

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 890**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2008 E 08840139 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2012 EP 2208070**

54 Título: **Ensayo de diagnóstico, predictivo y de pronosis para el cáncer**

30 Prioridad:

15.10.2007 GB 0720113

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

15.02.2013

73 Titular/es:

**CAMBRIDGE CANCER DIAGNOSTICS LIMITED
(100.0%)
CROWN POINT
ELY CAMBRIDGESHIRE CB7 4AU, GB**

72 Inventor/es:

**STOEBER, KAI y
WILLIAMS, GARETH, HAYDEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 890 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

Ensayo de diagnóstico, predictivo y de pronóstico para el cáncer

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a protocolos de pronóstico y de tratamiento del cáncer.

Antecedentes

10 La mayoría de las células del cuerpo humano están presentes en estados no proliferativos, fuera de ciclo, y sólo una población minoritaria está en ciclo activo. Estas células en ciclo están localizadas principalmente en compartimentos amplificadores de células en tránsito y precursoras de tejidos en autorrenovación, tales como el cérvix, el colon o la piel. En contraste, la mayoría de las células funcionales (por ejemplo, hepatocitos) están presentes en un estado quiescente (G0), detenido de modo reversible, o se han retirado irreversiblemente del ciclo de división celular mitótica hacia estados diferenciados de fase final (por ejemplo, neuronas, miocitos, o células epiteliales colónicas superficiales). Los cánceres, por el contrario, se caracterizan por un crecimiento celular incontrolado y, por tanto, contienen una alta proporción de células en ciclo.

15 Las células responden a mitógenos en su entorno en un momento discreto en G1, denominado punto de restricción. La ausencia de mitógenos no afecta al avance del ciclo celular a través de la fase S, G2 y M hasta que las células vuelven a su ventana sensible en G1. En respuesta a una alta densidad celular o a la privación de mitógenos, las células acumulan un contenido en ADN 2N y salen hacia G0. Las transiciones de fases del ciclo celular están dirigidas por cambios en las parejas de ciclina-CDK. La ciclina D-CDK4, la ciclina D-CDK6, y la ciclina E-CDK2 regulan G0/G1, y son necesarias para la actividad E2F completa. La fase S es iniciada por la ciclina A-CDK2, y la ciclina B-CDK1 regula el avance a través de G2 y la entrada en la mitosis. Lo que distingue a las células en los estados fuera de ciclo de las células dentro del ciclo sigue sin estar aclarado.

20 El cáncer es un grupo complejo de enfermedades heterogéneas provocadas por la acumulación de mutaciones génicas, que aumentan la actividad de genes reguladores que estimulan la proliferación celular y disminuyen la actividad de proteínas que normalmente la reprimen. La activación de oncogenes estimuladores dominantes o la inactivación de genes supresores de tumores recesivos a través de mutaciones puntuales, amplificación de genes, hipermetilación, translocación, o interacción con oncoproteínas víricas, puede afectar a todos los niveles de las vías de señalización del crecimiento que incluyen mitógenos, receptores de factores del crecimiento mitogénicos, Ras, Raf, ABL, PI3 quinasa AKT corriente arriba de moléculas tales como p16INK4A, Myc, ciclina D, ciclina E, pRB y p53 corriente abajo.

25 La formación de perfiles de expresión de genes en micromatrices es perfectamente adecuada para el análisis de las complejas alteraciones discontinuas, interactivas y multifactoriales en la expresión génica que caracterizan la tumorigénesis y en la actualidad es un área de investigación intensiva dirigida a la identificación de firmas moleculares exclusivas que puedan aprovecharse para el diagnóstico y la pronóstico del cáncer. De manera interesante, las matrices de expresión incluyen una firma de proliferación, genes cuyo patrón de expresión se correlaciona con un grado del tumor (estado de diferenciación), estado del ciclo celular y tiempos de duplicación. Esta firma de proliferación es uno de los patrones de expresión génica más destacados observados en los conjuntos de datos de tumores, independientemente del tejido del que se derive, e incluye muchos genes regulados por el ciclo celular, tales como E2F1, BUB1, PLK1, ciclinas E1, D1 y B1.

30 Por desgracia, la actuación real de las reglas de predicción que emplean la expresión génica no ha resultado ser tan informativa como parecía que iba a ser en un principio para muchos tipos de tumores, y la lista de genes identificados puede ser muy inestable. Por ejemplo, la mayoría de las reglas predictivas que emplean la expresión génica no han proporcionado una clasificación de pronóstico significativamente mejorada para el cáncer de mama cuando se comparan con los criterios clinicopatológicos convencionales, tales como el estado de diferenciación del tumor, el grado de difusión y el índice de proliferación. En efecto, se ha descubierto que muchas de las firmas génicas publicadas que predicen una supervivencia sin metástasis distante en cánceres se correlacionan significativamente con el estado de diferenciación.

35 La estrategia de micromatrices global para la identificación de firmas de proliferación clínicamente útiles tiene una restricción potencial. En primer lugar, la estrategia de micromatrices en una parte presupone un modelo de tumor de un único compartimento, en el que los cánceres están compuestos de células en crecimiento exponencial en proliferación. Sin embargo, los neoplasmas son muy heterogéneos con respecto al estado del ciclo celular de las células tumorales individuales. Por ejemplo, en tumores de grado bajo bien diferenciados, sólo una fracción muy pequeña de las células tumorales clonogénicas pueden estar en ciclo, y la mayoría ya han ejecutado sus programas de diferenciación y se han retirado irreversiblemente del ciclo hacia un estado diferenciado (compartimento estéril). Así, los trastornos hiperproliferativos benignos (por ejemplo, hiperplasia) y el crecimiento reparador fisiológico, condiciones patológicas reactivas que contienen un gran número de células mitóticas, pueden tener unas firmas de proliferación mayores que los cánceres bien diferenciados.

