de pronóstico establecidos, la combinación uPA/PAI-1 permite una evaluación de grupo de riesgo significativa (Figura 5). Los pacientes con cáncer de mama ganglio negativo con niveles bajos tanto de uPA como de PAI-1 en su tumor primario, que comprenden más de la mitad de los pacientes ganglio negativo, tienen una DFS excelente en 5 años de más del 90% (Figura 4). Por el contrario, aquellos pacientes con niveles altos de uno o ambos factores tienen una DFS en 5 años comparable a la de los pacientes con varios ganglios linfáticos implicados (Figura 4).

El ensayo tanto de uPA como de PAI-1 proporciona una base valiosa para terapia en cáncer de mama ganglio negativo tanto para los pacientes de bajo como de alto riesgo. Algunos de estos pacientes están deseando someterse a tratamiento sistémico para incluso una pequeña probabilidad de beneficio. Ravdin et al., 1998, J Clin Oncol 16: 515-521. Sin embargo, otros pacientes o sus médicos expresarán una preferencia por una opción de no tratamiento, en particular respecto a la quimioterapia. El grupo de bajo riesgo identificado por uPA/PAI-1 es sustancialmente mayor que el caracterizado por los criterios de St. Gallen (Goldhirsch et al., 1998, J Natl Cancer Inst 90: 1601-1608) y así más cercanos al 70% real de pacientes ganglio negativo curados por tratamiento local-regional solo (Clark et al., 1988, Semin Oncol 15: 20-25) son candidatos a ser excluidos de la carga de quimioterapia adyuvante. Esta invención apoya el valor potencial de las mediciones de uPA y PAI-1 para definir a los pacientes ganglio negativo que presentan claramente un riesgo alto y para los cuales se recomendaría mucho el tratamiento sistémico adyuvante.

La presente invención describe un beneficio de la quimioterapia *adyuvante* y/o terapia endocrina en pacientes con uPA/PAI-1 alto. En el colectivo de pacientes como un todo, el impacto en el pronóstico univariante de uPA/PAI-1 en DFS fue sustancial en pacientes *sin* terapia sistémica adyuvante (Figura 6), resaltando la fuerte asociación de uPA y PAI-1 con un fenotipo tumoral agresivo que da lugar a la invasión y a la metástasis. Sin embargo, esta fuerza en el pronóstico disminuye en pacientes que reciben terapia sistémica adyuvante, sugiriendo un beneficio de la terapia sistémica adyuvante en este grupo de alto riesgo, al menos para DFS (Figura 6). La presente invención muestra que tanto uPA como PAI-1 son fuertes y significativos incluso en el subgrupo de pacientes ganglio positivo, la mayoría de los cuales no recibieron terapia sistémica adyuvante.

uPA y PAI-1 son los únicos factores biológicos tumorales nuevos hasta ahora que satisfacen todos los criterios estrictos que pueden usarse rutinariamente en entornos clínicos. No obstante, la presente invención muestra el valor de pronóstico de uPA/PAI-1 como factores únicos medido por ELISA robustos y con seguridad de calidad. La presente invención también muestra que la combinación de ambos factores es superior a cualquiera de los factores tomado solo y sobrepasa a los factores de pronóstico establecidos respecto a la estratificación en grupos de riesgo, en particular en cáncer de mama ganglio negativo. Además, la presente invención muestra que los pacientes de alto riesgo según uPA/PAI-1 se benefician de la terapia sistémica adyuvante.

Esta invención muestra que la relevancia clínica de estos dos factores es mayor cuando se usan en combinación y que la combinación uPA/PAI-1 apoya las estrategias terapéuticas individualizadas adaptadas al riesgo en el entorno adyuvante. Además, esta invención demuestra que uPA y PAI-1 tienen no sólo un impacto en el pronóstico clínicamente relevante sino también un impacto predictivo en el cáncer de mama primario.

5 Para los factores que no se correlacionan de manera fuerte con las decisiones del tratamiento, el problema de confusión puede reducirse por varios métodos, en particular por el uso apropiado de análisis multivariante y estratificación. Como (a diferencia del receptor de estrógeno y el receptor de progesterona) estos requerimientos se satisfacen bastante bien con uPA y PAI-1, los resultados descritos por esta invención deberían reflejar de hecho las propiedades predictivas de uPA/PAI-1. Una etapa importante en "deconvolucionar" los factores de confusión en los datos retrospectivos es introducir un modelo de puntuación estadístico multivariante usando la mayor información posible de las otras variables. Un buen modelo de puntuación reducirá la variación inexplicable de los datos y mejorará las oportunidades de observar las interacciones si están presentes. Consecuentemente, en esta invención, se aplicó una estrategia de evitar el uso de puntos de corte cuando fue posible, es decir, representando la mayor parte de las mediciones como variables continuas. La única excepción a esta estrategia de variables continuas fueron los factores uPA y PAI-1 en sí mismos para los que se aplicaron puntos de corte previamente optimizados validados en un ensayo multicentro prospectivo (Jänicke *et al.*, 2001, *Int. J. Natl. Cancer Inst.*, 93: 913-920; Harbeck *et al.*, 1999, *Breast Cancer Res. Treat.*, 54: 147-157).

Los resultados confirman que uPA/PAI-1 tienen un impacto significativo en los resultados de los pacientes pero también proporciona evidencia adicional que apoya su uso en clínica demostrando cómo los efectos de la terapia sistémica adyuvante difieren en pacientes clasificados según uPA/PAI-1. Como se ilustra en la FIG. 7, los pacientes con cáncer de mama primario con uPA/PAI-1 bajo se benefician generalmente de terapia endocrina adyuvante y quimioterapia. Sin embargo, los beneficios de la quimioterapia (pero no de la terapia endocrina) se incrementan fuertemente en pacientes con uPA/PAI-1 alto. Es importante indicar que los pacientes con uPA/PAI-1 alto también se benefician de la terapia endocrina adyuvante, aunque la quimioterapia adyuvante tiene un impacto beneficioso mayor en su DFS.

Los pacientes ganglio negativo con uPA/PAI-1 bajo tienen un riesgo muy bajo de recaída per se. La presente invención encontró que la terapia endocrina beneficia a los pacientes con uPA/PAI-1 bajo incluso con 0-3 ganglios afectados. Los pacientes ganglio negativo con uPA/PAI-1 bajo (pero no los que tienen uPA/PAI-1 alto) pueden ser candidatos a ser excluidos de la carga de quimioterapia adyuvante, pero todavía podrían beneficiarse de la terapia endocrina si está indicada - teniendo en cuenta los efectos secundarios conocidos de la quimioterapia y los beneficios preventivos de la terapia endocrina.

Los análisis retrospectivos en cáncer de mama avanzado y metastásico mostraron una respuesta disminuida para la terapia endocrina paliativa en pacientes con niveles altos de uPA o PAI-1 en tejido tumoral primario comparado con los pacientes con niveles bajos (Jänicke *et al.*, 1994, "Urokinase (uPA) and PAI-1 as selection criteria for adjuvant chemotherapy in axillary node-negative breast cancer patients", en *Prospects in Diagnosis and Treatment of Cancer*, Schmitt *et al.* eds: 207-218; Foekens *et al.*, 1995, *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 751-756). Esto no debería considerarse como una contradicción respecto a los resultados de esta invención, que se obtuvieron en el entorno adyuvante, sino que puede entenderse teniendo en cuenta la biología del tumor subyacente. Los niveles altos de uPA y PAI-1 reflejan un fenotipo agresivo que puede ser superado o suprimido por la terapia sistémica temprana como en el entorno adyuvante pero puede ser demasiado avanzado para la respuesta a terapia paliativa en un estadio posterior.

La aplicación clínica pretendida de la presente invención es explotar al máximo la información sobre evaluación del riesgo proporcionada por uPA/PAI-1 en el contexto de la toma de decisión clínica en el cáncer de mama primario. La base racional no está limitada al descubrimiento de un grupo de riesgo muy bajo que podría excluirse totalmente de un tratamiento sistémico sino a entender tomando como base la evidencia actualmente disponible - incluyendo las mediciones de uPA y PAI-1 - qué opciones de tratamiento benefician a qué pacientes. En conclusión, los pacientes con cáncer de mama con uPA/PAI-1 alto tienen un estadio de la enfermedad más agresivo del que los factores convencionales harían creer al médico de otra manera. Sin embargo, la presente invención proporciona evidencia de que la desventaja de DFS debida a su fenotipo de enfermedad más agresivo pueden contrarrestarse en gran medida por la terapia endocrina adyuvante y en particular por la quimioterapia adyuvante como se ilustra en la Figura 7. Aunque uPA/PAI-1 no son las únicas variables que deben tenerse en cuenta para las decisiones sobre terapia, la presente invención sugiere que podría conseguirse una mejora significativa y sustancial en el apoyo de la decisión ensayando a los pacientes con cáncer de mama para uPA y PAI-1. Por lo tanto, considerando la biología del tumor subyacente y nuestro descubrimiento de que los pacientes de alto riesgo según uPA/PAI-1 se benefician de la terapia sistémica adyuvante convencional, particularmente de quimioterapia, es muy prometedor combinar nuevos terapéuticos dirigidos al sistema de activación del plasminógeno con dicha terapia sistémica convencional.

Pueden hacerse muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Las realizaciones específicas descritas en la presente memoria se ofrecen sólo

como ejemplo y la invención debe limitarse sólo por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de los equivalentes a los que dichas reivindicaciones tienen derecho.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AMERICAN DIAGNÓSTICA, INC.

<120> MÉTODOS PARA SELECCIONAR REGÍMENES DE TRATAMIENTO
Y PREDECIR RESULTADOS EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA

<130> 9471-013-228

<140> Para ser asignado

<141> Adjunto

<150> 60/356, 928

<151> 2002-02-13

<150> 60/402, 311

<151> 2002-08-09

<160> 4

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 1296

<212> ADH

<213> Homo Sapiens

<400> 1

atgagagccc	tgctgggcgc	cctgcttctc	tgctcctgg	tcgtgagcga	ctocaaaggo	60
agcaatgaac	ttcatcaagt	tccatcgaac	tgtcactgtc	taaattggagg	aacatgtgtg	120
tccaacaagt	acttctocaa	cattcaactgg	tgcaactgcc	caaagaaatt	oggagggcag	180
caactgtgaaa	tagataagtc	aaaaacctgc	tatgagggga	atggtcactt	ttaccgagga	240
aaggccagca	ctgacaacat	gggcgggcgc	tgcootgccct	ggaactctgc	caactgtectt	300
cagcaaacgt	accatgocaa	cagatctgat	gctcttcagc	tgggcotggg	gaaacataat	360
taotgcagga	accagacaa	cgggagggca	ccotggtgct	atgtgcaggt	gggcctaaag	420
cogcttgtcc	aagagtgcac	ggtgcatgac	tgccagatg	gaaaaagcc	ctctctoct	480
ccagaagaat	taaaatttca	gtgtggccaa	aagactctga	ggccccgctt	taagattatt	540
gggggagaat	tcaccacat	cgagaaccag	ccctggtttg	cgcccatcta	caggaggcac	600
egggggggct	ctgtcaccta	cgtgtgtgga	ggcagcctca	tcagcccttg	ctgggtgatc	660
agcgcacac	actgcttcat	tgattaocaa	aagaaggagg	actacatcgt	ctacotgggt	720
cgctcaaggc	ttaactocaa	caegcaaggg	gagatgaagt	ttgagggtga	aaacotoatc	780
ctacacaagg	actacagcgc	tgacaagctt	gotcaocaa	atgacattgc	cttgotgaag	840
atccgttcca	aggagggcag	gtgtgcgcag	ccatccggga	ctatacagac	catctgootg	900
ccctogatgt	ataacgatcc	ccagtttggc	acaagotgtg	agatoactgg	ctttggaaaa	960
gagaattcta	ccgactatct	ctatccggag	cagctgaaaa	tgactgttgt	gaagotgatt	1020
tcccaceggg	agtgtcagca	gccccactac	tacggctctg	aagtcaccac	caaatgctg	1080
tgtgotgctg	accacagtg	gaaaacagat	tcctgccagg	gagactcagg	gggaccctc	1140
gtotgttccc	tocaaggcog	catgactttg	actggaattg	tgagctgggg	ccgtggatgt	1200
gocctgaagg	acaagccagg	cgtctacacg	agagtctcac	acttcttacc	ctggatccgc	1260
agtcacacca	aggaagagaa	tggcotggoc	ctctga			1296