- En segundo lugar, las células tumorales *in vivo* también pueden retirarse irreversiblemente del ciclo hacia un estado G0 no proliferativo. En efecto, en muchos tumores, las células no proliferativas son mayoría; es decir, la fracción en crecimiento (la proporción de células proliferativas frente a las células totales) es menor que 0,5. Esta situación quizás no es sorprendente, porque los tejidos normales están compuestos de elementos mixtos en proliferación y en no proliferación, y un remanente de este comportamiento complejo está arraigado en la mayoría de los cánceres. La presencia de células neoplásicas benignas contaminantes, estroma tumoral, folículos linfoides, infiltrados inflamatorios intra- y peritumorales, y otros tejidos conectivos, tales como vasos sanguíneos, también distorsiona el análisis añadiendo un gran número de células con otras cinéticas complejas del ciclo celular. Por tanto, es probable que la cinética compleja y heterogénea del ciclo celular dentro de tumores individuales dificulte la identificación de firmas de proliferación de micromatrices clínicamente útiles, un problema que también ha restringido el uso de la citometría de flujo en la práctica clínica habitual.
- El uso de la citometría de flujo también ha conducido a un impacto limitado, puesto que las muestras clínicas a menudo no son adecuadas para estos análisis. Esto es debido parcialmente a los artefactos de fijación, a cantidades inadecuadas de tejido, y a dificultades en la interpretación debido a poblaciones contaminantes procedentes del estroma reactivo y/o elementos benignos.
- La evaluación de los marcadores de proliferación celular no ha proporcionado previamente ninguna solución de pronóstico y predictiva, y los expertos en la técnica han sido escépticos al respecto de que los marcadores de proliferación proporcionen información clínica útil. Existe la creencia de que los parámetros de medición de la proliferación celular proporcionan información objetiva acerca de los tumores, pero a pesar de numerosos estudios hay pocas pruebas directas de que el uso de ciertos marcadores de la proliferación celular son realmente una mejora frente a la evaluación histológica convencional que se ha empleado de manera óptima. Pocos estudios han tratado la cuestión crítica del valor relativo de los marcadores de proliferación comparados con la estadificación clínica y la clasificación histopatológica convencional.
- Aunque la expresión génica se ha aplicado a la predicción del resultado de cánceres, la actuación real de la reglas de predicción que emplean la expresión génica no ha resultado ser tan informativa como parecía que iba a ser en un principio. Por ejemplo, en la actualidad, la mayoría de las reglas predictivas que emplean la expresión génica no ha proporcionado una clasificación de pronóstico significativamente mejorada cuando se compara con los factores de pronóstico NPI convencionales en el cáncer de mama. Por tanto, se requiere con urgencia la identificación de nuevos biomarcadores para mejorar la evaluación de la pronóstico en cánceres comunes.
- El cáncer de mama es un ejemplo de cáncer común y es una enfermedad compleja debido a su heterogeneidad morfológica y biológica, su tendencia a adquirir quimiorresistencia y la existencia de varios mecanismos moleculares subyacentes a su patogénesis. La mitad de las mujeres que reciben un tratamiento locoregional para el cáncer de mama nunca recaen, mientras que la otra mitad finalmente morirá debido a enfermedad metastásica. Por tanto, resulta imprescindible distinguir con claridad entre estos dos grupos de pacientes para el tratamiento clínico óptimo. Por desgracia, los marcadores de pronóstico para los cánceres de mama en la actualidad son limitados. También faltan ensayos (ensayos predictivos) que permitan la selección de los fármacos anticáncer más apropiados, en particular en el contexto de la nueva generación de inhibidores de molécula pequeña que se dirigen a quinasas críticas implicadas en el control del crecimiento y las transiciones del ciclo celular. Por ejemplo, en el cáncer de mama, los ensayos predictivos están limitados en la actualidad a la formación del perfil de inmunexpresión de Her2.
- El carcinoma de ovario epitelial (EOC) es otro cáncer común y es el cuarto cáncer más común en mujeres en EEUU y el Reino Unido. Las pacientes a menudo se presentan con la enfermedad avanzada, y a pesar de las mejoras en la terapia de fármacos, la supervivencia es muy baja. En la actualidad, el estadio del tumor es el factor de pronóstico más importante. La enfermedad residual después de cirugía, el subtipo histológico, y el grado del tumor también predicen la supervivencia, pero ofrecen poca información acerca de las variables biológicas responsables del avance del estadio y del resultado.
- Siguen siendo necesarias mejores estrategias de diagnóstico, pronóstico y predicción para enfermedades provocadas por una proliferación anómala, tales como trastornos cancerosos o precancerosos.
- Shetty *et al.*, British Journal of Cancer, 2005, 93(11):1295-1300, describen la importancia de la cinética del ciclo celular para proporcionar información sobre el grado del tumor.
- Li *et al.*, Molecular Cancer, 2007, 6(7):1-17, describen la formación de perfiles de expresión de células epiteliales mamarias humanas.
- Scott *et al.*, British Journal of Cancer, 2004, 90:1583-1590, describen el uso de un panel de biomarcadores para identificar la presencia o la ausencia de un cáncer.
- Endl *et al.*, Journal of Pathology, 2001, 195:457-452, describe un panel de biomarcadores para caracterizar el desplazamiento desde la proliferación a la diferenciación en células tumorales.
- El documento US2004/0146513 describe la generación de anticuerpos monoclonales contra Mcm3.

Ananthanarayanan *et al.*, BMC Cancer, 2006, 6(73):1-9, describen marcadores moleculares específicos para identificar alteraciones en la proliferación en tejido neoplásico.

Korkolopoulou *et al.*, Human Pathology, 2005, 36:899-907, describe el uso de ciertos biomarcadores para predecir el tiempo de supervivencia sólo para información de pronosis.

5 Padmanabhan *et al.*, J. Clin. Pathol., 2004, 57:1057-1062, describen el uso de dos biomarcadores para identificar células prostáticas que están en ciclo activo.

El documento US2007/0128599 describe el uso de biomarcadores específicos para el diagnóstico de la displasia basados en la presencia o la ausencia de la expresión de biomarcadores.

10 Going *et al.*, Gut, 2002, 50:373-377, describe el uso de Mcm2 y Mcm5 en combinación con Ki67 para la detección de lesiones malignas o premalignas.

Yang *et al.*, BMC Cancer, 2006, 6:203, describen biomarcadores específicos en el cáncer de pulmón no microcítico.

La presente invención se dirige a mitigar de al menos una desventaja asociada con la técnica anterior.

Sumario de la invención

15 Otro ámbito de aplicabilidad de la presente invención será evidente a partir de la descripción detallada que aparece a continuación. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indiquen las realizaciones preferidas de la invención, sólo se ofrecen como ilustración, puesto que para los expertos en la técnica serán evidentes, a partir de esta descripción detallada, diversos cambios y modificaciones dentro del espíritu y del alcance de la invención.

20 En un primer aspecto de la invención, aparece un método para determinar un tratamiento para un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo el método las etapas de:

(a) evaluar el nivel de un primer biomarcador seleccionado de al menos uno de Mcm2 a 7 en una muestra biológica del sujeto; y

(b) evaluar el nivel de un segundo biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, y Ki67 en la muestra biológica del sujeto;

25 en el que la combinación del nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es indicativa del régimen de tratamiento prescrito para el sujeto;

30 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:

(i) un control; y

(ii) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos no específicos de la fase del ciclo celular;

35 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:

(i) un control;

(ii) un tratamiento con agentes específicos de G1 o no específicos de la fase del ciclo celular; y

(iii) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos no específicos de la fase del ciclo celular S y G2/M; y

40 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:

(i) la cirugía; y

(ii) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos específicos de la fase del ciclo celular S y G2/M.

45 En un segundo aspecto de la invención, aparece un método para determinar una pronosis de avance de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) evaluar el nivel de un primer biomarcador seleccionado de al menos uno de Mcm2-7 en una muestra biológica

del sujeto; y

(b) evaluar el nivel de un segundo biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, Ki67 y H3s10ph en la muestra biológica del sujeto;

5 en el que la combinación del nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es indicativa del avance del cáncer en el sujeto;

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad reducida del avance del cáncer;

10 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad reducida del avance del cáncer; y

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad aumentada del avance del cáncer; y

15 en el que el valor predeterminado para el primer biomarcador es de 30% de células positivas para el primer biomarcador y el valor predeterminado para el segundo biomarcador es de 7% de células positivas para el segundo biomarcador.

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra la presencia de Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A y H3S10ph durante el ciclo de división celular mitótica. Los niveles de los factores de licencia de replicación del ADN Mcm2-7 no varían significativamente durante el paso a través del ciclo celular, mientras que la expresión de la proteína represora de licencia endógena geminina está limitada a la fase S-G2-M. Se ha advertido una mayor expresión de geminina en varias malignidades y esto se correlaciona positivamente con la proliferación. De modo notable, este aumento de la expresión siempre está limitado a S-G2-M, incluso en tumores agresivos. Los niveles de Aurora A (y PLK1; los datos no se muestran) son insignificantes durante G1 y aumentan durante la fase S hasta alcanzar un máximo durante G2/M. La presencia de H3S10ph se limita a la mitosis y por tanto puede utilizarse como marcador mitótico. La expresión de las proteínas Mcm2-7 puede utilizarse para determinar el estado del ciclo celular en tejidos. Las Mcm2-7 identifican a las células dentro del ciclo celular (fases G1-S-G2-M) pero son fuertemente infrarreguladas tras la retirada hacia estados quiescentes (G0), diferenciados, y senescentes “fuera de ciclo”. Puesto que Ki67 se expresa a lo largo del ciclo celular en células en proliferación, la proporción de un marcador de la fase S-G2-M o la fase M con Ki67 (por ejemplo, geminina/Ki67, Aurora A/Ki67 o H3S10ph/Ki67) puede utilizarse como indicador de la longitud relativa de la fase G1 y, por tanto, de la velocidad del avance del ciclo celular.

35 La figura 2 muestra un diagrama esquemático de la expresión del factor de licencia de replicación del ADN en tejidos en autorrenovación. El modelo incluye compartimentos funcionales, de células en tránsito y división, y de células precursoras. El flujo de células a través de estos compartimentos es continuo; nuevas células son suministradas desde el compartimento de células precursoras (S) y su número se amplifica en el compartimento de células en tránsito y división (T). Las células se diferencian totalmente y se hacen funcionalmente competentes a medida que entran en el compartimento maduro (M). El compartimento de células precursoras muestra una baja expresión de los factores de licencia de replicación del ADN Mcm2-7. Los niveles de Mcm2-7 aumentan con rapidez a medida que las células entran en el compartimento de células en tránsito y división. Se produce una infrarregulación gradual de Mcm2-7 a medida que las células se diferencian y adoptan un fenotipo funcional totalmente diferenciado. Sin embargo, la capacidad proliferativa se pierde en un punto más temprano durante la ejecución del programa de diferenciación a medida que la célula sale del compartimento de células en tránsito y división y se acopla a la infrarregulación del factor de carga de Mcm2-7 Cdc6. De manera notable, la detención de la diferenciación que caracteriza al cáncer, en particular en tumores de alto grado, está asociada con la incapacidad de infrarregular Mcm2-7.

50 La figura 3 muestra el avance de las fases del ciclo celular en el cáncer de mama. Se muestran dos especímenes de biopsia de cáncer de mama inmunoteñidos para Mcm2, Ki67, geminina, Aurora A y H3p, (A) y (B). Ambos casos se caracterizan por una alta expresión de proteínas Mcm2, lo cual indica que la mayoría de las células tumorales están dentro del ciclo de división celular. Aunque ambos especímenes de tumores muestran una fracción de crecimiento elevado, según se define por la expresión de Mcm2, existen diferencias notables en la expresión de los marcadores de S-G2-M geminina y Aurora A, y del marcador mitótico H3S10ph. (A) Este tumor muestra unos niveles de expresión muy bajos de geminina y Aurora A, y un pequeño número de células muestra la fosforilación de la histona H3 en la serina 10 (H3S10ph), lo cual indica una fase G1 detenida o prolongada. (B) En contraste, este tumor muestra unos niveles de expresión altos de geminina y Aurora A, y una mayor fosforilación de H3S10, lo cual indica un avance rápido de fases del ciclo celular. Por tanto, puede postularse que el tumor mostrado en (B) respondería más a fármacos específicos de la fase del ciclo celular S o G2/M.

- 5 La figura 4 muestra un análisis de múltiples parámetros de los factores de licencia de replicación del ADN, Aurora quinasas, Ki67, geminina, quinasas de tipo Polo, H3S10ph y sus combinaciones para el ensayo predictivo y de prognosis del cáncer. Utilizando esta combinación de marcadores en un análisis de múltiples parámetros es posible determinar si las células tumorales se han retirado del ciclo (es decir, las células tumorales estériles), una población que sería resistente a radiación y a agentes anticáncer dirigidos al ciclo celular. Además, para estas células tumorales dentro del ciclo (positivas a Mcm2-7), es posible determinar la velocidad del avance del ciclo celular.
- 10 La figura 5 muestra una validación del análisis de múltiples parámetros de biomarcadores. (A) Inmunotransferencias de lisados de células totales MCF-7 asíncronas con anticuerpos contra Mcm2, geminina, Aurora A, Plk1 y H3S10ph. (B) Fotomicrografías de secciones de tejidos introducidos en parafina de cáncer de mama de grado 3 teñidas de forma inmunohistoquímica con anticuerpos contra Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, Plk1 y H3S10ph (aumento original 400x). El recuadro muestra la inmunotinción de mama normal (aumento 800x).
- 15 La figura 6 muestra la expresión de Aurora A y Plk1 a lo largo de grados de tumores para una serie de cáncer de mama.
- La figura 7 muestra las curvas de tiempo hasta la recurrencia con (A) NPI, (B) Plk1, y (C) Aurora A para una serie de cáncer de mama.
- La figura 9 muestra las curvas de tiempo hasta la recurrencia con (A) NPI y Plk1, y (B) NPI y Aurora A para una serie de cáncer de mama.
- 20 La figura 10 muestra (A) inmunotransferencias de lisados de células totales HeLa S3 asíncronas con anticuerpos contra Mcm2, geminina, Aurora A, Aurora B y H3S10ph. (B) Inmunotransferencias de biomarcadores y actina (control de carga) en lisados de células totales de células HeLa S3 sincronizadas. Perfiles de FACS de células HeLa S3 sincronizadas en intervalos de 2 horas. (C) Fotomicrografías de secciones de tejidos introducidos en parafina de carcinoma de ovario epitelial (EOC) teñidas de forma inmunohistoquímica con anticuerpos contra Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, Plk1 y H3S10ph. Aumento original, 400x; recuadro, 1000x.
- La figura 11 muestra la expresión de Aurora A a lo largo de grados de tumores (serie de EOC).
- 25 La figura 12 muestra curvas de Kaplan-Meier que muestran la asociación entre Aurora A, el estado de ploidía del tumor, y la supervivencia de pacientes para la serie de EOC. (A) Aurora A (tercil inferior <11,3%; tercil intermedio 11,3-21,3%; tercil superior >21,3%) y supervivencia sin enfermedad a lo largo de la serie completa; ensayo de rangos logarítmicos, $p = 0,01$. (B) Estado de ploidía del tumor y supervivencia sin enfermedad a lo largo de la serie completa; ensayo de rangos logarítmicos, $p = 0,03$. (C) Aurora A (tercil inferior <8,7%; tercil intermedio 8,7-19,6%; tercil superior >19,6%) y supervivencia sin enfermedad en un subgrupo de estadio temprano; ensayo de rangos logarítmicos, $p = 0,004$. (D) Estado de ploidía del tumor y supervivencia sin enfermedad en un subgrupo de estadio temprano; ensayo de rangos logarítmicos, $p = 0,04$. (E) Aurora A (tercil inferior <8,7%; tercil intermedio 8,7-19,6%; tercil superior >19,6%) y supervivencia sin enfermedad en un subgrupo de estadio temprano; ensayo de rangos logarítmicos, $p = 0,01$. (F) Estado de ploidía del tumor y supervivencia sin enfermedad en un subgrupo de estadio temprano; ensayo de rangos logarítmicos, $p = 0,08$.
- 30 La figura 13 es una representación gráfica que muestra la distribución de la expresión de Mcm2 en la muestra del estudio. Frecuencia de la expresión de la proteína Mcm2 a lo largo de la cohorte de pacientes con cáncer de mama (media = 64,4101, desviación estándar (SD) = 30,4632, N = 182).
- 35 La figura 14 es una representación gráfica que muestra la distribución de la expresión de biomarcadores del ciclo celular que define tres fenotipos de ciclo celular diferenciados: (I) estado fuera del ciclo; (II) estado dentro del ciclo con G1 retrasada/detenida; (III) estado en ciclo activo. Se muestra la mediana (línea negra), intervalo intercuartil (recuadro), e intervalo robusto que excluye los casos exteriores (líneas cerradas). Los casos exteriores se muestran con puntos aislados (IL: "labelling index", índice de marcaje).
- 40 La figura 15 es una representación gráfica de las curvas de Kaplan-Meier que muestran la asociación entre el fenotipo del ciclo celular y supervivencia sin enfermedad. (I) Estado fuera del ciclo; (II) estado dentro del ciclo G1 con retrasada/detenida; (III) estado en ciclo activo. En un análisis de una variable que compara el fenotipo III con los fenotipos I y II combinados, HR = 3,90 (1,81-8,40), $p < 0,001$. En un análisis de múltiples variables ajustado para PI, HR = 2,71 (1,18-6,23), $p = 19$.
- 45 La figura 16 es una representación gráfica que muestra la relación entre el fenotipo del ciclo celular y los subtipos del cáncer de mama. Los paneles muestran la proporción de cada subtipo de cáncer de mama que presenta los fenotipos de ciclo celular I (fuera del ciclo), II (G1 retrasada/detenida) y III (en ciclo activo). De manera notable, la mayoría de Her-2 y tumores triple negativos muestra el fenotipo en ciclo activo (III).