<210> 2

<211> 431

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Met Arg Ala Leu Leu Ala Arg Leu Leu Leu Cys Val Leu Val Val Ser
1 5 10 15

Asp Ser Lys Gly Ser Asn Glu Leu His Gln Val Pro Ser Asn Cys Asp
 20 25 30
 Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile
 35 40 45
 His Trp Cys Asn Cys Pro Lys Lys Phe Gly Gly Gln His Cys Glu Ile
 50 55 60
 Asp Lys Ser Lys Thr Cys Tyr Glu Gly Asn Gly His Phe Tyr Arg Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Ser Thr Asp Thr Met Gly Arg Pro Cys Leu Pro Trp Asn Ser
 85 90 95
 Ala Thr Val Leu Gln Gln Thr Tyr His Ala His Arg Ser Asp Ala Leu
 100 105 110
 Gln Leu Gly Leu Gly Lys His Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Arg
 115 120 125
 Arg Arg Pro Trp Cys Tyr Val Gln Val Gly Leu Lys Pro Leu Val Gln
 130 135 140
 Glu Cys Met Val His Asp Cys Ala Asp Gly Lys Lys Pro Ser Ser Pro
 145 150 155 160
 Pro Glu Glu Leu Lys Phe Gln Cys Gly Gln Lys Thr Leu Arg Pro Arg
 165 170 175
 Phe Lys Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp
 180 185 190
 Phe Ala Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val
 195 200 205
 Cys Gly Gly Ser Leu Met Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His
 210 215 220
 Cys Phe Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly
 225 230 235 240
 Arg Ser Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val
 245 250 255
 Glu Asn Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His
 260 265 270
 His Asn Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys
 275 280 285
 Ala Gln Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr
 290 295 300
 Asn Asp Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Asn Ser Thr Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gln Leu Lys Met Thr Val
 325 330 335
 Val Lys Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly
 340 345 350
 Ser Glu Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys
 355 360 365
 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu
 370 375 380
 Gln Gly Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys
 385 390 395 400
 Ala Leu Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu
 405 410 415
 Pro Trp Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu
 420 425 430

<210> 3
 <211> 1209
 <212> ADH
 <213> Homo Sapiens

<400> 3
 atgcagatgt ctccagccct cacotgoccta gtocctgggccc tggccttgt ctttgggtgaa 60
 gggctotgctg tgcaccatcc cccatocctac gtggcccaacc tggcctcaga cttcgggggtg 120

```

agggtgttcc agcaggtggc gcaggcctcc aaggaccgca acgtggtttt ctoaccctat 180
ggggtggcct cgggtgttggc catgctccag ctgaoaacag gaggagaaa ccaagcagcag 240
attcaagcag ctatgggatt caagattgat gacaagggca tggcccccgc cctccggcat 300
ctgtacaagg agctcatggg gccatggaac aaggatgaga tcagcaccac agacgggatc 360
ttcgtccagg gggatctgaa gctggtoacg ggcttcatgc cccacttott caggctgttc 420
oggagcacgg tcaagcaagt ggacttttca gaggtggaga gagccagatt catcatoaat 480
gactgggtga agacacacac aaaaggtatg atcagcaact tgcttgggaa aggagccgtg 540
gaccagctga cacggctggt gctgggtgat gccctctact tcaacggcca gtggaagact 600
cccttcccgc actccagcac ccaccgcccgc ctottccaca aatcagacgg cagcaactgtc 660
tctgtgccc a tgatggctoa gaccaacaag ttcaactata ctgagttcac cagcccgat 720
ggcattact acgacatcct ggaactgcc taccacgggg acacccctcag catgttcatt 780
gctgcccctt atgaasaaga ggtgcctctc totgcccctca ccaacattct gagtgcccag 840
ctcatcagcc actggaaagg caacatgacc aggctgcccc gctcctggt totgcccagg 900
ttctccctgg agactgaagt cgacctcagg aagccctag agaacctggg aatgaccggac 960
atgttcagac agtttcaggc tgacttcaag agtctttcag accaagagcc totccacgtc 1020
gogcaggcgc tgcagaaagt gaagatcgag gtgacagaga gtggcacggt ggctcctca 1080
tcacacgctg tcatagtctc agcccgcatg gccccgagg agatcatcat ggacagaccc 1140
ttctcttttg tggtcgggca caaccccaca ggaacagtcc ttttcatggg ccaagtgatg 1200
gaacctga 1209

```

<210> 4
 <211> 402
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 4

```

Met Gln Met Ser Pro Ala Leu Thr Cys Leu Val Leu Gly Leu Ala Leu
 1          5          10          15
Val Phe Gly Glu Gly Ser Ala Val His His Pro Pro Ser Tyr Val Ala
          20          25          30
His Leu Ala Ser Asp Phe Gly Val Arg Val Phe Gln Gln Val Ala Gln
          35          40          45
Ala Ser Lys Asp Arg Asn Val Val Phe Ser Pro Tyr Gly Val Ala Ser
          50          55          60
Val Leu Ala Met Leu Gln Leu Thr Thr Gly Gly Glu Thr Gln Gln Gln
          65          70          75          80
Ile Gln Ala Ala Met Gly Phe Lys Ile Asp Asp Lys Gly Met Ala Pro
          85          90          95
Ala Leu Arg His Leu Tyr Lys Glu Leu Met Gly Pro Trp Asn Lys Asp
          100          105          110
Glu Ile Ser Thr Thr Asp Ala Ile Phe Val Gln Arg Asp Leu Lys Leu
          115          120          125
Val Gln Gly Phe Met Pro His Phe Phe Arg Leu Phe Arg Ser Thr Val
          130          135          140
Lys Gln Val Asp Phe Ser Glu Val Glu Arg Ala Arg Phe Ile Ile Asn
          145          150          155          160
Asp Trp Val Lys Thr His Thr Lys Gly Met Ile Ser Asn Leu Leu Gly
          165          170          175
Lys Gly Ala Val Asp Gln Leu Thr Arg Leu Val Leu Val Asn Ala Leu
          180          185          190
Tyr Phe Asn Gly Gln Trp Lys Thr Pro Phe Pro Asp Ser Ser Thr His
          195          200          205
Arg Arg Leu Phe His Lys Ser Asp Gly Ser Thr Val Ser Val Pro Met
          210          215          220
Met Ala Gln Thr Asn Lys Phe Asn Tyr Thr Glu Phe Thr Thr Pro Asp
          225          230          235          240
Gly His Tyr Tyr Asp Ile Leu Glu Leu Pro Tyr His Gly Asp Thr Leu
          245          250          255
Ser Met Phe Ile Ala Ala Pro Tyr Glu Lys Glu Val Pro Leu Ser Ala
          260          265          270
Leu Thr Asn Ile Leu Ser Ala Gln Leu Ile Ser His Trp Lys Gly Asn
          275          280          285

```

Met	Thr	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Pro	Lys	Phe	Ser	Leu	Glu
	290					295					300				
Thr	Glu	Val	Asp	Leu	Arg	Lys	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gly	Met	Thr	Asp
305					310					315					320
Met	Phe	Arg	Gln	Phe	Gln	Ala	Asp	Phe	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Gln	Glu
				325					330					335	
Pro	Leu	His	Val	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Val	Asn
			340					345					350		
Glu	Ser	Gly	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Val	Ser	Ala
		355					360					365			
Arg	Met	Ala	Pro	Glu	Glu	Ile	Ile	Met	Asp	Arg	Pro	Phe	Leu	Phe	Val
	370					375					380				
Val	Arg	His	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Val	Leu	Phe	Met	Gly	Gln	Val	Met
385					390					395					400
Glu	Pro														

REIVINDICACIONES

1. Un método para seleccionar de dos o más regímenes de tratamiento, un régimen de tratamiento que tiene el mayor beneficio esperado para un paciente con cáncer de mama primario o un método para predecir un beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de mama seleccionando de dos o más regímenes de tratamiento, un régimen de tratamiento que tiene el mayor beneficio esperado, teniendo dicho paciente tejido tumoral primario, comprendiendo dicho método:
- 5 (a) medir el nivel de uPA y el nivel de PAI-1 o el ARNm que codifica uPA y el ARNm que codifica PAI-1 en una muestra de dicho tejido tumoral primario de dicho paciente;
- 10 (b) clasificar a dicho paciente como de bajo riesgo si el nivel de uPA es menor que un valor de corte de uPA de al menos el percentil 55 y como máximo el percentil 75 de los niveles normalizados de uPA en una población aleatorizada de pacientes con cáncer de mama y el nivel de PAI-1 es menor que un valor de corte de PAI-1 de al menos el percentil 61 y como máximo el percentil 81 de los niveles normalizados de PAI-1 en una población aleatorizada de pacientes con cáncer de mama o como de alto riesgo si el nivel de uPA es mayor que el valor de corte de uPA o el nivel de PAI-1 es mayor que el valor de corte de PAI-1;
- 15 (c) si dicho paciente se clasifica como de bajo riesgo en la etapa (b), seleccionar un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de bajo riesgo; y
- 20 (d) si dicho paciente se clasifica como de alto riesgo en la etapa (b), seleccionar un régimen de tratamiento de dichos dos o más regímenes de tratamiento que resulta en el mayor beneficio esperado en una población comparable de pacientes con cáncer de alto riesgo.
2. El método de la reivindicación 1 en el que si dicho paciente se clasifica como de alto riesgo, el régimen de tratamiento seleccionado se selecciona de quimioterapia, quimioterapia adyuvante, quimioterapia CMF adyuvante, quimioterapia no CMF adyuvante, quimioterapia que contiene antraciclina adyuvante, quimioterapia que contiene taxanos adyuvante, terapia endocrina adyuvante, terapia con radiación, terapia génica, inmunoterapia o terapia biológica-tumoral.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 en el que dicho ARNm que codifica uPA y el ARNm que codifica PAI-1 se miden por amplificación con RT-PCR.
4. El método de la reivindicación 1 en el que dicha población comparable se define por el estado ganglionar, número de ganglios afectados, tamaño del tumor, grado del tumor, edad del paciente, estado de receptores hormonales y estado menopáusico.
- 30 5. El método de la reivindicación 1 en el que dicho paciente es ganglio negativo.
6. El método de la reivindicación 1 en el que dicho paciente no tiene más de 3 ganglios linfáticos afectados.
7. El método de la reivindicación 1 en el que, si dicho paciente se clasifica como de bajo riesgo, el régimen de tratamiento seleccionado se selecciona de no tratamiento, terapia con radiación o terapia endocrina adyuvante.
8. El método de la reivindicación 1 en el que dicha muestra se recoge por biopsia core o aspiración de fluido corporal.
- 35 9. El método de la reivindicación 1 en el que dicho nivel de uPA y dicho nivel de PAI-1 se miden por cuantificación *in situ*.
10. El método de la reivindicación 1 en el que dicho nivel de uPA y dicho nivel de PAI-1 se miden usando microscopía de inmunofluorescencia o inmunoelectrónica.
11. El método de la reivindicación 10 en el que dicho nivel de uPA y dicho nivel de PAI-1 se miden cuantitativamente contando el número de granos de marcaje en dicha muestra.
- 40 12. El método de la reivindicación 1 en el que dicha muestra es un espécimen histológico de dicho paciente.
13. El método de la reivindicación 12 en el que dicho espécimen histológico es una sección de tejido incluida en parafina.
14. El método de la reivindicación 13 en el que dicho nivel de uPA y dicho nivel de PAI-1 se miden poniendo en contacto dicha sección de tejido con anticuerpos uPA y anticuerpos PAI-1.
- 45 15. El método de la reivindicación 1 en el que dicho régimen de tratamiento para pacientes de alto riesgo es la administración de fármacos bifosfonato al paciente.