Descripción detallada

- 55 Se proporciona la utilidad de biomarcadores, incluyendo la utilidad clínica, y la manera en que los análisis de estos biomarcadores puede integrarse con otros reguladores clave del ciclo celular para proporcionar información sobre la

- cinética del ciclo celular y la distribución de las fases en muestras de tumores de pacientes. Este análisis puede proporcionar algoritmos de diagnóstico para mejorar la evaluación de la prognosis y también tiene potencial para predecir la respuesta terapéutica a fármacos específicos de la fase del ciclo celular. Esta es una estrategia en la que puede realizarse un análisis del ciclo celular de múltiples parámetros en material de biopsias habituales de tumores de pacientes, utilizando biomarcadores que forman constituyentes centrales de la vía de licencia de replicación del ADN y la maquinaria mitótica. Este algoritmo proporciona no sólo una herramienta de prognosis sino que también puede aprovecharse como ensayo predictivo para fármacos específicos de la fase del ciclo celular (incluyendo radiación) o fármacos que inhiben las vías reguladoras del crecimiento corriente arriba. La invención se realiza según el primer y el segundo aspecto de la invención, según se detalló anteriormente.
- 5 En una realización, el biomarcador se detecta utilizando un miembro de unión específica dirigido contra un polipéptido diana del biomarcador. La invención se realizará en una muestra corporal de un paciente.
- Una "muestra corporal" significa cualquier muestra de células, tejidos o fluidos corporales en la que pueda detectarse la expresión de un biomarcador. Los ejemplos de dichas muestras corporales incluyen, pero no se limitan a sangre, linfa, orina, fluidos ginecológicos, biopsias y frotis. Las muestras corporales pueden obtenerse de un paciente mediante una diversidad de técnicas que incluyen, por ejemplo, raspando o limpiando con un algodón un área o utilizando una aguja para aspirar fluidos corporales. Los métodos para recoger diversas muestras corporales son muy conocidos en la técnica. Las muestras corporales pueden trasladarse a un portaobjetos de vidrio para verlas con aumento. Pueden aplicarse disoluciones de fijación y de tinción a las células sobre el portaobjetos para conservar el espécimen y para facilitar el estudio.
- 15 En una realización, la muestra corporal se deriva de uno cualquiera de malignidades del cérvix, incluyendo el ensayo de frotis del cérvix, de mama, malignidades del tracto urinario (ensayadas en muestras de tejido de biopsia y en frotis de citología urinaria), malignidades de colon, pulmón, vejiga, piel, laringe, esófago, bronquios, nódulos linfáticos, y hematológicas, también sangre y suero para encontrar pruebas de carcinoma y sarcoma metastásico. En algunas realizaciones, la presente invención también puede emplearse para evaluar anomalías premalignas de células epiteliales glandulares cervicales (neoplasia intraepitelial glandular, GIN) o anomalías premalignas en otros tejidos.
- 20 En algunas realizaciones, pueden ser particularmente apropiados otros especímenes clínicos para su uso en evaluaciones citológicas o bioquímicas, en los que la detección de células neoplásicas o su distinción de células que muestran cambios reactivos puede ser muy difícil. Estos especímenes incluyen esputo, especímenes de lavado broncoalveolar, orina y cepillado del tracto alimentario (incluyendo esófago, estómago y páncreas, tanto del conducto biliar como del conducto pancreático).
- 25 En algunas realizaciones, la presente invención puede aplicarse a la evaluación histológica o biológica de tejidos, en la que la evaluación de la proliferación puede permitir una predicción más precisa del resultado clínico y/o una selección más lógica de la terapia. Los especímenes pueden incluir malignidades de células glandulares (por ejemplo, pulmón, mama, colon, próstata, estómago), células escamosas (por ejemplo, pulmón, piel, esófago) u otros tipos de células epiteliales (por ejemplo, vejiga, uréter, riñón, ovario).
- 30 En una realización, puede utilizarse un análisis de múltiples parámetros de Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6, Mcm7, geminina, Aurora A y Aurora B, y su sustrato de histona H3 para evaluar el avance del EOC y la cinética del ciclo celular de este tipo de tumor, *in vitro* o *in vivo*.
- 35 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que la localización de biomarcadores de la vía de licencia de replicación de ADN (por ejemplo, Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6, Mcm7, y geminina) que regula la transición de fase G1-S, combinado con biomarcadores de la maquinaria mitótica (por ejemplo, Aurora A y su sustrato de H3) que está implicada en la transición G2-M, mediante la formación del perfil de inmunoexpresión en un material de biopsia quirúrgico fijado del modo habitual, proporciona un conocimiento exclusivo de la cinética del ciclo celular de estos tumores. Utilizando esta combinación de marcadores en un análisis de múltiples parámetros es posible determinar si las células tumorales se han retirado del ciclo (es decir, células tumorales estériles), una población que sería resistente a radiación y a agentes anticáncer dirigidos al ciclo celular. Además, para las células tumorales dentro del ciclo (positivas a Mcm2-7), es posible determinar la velocidad del avance del ciclo celular.
- 40 Es probable que los tumores que muestran un avance retrasado y que están principalmente en G1 muestren una mala respuesta a los agentes dirigidos a la fase S y G2-M (tabla 1), y por tanto deben tratarse con agentes dirigidos a G1 (fenotipo del tumor - altos niveles de Mcm2-7 pero asociados con bajos niveles de geminina, Aurora A y H3S10ph, y unas proporciones de geminina/Ki67 que tienden a cero). En contraste, es probable que los tumores que muestren un avance acelerado del ciclo celular tengan una buena respuesta a agentes dirigidos a S y G2 (tabla 1) (fenotipo del tumor - altos niveles de Mcm2-7, geminina, Aurora A, H3S10ph con una proporción de geminina/Ki67 que tiende a 1). También es probable que los tumores que muestren un avance acelerado del ciclo celular y una fracción alta de G2-M tengan la mejor respuesta a la radiación. Son especialmente útiles las moléculas de unión dirigidas contra constituyentes centrales de la vía de licencia de replicación del ADN (familia de proteínas Mcm2-7 y geminina), y las moléculas de unión dirigidas contra constituyentes centrales de la maquinaria mitótica (Aurora A, quinasa 1 de tipo Polo y H3S10ph). Pueden utilizarse otros biomarcadores como parámetro adicional en el algoritmo
- 45
- 50
- 55

que permite el análisis de la velocidad del avance del ciclo celular. Los biomarcadores que permiten el análisis de la velocidad del avance del ciclo celular incluyen Ki67.

La duplicación precisa del ADN durante cada ciclo de división celular es fundamental para la estabilidad genómica y se logra a través de acontecimientos de inicio muy regulados. El inicio de la replicación del ADN depende del ensamblaje de complejos prerreplicativos en orígenes de la replicación durante la fase tardía de la mitosis y la fase G1 temprana. El ensamblaje del complejo prerreplicativo implica la unión secuencial del complejo de reconocimiento del origen (ORC), Cdc6, Cdt1, y Mcm2-7 a los orígenes, y se "licencia" a la cromatina para la síntesis del ADN durante la fase S. La regulación de los factores de licencia de replicación del ADN, tales como los niveles de las proteínas Mcm2-7, proporciona un poderoso mecanismo corriente abajo para controlar la proliferación celular en tejidos humanos. La desregulación de Mcm2-7 es un acontecimiento temprano en la tumorigénesis de múltiples etapas. La inhibición del reensamblaje del complejo prerreplicativo, que asegura que los orígenes se activen una única vez por cada ciclo celular, resulta fundamental para mantener la integridad genómica.

El represor de la licencia geminina se expresa a unos niveles elevados durante las fases S-G2-M y bloquea la recarga de Mcm2-7 sobre la cromatina a través de su interacción con Cdt1. En poblaciones de células humanas *in vivo*, la falta de geminina produce una profunda inestabilidad genómica con una sobrerreplicación del ADN, que da como resultado la aparición de células con núcleos aneuploides gigantes, que son la característica morfológica/patológica de los cánceres agresivos. La inactivación de la geminina también provoca la sobreduplicación del centrosoma que, junto con los mecanismos de punto de control de G2-M abrogados, produce múltiples defectos mitóticos que pueden estimular la agregación incorrecta de cromosomas y la aneuploidía. Estos descubrimientos enfatizan el papel clave que desempeña la geminina en el mantenimiento de la integridad genómica en múltiples etapas del ciclo celular.