ATGAGAGCCC	TGCTGGCGCG	CCTGCTTCTC	TGCSTCCTGG	TCGTGAGCGA	CTCCAAAGGC	60
AGCAATGAAC	TTCMTCAAGT	TCCATCGAAC	TGTGACTGTC	TAAATGGAGG	AACATGTGTG	120
TCCAACRAGT	ACTTCTCCAA	CATTCACTGG	TGCAACTGCC	CBAAGAAATT	CGGAGGGCAG	180
CACTGTGAAA	TAGATAAGTC	AAAAACCTGC	TATGAGGGGA	ATGGTCACTT	TTACCGAGGA	240
AAGGCCAGCA	CTGACACCAT	GGGCCGGCCC	TGCCTGCCCT	GGAACTCTGC	CACTGTCTTT	300
CAGCAAACGT	ACCATGCCCA	CAGATCTGAT	GCTCTTCAGC	TGGGCCTGGG	GAAACATAAT	360
TACTGCAGGA	ACCCAGACAA	CCGGAGGCGA	CCCTGGTGCT	ATGTGCAGGT	GGGCCTAARG	420
CCGCTTGTC	AAGAGTGCAT	GGTGCATGAC	TGCGCAGATG	GAAAAAAGCC	CTCCTCTCCT	480
CCAGAAGAAT	TAAAATTCA	GTGTGGCCAA	AAGACTCTGA	GGCCCCGCTT	TAAGATTATT	540
GGGGGAGAAT	TCACCACCAT	CGAGAACCAG	CCCTGGTTTG	CGGECATCTA	CAGGAGGCAC	600
CGGGGGGGCT	CTGTACCTA	CGTGTGTGGA	GGCAGCCTCA	TCAGCCCTTG	CTGGGTGATC	660
AGCGCCACAC	ACTGCTTCAT	TGATTACCCA	AAGAAGGAGG	ACTACATCGT	CTACCTGGGT	720
CGCTCAAGGC	TTAACTCCAA	CACGCAAGGG	GAGATGAAGT	TTGAGGTGGA	AAACCTCATC	780
CTACACAAGG	ACTACAGCGC	TGAQACGCTT	GCTCACCACA	ATGACATGTC	CTTGCTGAAG	840
ATCCGTTCCA	AGGAGGGCAG	GTGTGCGCAG	CCATCCCGGA	CTATACAGAC	CATCTGCCTG	900
CCCTCGATGT	ATAACGATCC	CCAGTTTGGC	ACAAGCTGFG	AGATCACTGG	CFTTGGAAAA	960
GAGAATTCTA	CCGACTATCT	CTATCCGGAG	CAGCTGAAAA	TGACTGTTGT	GAAGCTGATT	1020
TCCCACCGGG	AGTGTGAGCA	GCCCCACTAC	TACGGCTCTG	AAGTCACCAC	CAAAATGCTG	1080
TGTGCTGCTG	ACCCACAGTG	GAAAACAGAT	TCCTGCCAGG	GAGACTCAGG	GGGACCCCTC	1140
GTCTGTTCCC	TCCAAGGCCG	CATGACTTTG	ACTGGAATTG	TGAGCTGGGG	CCGTGGATGT	1200
GCCTGAAGG	ACRAGCCAGG	CGTCTACAGC	AGAGTCTCAC	ACTTCTTACC	CTGGATCCGC	1260
AGTCACACCA	AGGAAGGAA	TGGCCTGGCC	CTCTGA			1296

FIG. 1A

MRALLARLLL CVLVVSDSKG SNEHQVPSN CDCLNGGTCV SNKYFSNIHW
CNCPPKFGGQ HCEIDKSKTC YEGNGHFYRG KASTDTMGRP CLPWNSATVL
QQTYHAHRSD ALQLGLGKHN YCRNPDNRRR PWCYVQVGLK PLVQECMVHD
CADGKKPSSP PEELKFQCGQ KTLRPRFKII GGEFTTIENQ PWFAAIYRRH
RGGSVTYVCG GSLMSPCWVI SATHCFIDYP KKEDYIVYLG RSRLNSNTQG
EMKFEVENLI LHKDYSADTL AHNNDIALLK IRSKEGRCAQ PSRTIQTICL
PSMYNDPQFG TSCEITGFGK ENSTDYLYPE QLKMTVVKLI SHRECQQPHY
YGSEVTTKML CAADPQWKTD SCQGDGGPL VCSLQGRMTL TGIVSWGRGC
ALKDKPGVYT RVSHFLPWIR SHTKEENGLA L'

FIG. 1B

ATGCAGATGT	CTCCAGCCCT	CACCTGCCTA	GTCCTGGGCC	TGGCCCTTGT	CTTTGGTGAA	60
GGGTCTGCTG	TGCACCAATCC	CCCATCCTAC	GTGGCCACC	TGGCCCTCAGA	CTTCGGGGTG	120
AGGGTGTTC	AGCAGGTGGC	GCAGGCCTCC	AAGGACCGCA	ACGTGGTTTT	CTCACCCCTAT	180
GGGGTGGCCT	CGGTGTTGGC	CATGCTCCAG	CTGACAACAG	GAGGAGAAAC	CCAGCAGCAG	240
ATTCAAGCAG	CTATGGGATT	CAAGATTGAT	GACAAGGGCA	TGGCCCCCGC	CCTCCGGCAT	300
CTGTACAAGG	AGCTCATGGG	GCCATGGAAC	AAGGATGAGA	TCAGCACCAC	AGACGCGATC	360
TTCGTCCAGC	GGGATCTGAA	GCTGGTCCAG	GGCTTCATGC	CCCCTTCTT	CAGGCTGTTC	420
CGGAGCACGG	TCAAGCAAGT	GGACTTTTCA	GAGGTGGAGA	GAGCCAGATT	CATCATCANT	480
GACTGGGTGA	AGACACACAC	AAAAGGTATG	ATCAGCAACT	TGCTTGGGAA	AGGAGCCGTG	540
GACCAGCTGA	CACGGCTGGT	GCTGGTGAAT	GCCCTCTACT	TCACCGCCA	GTGGAAGACT	600
CCCTTCCCG	ACTCCAGCAC	CCACCGCCG	CTCTCCACA	AATCAGACGG	CAGCACTGTC	660
TCTGTGCCCA	TGATGGCTCA	GACCAACAAG	TTCAACTATA	CTGAGTTCAC	CACGCCCGAT	720
GGCCATTACT	ACGACATCCT	GGAAGTCCC	TACCACGGGG	ACACCCTCAG	CATGTTTATT	780
GCTGCCCTT	ATGAAAAGA	GGTGCCTCTC	TCTGCCCTCA	CCAACATTCT	GAGTGCCAG	840
CTCATCAGCC	ACTGGAAGG	CAACATGACC	AGGCTGCCCC	GCCTCCTGGT	TCTGCCCAAG	900
TTCTCCCTGG	AGACTGAAGT	CGACCTCAGG	AAGCCCCTAG	AGAACCTGGG	AATGACCGAC	960
ATGTTCAGAC	AGTTTCAGGC	TGACTTCACG	AGTCTTTCAG	ACCAAGAGCC	TCTCCACGTC	1020
GCGCAGGCGC	TGCAGAAAGT	GAAGATCGAG	GTGAACGAGA	GTGGCAGGCT	GCCCTCCTCA	1080
TCCACAGCTG	TCATAGTCTC	AGCCCCGATG	GCCCCCGAGG	AGATCATCAT	GGACAGACCC	1140
TTCTCTTTG	TGGTCCGGCA	CAACCCCA	GGAACAGTCC	TTTTCATGGG	CCAAGTGATG	1200
GAACCCCTGA						1209

FIG. 2A

MQMSPALTCCLVGLALVFGEGSAVHHPPSYVAHLASDFGVRVFQQVAQ
ASKDRNVVFSYPYGVASVLAMLQLTTGGETQQQIQAAAMGFKIDDKGMAP
ALRHLYKELMGPWNKDEISTTDAIFVQRDLKLVQGFMPHEFRLEFRSTV
KQVDFSEVERARFIINDWVKHTHTKGMISNLLGKGAVDQLTRLVVLVNAL
YFNGQWKTPFPDSSTHRRLFHKSDGSTVSVPMMAQTNKFNYTEETTPD
GHYYDILELPYHGDTLSMFIAAPYEKEVPLSALTNILSAQLISHWKGN
MTRLPRLLVLPKFSLETEVDLRKPLENLGMTDMFRQFQADFTSLSDQE
PLHVAQALQKVKIEVNESGTVASSSTAVIVSARMAPEEIIMDRPFLFV
VRHNPTGTVLFMGQVMEP