Un control riguroso de los acontecimientos mitóticos es fundamental para que se complete de forma satisfactoria la segregación de las cromátidas hermanas y la división celular. Aunque las CDK son los reguladores clave de la entrada mitótica, no actúan por sí solas. La quinasa 1 de tipo Polo (PLK1), Aurora A y Aurora B son tres proteínas quinazas adicionales que controlan un subconjunto de acontecimientos mitóticos fundamentales. El tránsito a través de la mitosis depende de proteínas quinazas, tales como la quinasa de tipo Polo (PLK) y las Aurora quinazas. Las Aurora quinazas son importantes reguladores de varias etapas de la mitosis, incluyendo la maduración y la separación del centrosoma, la orientación y la segregación de los cromosomas, y la citoquinesis.

Al igual que la geminina, los niveles endógenos de las Aurora quinazas están fuertemente regulados de una manera dependiente del ciclo celular, con bajos niveles en G1-S, una acumulación durante G2-M, y una rápida degradación al final de la mitosis.

La cinética del ciclo de células tumorales no sólo afecta a los algoritmos de prognosis, sino que también tiene importancia para predecir la respuesta a fármacos específicos de la fase del ciclo celular (véase anteriormente). Los inventores han demostrado que el análisis de los constituyentes centrales de la maquinaria del ciclo celular utilizando técnicas inmunohistológicas sencillas, y aplicado directamente a material de biopsia quirúrgica convencional, proporciona un conocimiento detallado y exclusivo del perfil cinético del ciclo de las células tumorales que está funcionando *in vivo*.

Tal como se analizó anteriormente, la expresión de Mcm2, Mcm3, Mcm4, Mcm5, Mcm6, y Mcm7 (denominadas en la presente "Mcm2-7" o "Mcm2 a 7") permite distinguir a las células que están atravesando el ciclo de las que están en estados "fuera de ciclo". El inhibidor de la licencia de origen geminina sólo es detectable durante las fases S-G2-M, al igual que las quinazas mitóticas PLK1, Aurora A y B. La histona H3 es un sustrato para las Aurora quinazas y sólo es fosforilada durante la mitosis. Así, la fosfohistona H3 (H3S10ph) es un marcador de la fase M. Un análisis de múltiples parámetros de estos reguladores de G1/S y G2/M por tanto proporciona una caracterización detallada del estado del ciclo celular en material de biopsia quirúrgica (fijado y procesado del modo habitual). Por ejemplo, en la mama premenopáusica en reposo, la expresión de Mcm2-7 es alta pero los niveles de proteínas de geminina, Aurora A/B, PLK1 y H3S10ph son bajos, lo cual indica que el epitelio luminal mamario está en un estado G1 extendido o detenido, un fenotipo que se observa también en lesiones premalignas y en neoplasmas de crecimiento lento. En contraste, en tumores agresivos de crecimiento rápido, no sólo los niveles de expresión de Mcm2-7 son altos, sino que también existe una expresión creciente de los marcadores de las fases S-G2-M y M. Este perfil es indicativo de un avance acelerado del ciclo celular que parece correlacionarse con un mayor grado del tumor (un estado menos diferenciado), una mayor inestabilidad genómica y una supervivencia reducida.

Por tanto, el análisis de biomarcadores del ciclo celular es valioso como variable predictiva de la respuesta terapéutica, en particular para fármacos específicos de la fase del ciclo celular. Por ejemplo, los niveles de expresión de Aurora A y PLK1, que son potentes dianas para inhibidores de molécula pequeña, varían ampliamente en el cáncer de ovario y de mama. Estos tumores también muestran unas cinéticas del ciclo celular y unas distribuciones de fase del ciclo celular muy diferentes. Es más probable que los tumores que muestran un avance acelerado del ciclo celular y unos niveles altos de expresión de estas proteínas diana muestren la mayor respuesta a estas intervenciones terapéuticas basadas en el mecanismo.

El análisis de la cinética del ciclo celular también puede utilizarse para controlar la respuesta a fármacos que afectan

- 5 al avance del ciclo celular a través de la activación de las vías de punto de control en células con proliferación anómala o anomalías del crecimiento celular. Por ejemplo, el análisis de la inmunexpresión de geminina, Aurora A, PLK1, H3S10ph y geminina/Ki67 en material de biopsia pre- y postratamiento puede proporcionar una lectura para identificar dosis tolerables de UCN-01 que entonces pueden utilizarse para abrogar la detención del ciclo celular inducida por cisplatino.
- 10 En algunas realizaciones, se proporcionan técnicas de inmunocitoquímica que utilizan anticuerpos para detectar la sobreexpresión de polipéptidos biomarcadores en una muestra de un individuo. En este aspecto de la invención, se emplea al menos un anticuerpo dirigido contra un biomarcador específico de interés. La sobreexpresión también puede detectarse mediante técnicas basadas en ácidos nucleicos incluyendo, por ejemplo, hibridación y RT-PCR. También se proporcionan kits que comprenden reactivos para practicar los métodos de la invención.
- 15 Aunque los métodos de la invención requieren la detección de al menos un biomarcador en una muestra de un paciente para la detección de la enfermedad, en algunas realizaciones pueden utilizarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más biomarcadores para practicar la presente invención. Se reconoce que puede utilizarse la detección de más de un biomarcador en una muestra corporal para identificar casos de enfermedad. Por tanto, en algunas realizaciones se emplean dos o más biomarcadores, más preferiblemente dos o más biomarcadores complementarios. "Complementario" significa que la detección de la combinación de biomarcadores en una muestra corporal da como resultado la identificación satisfactoria de la enfermedad en un mayor porcentaje de casos que los que podrían identificarse si sólo se utiliza uno de los biomarcadores. Por tanto, en algunos casos, puede realizarse una determinación más precisa de la enfermedad utilizando al menos dos biomarcadores.
- 20 Por consiguiente, cuando se emplean al menos dos biomarcadores, se utilizarán al menos dos anticuerpos dirigidos contra polipéptidos biomarcadores diferenciados para practicar los métodos de inmunocitoquímica descritos en la presente. Los anticuerpos puede ponerse en contacto con la muestra corporal de modo simultáneo o al mismo tiempo.
- 25 Si un tejido se clasifica como potencialmente precanceroso o canceroso, o ya precanceroso o canceroso, basándose en una anomalía detectada en una muestra de tejido según la presente invención, se requerirá un diagnóstico y/o seguimiento clínico apropiado.
- La presente invención también proporciona métodos predictivos para determinar el desarrollo de la terapia para el trastorno diagnosticado.
- 30 Las muestras que se van a someter a un contacto con un miembro de unión específica según diversos aspectos de la presente invención pueden prepararse utilizando cualquier técnica disponible que permita la unión de una molécula de unión específica con el polipéptido diana, la determinación de los niveles de ácidos nucleicos, la actividad enzimática, etc., según diferentes realizaciones de la presente invención. En la técnica son habituales diversas técnicas, por ejemplo, para moléculas tales como anticuerpos que se unen al polipéptido diana, las que se emplean para fijar células para la inmunohistoquímica.
- 35 La detección de un miembro de unión específica, tal como un anticuerpo, en muestras control y de ensayo puede determinarse mediante cualquier medio apropiado. El marcaje con moléculas indicadoras individuales es una posibilidad. Las moléculas indicadoras pueden generar, de modo directo o indirecto, señales detectables y preferiblemente mensurables. La unión de las moléculas indicadoras puede ser directa o indirecta, de modo covalente, por ejemplo, a través de un enlace peptídico, o no covalente. La unión a través de un enlace peptídico puede ser el resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica una molécula de unión (por ejemplo, un anticuerpo) y una molécula indicadora.
- 40 Un modo preferido es mediante el enlace covalente de cada miembro de unión con un tinte individual de fluorocromo, fósforo o de láser con características de absorción o de emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y rojo Texas. Los tintes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.
- 45 Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas, tales como esferas de látex que están coloreadas, magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológica o químicamente activos que de modo directo o indirecto pueden provocar señales detectables que puedan observarse de modo visual, detectarse de modo electrónico o registrarse de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas que catalizan reacciones que desarrollan o cambian colores o que provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de modo que las transiciones electrónicas entre estados energéticos produzcan absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas utilizadas junto con biodetectores. Pueden emplearse sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y de fosfatasa alcalina. Otros ejemplos son la peroxidasa de rábano y la quimioluminiscencia.
- 50 Una molécula de unión específica puede proporcionarse en un kit, que puede incluir instrucciones para su uso según la presente invención. Puede incluirse uno o más reactivos distintos, por ejemplo, moléculas marcadoras. Los reactivos pueden proporcionarse dentro de recipientes que los protegen frente al ambiente exterior, tales como un
- 55

vial sellado. Un kit puede incluir uno o más artículos para proporcionar la propia muestra de ensayo dependiendo del tejido de interés, por ejemplo, un algodón para retirar células de la cavidad bucal, una jeringa para retirar una muestra de sangre, una espátula para recoger un frotis cervical, una pistola de biopsia, etc. (estos componentes generalmente son estériles).