FIG. 2B

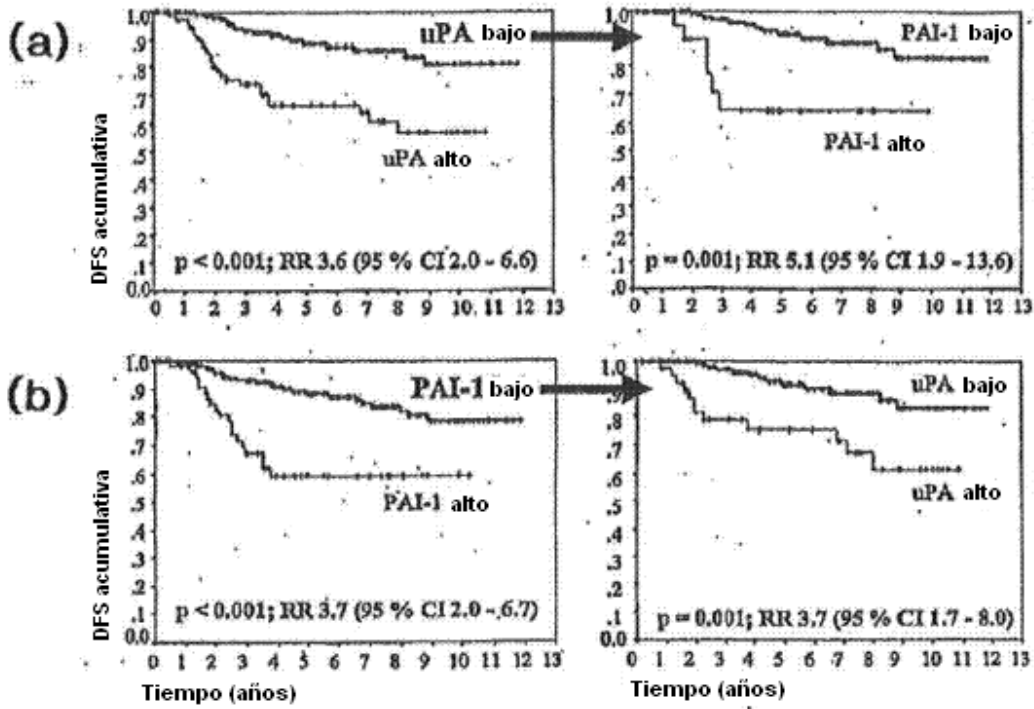


FIG. 3

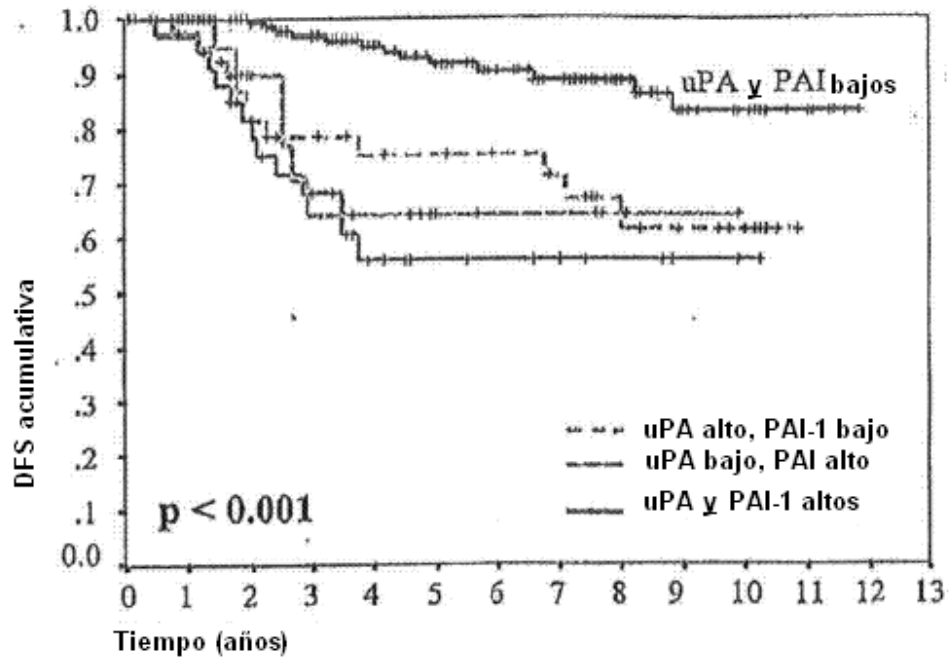


FIG. 4

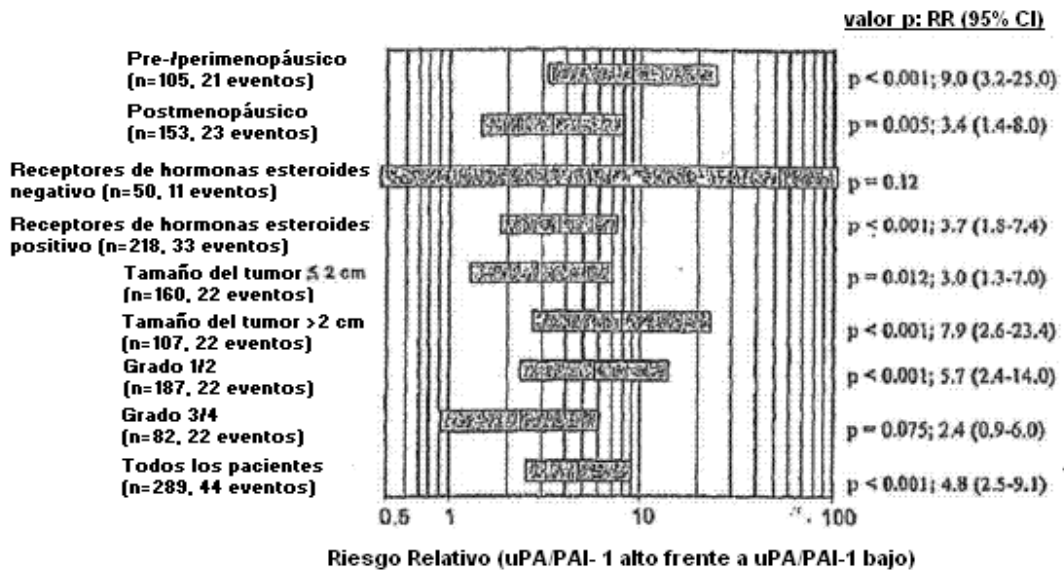


FIG. 5

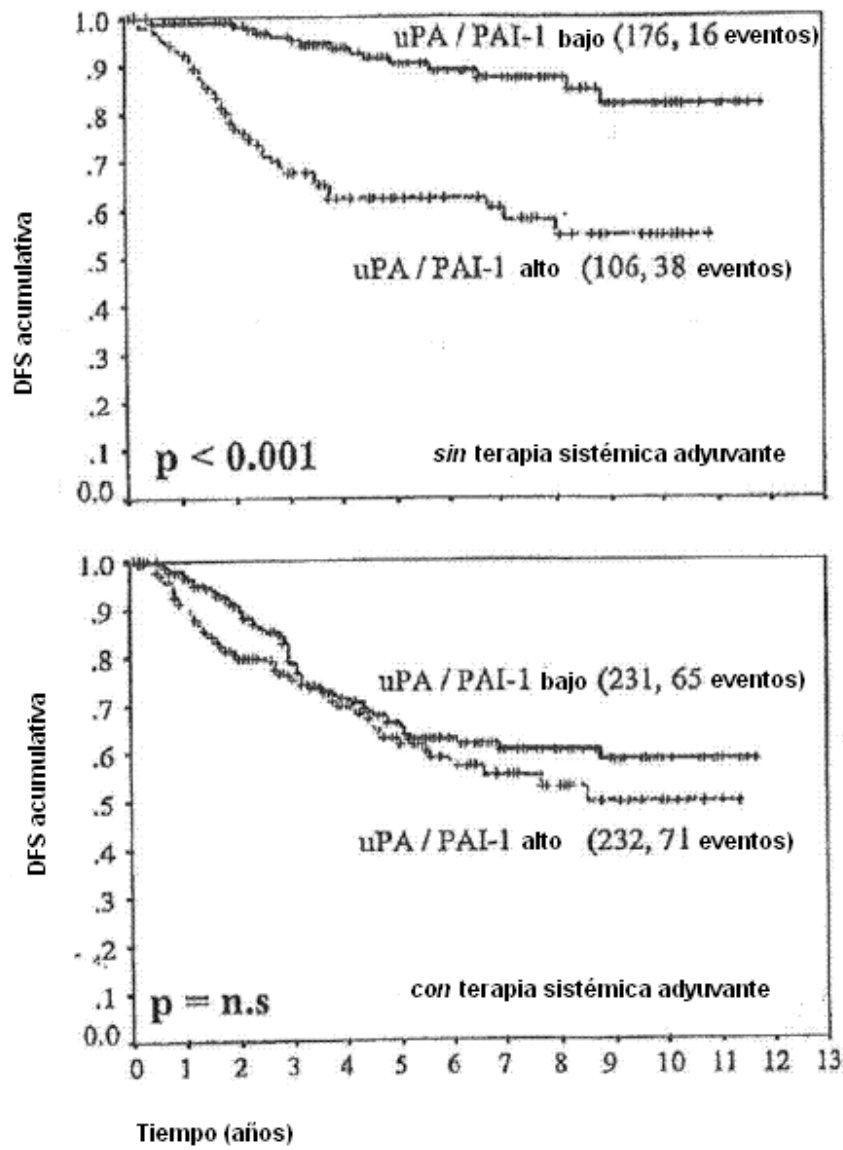


FIG. 6

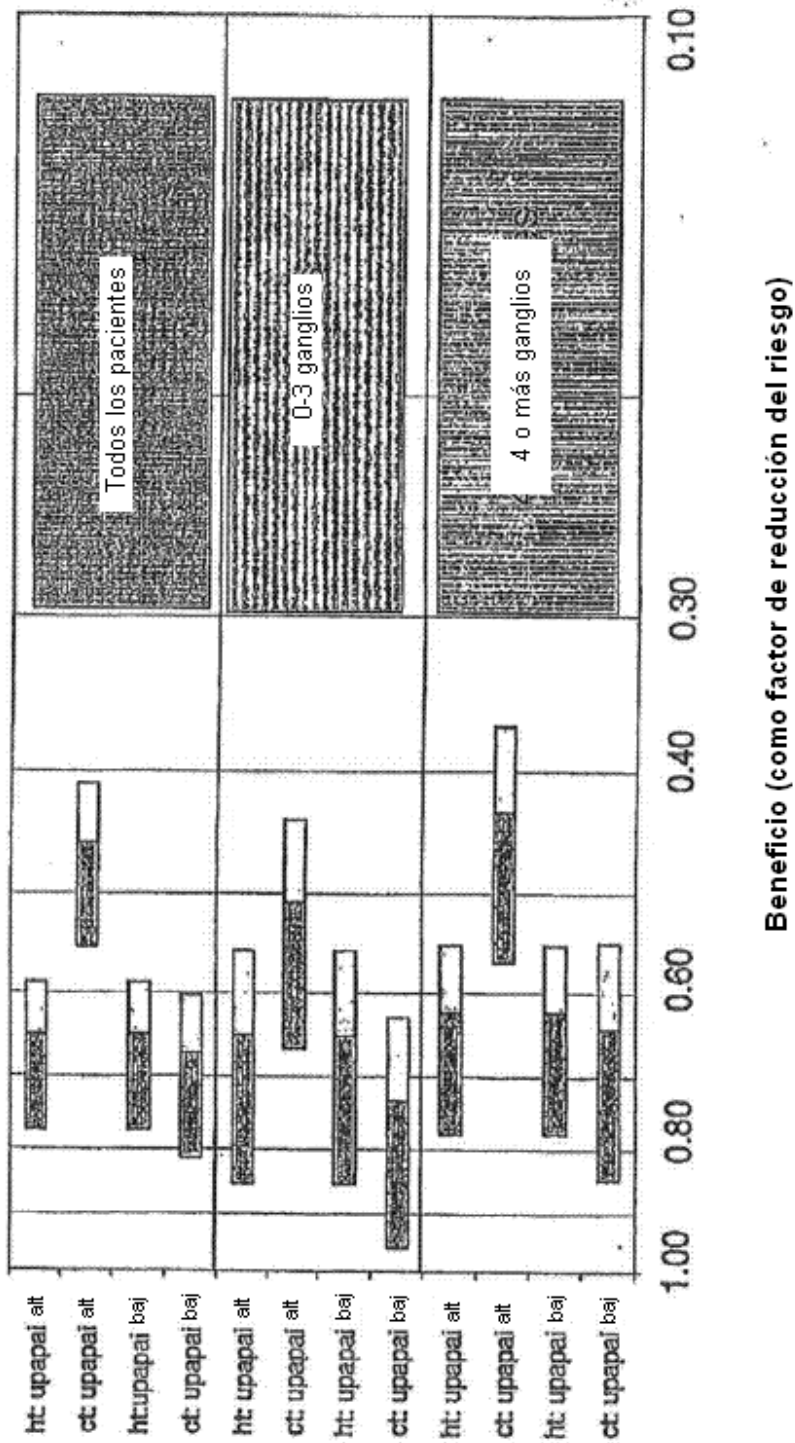


FIG. 7