5 Un kit puede incluir cualquier combinación de un agente de bloqueo para disminuir la tinción no específica, un tampón de conservación para conservar la actividad de la molécula de unión durante el almacenaje, un tampón de tinción y/o un tampón de lavado para ser utilizado durante la tinción del anticuerpo, un control positivo, un control negativo, etc. Los controles positivos y negativos pueden utilizarse para validar la actividad y la utilización correcta de los reactivos empleados según la invención y que pueden proporcionarse en un kit. Los controles pueden incluir
10 muestras, tales como secciones de tejidos, células fijadas sobre cubreobjetos, etc., de las cuales se sabe que son positivas o negativas en presencia de la diana, tales como uno o más de los biomarcadores descritos en la presente. El diseño y el uso de controles es habitual y está dentro de las capacidades habituales de los expertos en la técnica.

15 Las muestras pueden retirarse del cuerpo utilizando cualquier medio y técnica convenientes. Puede emplearse una espátula o un algodón para retirar células del endotelio, por ejemplo, del cérvix o de la cavidad bucal. La sangre y otras muestras de fluidos pueden retirarse utilizando una jeringa o aguja. Otras muestras de tejidos pueden retirarse mediante biopsia o corte de tejidos.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar un protocolo de tratamiento para un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo el método las etapas de:

20 (a) evaluar el nivel de un primer biomarcador seleccionado de al menos uno de Mcm2 a 7 en una muestra biológica del sujeto; y

(b) evaluar el nivel de un segundo biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, Ki67, y H3S10ph en la muestra biológica del sujeto;

25 en el que la combinación del nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es indicativa del régimen de tratamiento prescrito para el sujeto;

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:

(a) un control; y

30 (b) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos no específicos del ciclo celular;

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, el régimen de tratamiento se selecciona de uno o más de:

(a) un control;

35 (b) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos específicos de G1 o no específicos del ciclo celular; y

(c) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos no específicos del ciclo celular S y G2/M; y

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, el régimen de tratamiento se selecciona de uno o más de:

40 (a) la cirugía; y

(b) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos específicos de la fase del ciclo celular S y G2/M.

En un aspecto relacionado, el método para determinar un protocolo de tratamiento para un sujeto comprende también evaluar el nivel de un tercer biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, Ki67, y H3S10ph en la muestra biológica de dicho sujeto, en el que el segundo y el tercer biomarcador son diferentes.

45 Los agentes quimioterapéuticos no específicos del ciclo celular incluyen, sin limitarse a mitomicina C (MMC), clorhidrato de 1-(4-amino-2-metilpirimidin-5-il)metil-3-(2-cloroetil)-3-nitrosourea (ACNU) y gas mosaza (HN2), cisplatino, 4-hidroperoxiciclofosfamida, flavopiridol.

50 Los agentes específicos de la fase del ciclo celular S incluyen, pero no se limitan a 5-fluorouracilo, hidroxiurea, metotrexato, epirubicina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, 5-fluorodesoxiuridina, citarabina, gemcitabina, cladribina, tioguanina, fludarabina, hidroxiurea, inhibidores de topoisomerasa I (irinotecano, topotecano), inhibidores

de topoisomerasa II (etoósido, tenipósido, anatraciclinas, epirrubicina).

Los agentes específicos de la fase del ciclo celular G1 incluyen, pero no se limitan a asparaginasa, prednisolona.

5 Los agentes específicos de la fase del ciclo celular G2/M incluyen, pero no se limitan a etopósido, cisplatino, estaurosporina, ZM447439, vinca-alcaloides (vindesina, vinelobrina, vincristina, vinblastina), taxanos (paclitaxel, docetaxel), bleomicina, estaurosporina, ZM447439 (inhibidor de Aurora quinasa A y B), BI2536 (inhibidor de quinasa I de tipo Polo).

Los agentes específicos de la fase del ciclo celular M incluyen, pero no se limitan a docetaxel, BI2536.

Los agentes que actúan en múltiples etapas dentro de un ciclo celular incluyen, pero no se limitan a flavopiridol.

10 Aunque esta invención se ha descrito en conexión con sus realizaciones específicas, se entenderá que pueden hacerse otras modificaciones. Esta solicitud pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención que siga en general los principios de la invención y comprende las desviaciones de la presente invención dentro de la práctica conocida o acostumbrada dentro de la técnica a la cual pertenece la invención y tal como pueden aplicarse a las características fundamentales indicadas anteriormente en la presente.

15 “Comprende/que comprende”, cuando se emplea en esta descripción, indica la presencia de las características, los números enteros, las etapas o los componentes indicados, pero no excluye la presencia o la adición de una o más características, números enteros, etapas, componentes o grupos de esta.

Un segundo aspecto de la presente invención proporciona un método para determinar una prognosis de avance de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

20 (a) evaluar el nivel de un primer biomarcador seleccionado de al menos uno de Mcm2-7 en una muestra biológica del sujeto; y

(b) evaluar el nivel de un segundo biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, Ki67 y H3s10ph en la muestra biológica del sujeto;

en el que la combinación del nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es indicativa del avance del cáncer en el sujeto;

25 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad reducida del avance del cáncer;

30 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad reducida del avance del cáncer; y

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad aumentada del avance del cáncer.

35 En una realización relacionada, el método para determinar la prognosis del avance de un cáncer comprende además evaluar el nivel de un tercer biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, Ki67 y H3S10ph en la muestra biológica del sujeto, en el que el segundo y el tercer biomarcador son diferentes.

En una realización relacionada, cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una tasa de supervivencia a los 5 años mayor que 80%, 85% o 89%.

40 En una realización relacionada, cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una tasa de supervivencia a los 5 años mayor que 80%, 85% o 87%.

45 En una realización relacionada, cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, la prognosis del sujeto es indicativa de una tasa de supervivencia a los 5 años menor que 70%, 60% o 56%.

50 Los niveles de los biomarcadores de la presente invención pueden medirse utilizando cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. En un aspecto, los niveles de biomarcadores pueden medirse utilizando un método de ensayo inmunológico tal como, pero sin limitarse a transferencias por puntos, transferencias por ranuras, RIA, micromatrices y ELISA. En otro aspecto, los niveles de los biomarcadores pueden medirse utilizando un método de ensayo con base biológica molecular tal como, pero sin limitarse a un análisis de la transferencia Northern, un análisis de la transferencia Southern, un análisis de la transferencia Western, RT-PCR, PCR, ensayos de

amplificación basados en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), amplificación mediada por transcripción (TMA), o una matriz de detección por ordenador.

5 Es importante advertir que el orden en el que se miden los niveles del primer, segundo, tercer o posteriores biomarcadores no es importante. Por ejemplo, todos los biomarcadores pueden medirse al mismo tiempo. Como alternativa, el segundo o el tercer o posteriores biomarcadores pueden evaluarse antes del nivel del primer biomarcador.

Ejemplos

Ejemplo 1: Los factores de licencia de replicación del ADN y las quinasas mitóticas definen el estado proliferativo y están relacionados con el resultado clínico en el cáncer de mama

10 Cohorte de estudio

Se identificaron 182 pacientes diagnosticados con cáncer de mama invasivo de la base de datos del cáncer de mama del departamento de cirugía, UCL Hospitals, Londres, Reino Unido. Todas las pacientes estudiadas se sometieron a una evaluación clínica posoperatoria regular y contribuyeron a los análisis transversales. Diez no realizaban el seguimiento y 5 tenían cáncer recurrente, de las cuales 2 murieron de cáncer de mama. Ciento sesenta y siete pacientes contribuyeron a los análisis prospectivos de supervivencia y recaída, de las cuales 24 (14%) murieron de cáncer dentro del periodo de estudio, 12 murieron de otras causas no relacionadas, y 131 aún estaban vivas en el último seguimiento. Se produjeron 40 (25%) acontecimientos de recaída que comprenden recaídas y muertes por cáncer. La mediana del periodo de seguimiento fue de 47 meses (intervalo: 1-92 meses). El tiempo medio hasta la recaída entre las que sufrieron recaídas fue de 26 meses (desviación estándar (SD) = 15 meses, intervalo: 2-55 meses). La media del tiempo de seguimiento entre las que no habían sufrido aún recaídas fue de 52 meses (SD = 20 meses, intervalo: 2-92 meses). El tiempo de supervivencia medio entre las que murieron fue de 21 meses (SD = 12 meses, intervalo: 4-44 meses). La media del tiempo de seguimiento entre las que aún no habían muerto fue de 50 meses (SD = 21 meses, intervalo: 1-92 meses). Se obtuvo tejido de mama quirúrgico introducido en parafina y fijado con formaldehído de estas pacientes, procedente de los archivos de patología que incluía los tres grados histológicos (1-3), determinados según la modificación de Nottingham del método de Bloom y Richardson. Pudieron utilizarse portaobjetos e informes histológicos de todos los casos. Estos incluían 142 carcinomas ductales invasivos, 26 lobulares, 4 mucinosos, uno micropapilar, y 9 de tipo mixto. Los parámetros registrados incluían grado histológico, tamaño del tumor, tipo de tumor, estado de los nódulos linfáticos, invasión linfovascular (LVI), edad y NPI. También se estudiaron casos seleccionados al azar de tejido de mama normal de 21 mujeres premenopáusicas que se habían sometido a una mastoplastia de reducción. Se obtuvo la aprobación del comité local de ética en investigación de los comités conjuntos de UCL/UCLH Committees on the Ethics of Human Research.

Anticuerpos

35 Se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra la geminina humana según se ha descrito (Wharton, S.B., Hibberd, S., Eward, K.L., *et al.*, Br. J. Cancer, 2004, 91:262-269). Se obtuvo el MAb de Ki67 (clon MIB-1) de DAKO (Glostrup, Dinamarca), el MAb de Mcm2 (clon 46) de BD Transduction Laboratories (Lexington, KY), el Mab del receptor- α de estrógeno (ER) (clon 1D5) y el Mab del receptor de progesterona (clon PgR 636) de DAKO, el MAb de Aurora A NCL-L-AK2 (clon JLM28) de Novocastra Laboratories (Newcastle, Reino Unido), el MAb de la quinasa 1 de tipo Polo (PLK1) (clon 35-206) y Pab de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (H3S10ph) de Upstate (Lake Placid, NY).

Cultivo celular

Se cultivaron células de adenocarcinoma epitelial de mama MCF-7 humanas (ATCC HTB-22) en EMEM (Gibco-BRL, Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) suplementadas con glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales al 1%, FCS al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 0,1 mg/ml.

45 Preparación de extractos de proteínas e inmunotransferencia

Se recolectaron células MCF7 mediante un tratamiento con tripsina, se lavaron con PBS y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-Cl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, EDTA 20 mM, NP40 al 0,5%) a 2×10^7 células/ml. Después de una incubación en hielo durante 30 min, el lisado se aclaró mediante centrifugación (13.000 g, 15 min, 4 °C). Los lisados se separaron mediante SDS al 4-20%-PAGE (75 μ g de proteínas/pocillo) y se inmunotransfirieron como se ha descrito (Stoeber *et al.*, J. Cell Sci., 114:2027-2041, 2001). El bloqueo, las incubaciones de anticuerpos, y las etapas de lavado se realizaron utilizando las siguientes condiciones: PBS/Tween-20 al 0,1%/leche al 5% para Mcm2, Aurora A y PLK1, PBS/Tween-20 al 1%/leche al 10% para geminina, y PBS/leche al 5% para H3S10ph.

Inmunohistoquímica

Pudo utilizarse tejido de archivo introducido en parafina y fijado con formaldehído (PWET) obtenido en el diagnóstico

5 inicial para todas las pacientes, y para cada espécimen se eligió un bloque que contenía una muestra representativa de un tumor invasivo. Se cortaron secciones de 3 μm sobre portaobjetos Superfrost Plus (Visions Biosystems, Reino Unido), se retiró la cera con xileno, y se rehidrataron con alcohol de graduación descendiente hasta agua. Las secciones de tejido se cocieron a presión en tampón citrato 0,1 M a pH 6,0 durante 2 min y se inmunotifieron utilizando el kit Bond™ Polymer Refine Detection y el sistema automático Bond™-Max (Vision Biosystems, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido). Se aplicaron anticuerpos primarios a las siguientes diluciones: Ki67 (1/300), Mcm2 (1/2000), geminina (1/600), ER (1/200), PR (1/200), Aurora A (1/70), PLK1 (1/1000) y H3S10ph (1/300). Se realizó la inmunotinción de HER-2 utilizando DAKO HercepTest™ (DAKO) según las instrucciones del fabricante. Se aplicaron los cubreobjetos con medio de montaje Pertex (Cell Path Ltd., Newtown Powys, Reino Unido). Se empleó una incubación sin anticuerpos primarios como control negativo y secciones epiteliales colónicas como controles positivos.

Análisis del perfil de expresión de proteínas

15 Se realizó el análisis de expresión de proteínas mediante la determinación del índice de marcaje (LI) de los marcadores en cada tumor según se ha descrito (Shetty *et al.*, Br. J. Cancer, 93:1295-1300, 2005; Dudderidge *et al.*, Clin. Cancer Res., 11:2510-2517, 2005). Se evaluaron los portaobjetos con un aumento bajo (100 x) para identificar regiones del tumor con la mayor intensidad de tinción. A partir de estas áreas seleccionadas se capturaron de tres a cinco campos con un aumento de 400 x con una cámara con dispositivo acoplado cargado y un paquete informático de análisis (SIS, Münster, Alemania). Las imágenes después se imprimieron para el análisis cuantitativo, que se realizó sin que el observador supiera las variables clinicopatológicas. Se contaron las células positivas y negativas dentro del campo y se excluyeron las células estromáticas o inflamatorias. El criterio para la identificación de células positivas depende del biomarcador: para Ki67, Mcm2, geminina, ER, PR y H3S10ph, las células con cualquier grado de tinción nuclear se clasificaron como positivas; para Aurora A y PLK1, las células con cualquier grado de tinción nuclear o citoplásmica se clasificaron como positivas (Gritsko *et al.*, Clin. Cancer Res., 9:1420-1426, 2003). Se contó un mínimo de 500 células para cada caso. El LI se calculó utilizando la siguiente fórmula: $LI = \text{número de células positivas} / \text{número de células totales} \times 100$. Para la evaluación de la sobreexpresión de la proteína de HER-2, se evaluó la tinción de la membrana siguiendo el sistema de puntuación aprobado por la FDA recomendado por DAKO.

Citometría de imagen de ADN

30 Para cada caso se empleó una sección de 40 μm de PWET obtenido del mismo bloque que el utilizado en la evaluación mediante IHC, para preparar núcleos según se ha descrito (Sudbo *et al.*, N. Engl. J. Med., 344:1270-1278, 2001; Haroske *et al.*, Anal. Cell Pathol., 1998, 17:189-200, 1997). Se empleó el sistema de ploidía del ADN Fairfield (Fairfield Imaging Ltd., Nottingham, Reino Unido) para el procesamiento, análisis y clasificación de las imágenes según se ha descrito (Sudbo *et al.*, 2001, *supra*). Se incluyeron linfocitos y células plasmáticas como controles internos y secciones de 40 μm de tumor de vejiga de grado alto y de tejido colónico normal como controles externos para poblaciones aneuploides y diploides, respectivamente. Los histograma se clasificaron según criterios publicados (Sudbo *et al.*, 2001, *supra*; Haroske, 1998, *supra*). Los histogramas fueron clasificados por dos asesores independientes con un alto nivel de concordancia sin que conociesen las variables clinicopatológicas. Para el análisis estadístico, los tumores tetraploides y poliploides se agruparon junto con los tumores aneuploides.

Análisis estadísticos

40 Los biomarcadores se resumen con la mediana y el intervalo intercuartil. Se empleó el ensayo de la U de Mann-Whitney para comparar cada marcador con el estado de los nódulos linfáticos, el estado de poliploidía, y con una muestra de grado 3 frente a la muestra normal. Se empleó el ensayo no paramétrico de Jonckheere-Terpstra para la tendencia, para comparar marcadores con grado y estado de Her2. Se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman para evaluar las asociaciones entre marcadores y NPI. Se usó el ensayo de la chi-cuadrado para la asociación lineal a lineal con un grado de libertad para ensayar la asociación entre Her2 y estado de ploidía. Se empleó el ensayo de la t desapareado para comparar le media de NPI según el estado de ploidía.

45 Se utilizó una regresión lineal para evaluar la tendencia en la media de NPI a través de Her2. Se empleó la regresión de Cox en el análisis de la recurrencia del cáncer y de la muerte por cáncer para proporcionar proporciones de riesgo y para evaluar la predicción de los marcadores, divididos en dos categorías en la mediana, tanto en modelos de una variable como en modelos de múltiples variables ajustándose para NPI. Se utilizaron gráficas de Kaplan-Meier para mostrar los efectos predictivos calculados de los marcadores sin tomar en cuenta la categoría de NPI, y también estratificados según la categoría de NPI. Todos los análisis emplearon ensayos bilaterales, con los efectos resumidos utilizando intervalos de confianza del 95% y se evaluaron como estadísticamente significativos al nivel del 5% utilizando el paquete informático SPSS (versión 12.0.1).

Resultados

55 Validación del análisis de múltiples parámetros de los biomarcadores y sus implicaciones biológicas

Se confirmó la mono especificidad de los anticuerpos contra Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1 y H3S10ph en extractos de células totales de células MCF7 asíncronas mediante la detección de una única proteína con una masa

molecular coherente con la movilidad electroforética referida del correspondiente antígeno humano (figura 5A). En un estudio separado de este conjunto de biomarcadores en células HeLa S3 y en células de cáncer de ovario SK-OV 3, los inventores demostraron que los niveles de Mcm2 no varían significativamente durante el paso a través del ciclo celular, mientras que la expresión de geminina se limita a S-G2-M. Los niveles de Aurora A y PLK1 son insignificantes durante G1, aumentan durante la fase S y alcanzan un máximo durante G2/M, produciéndose la degradación de 2-4 horas después de abandonar la detención mitótica. La presencia de H3S10ph se limita a la mitosis, lo cual consolida la lógica para su uso como marcador mitótico. Puesto que el marcador de proliferación Ki67 está presente a lo largo del ciclo celular en células en proliferación, la proporción de un marcador de la fase S-G2-M o de la fase M con Ki67 (por ejemplo, geminina/Ki67, Aurora A/Ki67 o H3S10ph/Ki67) puede utilizarse como indicador de la longitud relativa de la fase G1 y, por tanto, la velocidad del avance del ciclo celular. De manera notable, el aumento en la expresión de geminina se limita a S-G2-M, incluso en tumores agresivos.

El análisis de la expresión de proteínas de estos marcadores del ciclo celular se estudió en primer lugar en especímenes de mama normales tras una mamoplastia de reducción (n = 21). Se observó un alto nivel de expresión de Mcm2 en células epiteliales de la unidad lobular ductal terminal (TDLU), lo cual indica que estas células están en un estado "dentro de ciclo" (mediana: 33,5%). Aunque el nivel de expresión de Mcm2 era elevado, Ki67 fue expresado a niveles bajos (mediana: 2,8%). De manera notable, la geminina, Aurora A, PLK1 (marcadores de la fase S-G2-M) y H3S10ph (marcador de la fase M) sólo fueron expresados en una fracción muy pequeña de células (<1%) de la TDLU, lo cual indica un bloqueo al avance del ciclo celular. Tomado conjuntamente, este fenotipo del ciclo celular es coherente con un estado de G1 detenida. Por contraste, el cáncer de mama invasivo mostró unos altos niveles de expresión de biomarcadores indicativos del avance del ciclo celular (figura 5B). Se produce un notable aumento en los niveles de expresión de proteínas de Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1 y H3S10ph cuando se compara la situación normal con tumores agresivos de grado 3 (valores de la mediana: Mcm2 [33,5% frente a 92,3%, $p > 0,001$], Ki67 [2,8% frente a 40,2%, $p > 0,001$], geminina [0,98% frente a 17,4%, $p > 0,001$], Aurora A [0% frente a 11,7%, $p > 0,001$], PLK1 [0,37% frente a 14,2%, $p > 0,001$], y H3S10ph [0% frente a 2,5%, $p > 0,001$]). Este aumento se asoció con una notable disminución en la proporción de Mcm2/Ki67 (valores de la mediana: 9,3% frente a 1,71%, $p < 0,001$). La reducción en el valor de Mcm2/Ki67 refleja un cambio desde un estado de G1 detenida no proliferativo licenciado a un estado de proliferación activa, y está asociada con la expresión de los marcadores de S-G2-M indicativos del avance del ciclo celular.

Relación entre biomarcadores, estado de ploidía del ADN tumoral y parámetros clinicopatológicos

Las características clinicopatológicas del estudio se resumen en la tabla 2. En primer lugar, los inventores estudiaron la relación entre la expresión de biomarcadores del ciclo celular y el estado de diferenciación de los tumores. Los niveles de expresión de los seis biomarcadores estaban fuertemente asociados con el grado del tumor (tabla 3), aunque existe algo de solapamiento entre la distribución de los niveles de biomarcadores entre los grados (por ejemplo, niveles de Aurora A y PLK1, figura 6). Estos datos demuestran una proporción creciente de células dentro del ciclo a medida que aumenta la anaplasia del tumor, pero también indican que los biomarcadores no distinguen totalmente entre los grados para todos los pacientes dentro de cada grado. De acuerdo con estos descubrimientos, se encontró una asociación muy significativa entre el grado del tumor y el estado de ploidía ($p < 0,001$). Las proporciones de geminina/Ki67, Aurora A/Ki67, Aurora B/Ki67 y H3S10ph/Ki67 no muestran cambios significativos a medida que aumenta el grado, lo cual indica que la diferenciación detenida no está asociada con una velocidad acelerada del avance del ciclo celular en tumores de grado alto (tabla 3). Esto supone un marcado contraste con los descubrimientos de los inventores en el cáncer de ovario, en el que se observó un avance acelerado del ciclo celular a medida que aumentaba la anaplasia del tumor (geminina/Ki67: $p < 0,007$, Aurora A/Ki67: $p < 0,0002$, H3S10ph/Ki67: $p < 0,0002$). Por contraste, y en coherencia con los descubrimientos de los inventores en otros tipos de tumores, la proporción de Mcm2/Ki67 disminuye a medida que aumenta el grado del tumor, lo cual refleja un desplazamiento en la proporción de células no proliferativas pero con licencia de replicación del ADN en tumores bien diferenciados, a células en ciclo activo en tumores poco diferenciados (tabla 3). La correlación positiva entre la expresión de geminina y el aumento de la anaplasia del tumor y la inestabilidad genómica indica que este represor de la licencia de origen no parece comportarse como un supresor tumoral en el cáncer de mama. Esto también se ha observado en otros tipos tumorales, por ejemplo, en linfomas de células B periféricos y en cáncer de ovario, en los que el número de células que expresan geminina es proporcional al índice de proliferación celular.

Para investigar la relación entre los biomarcadores y la inestabilidad genómica, los inventores han relacionado sus perfiles de expresión con el contenido en ADN tumoral (tabla 4). Existe una asociación muy significativa entre los niveles de expresión de todos los biomarcadores del ciclo celular que incluyen Ki67 ($p < 0,001$), Mcm2 ($p = 0,009$), geminina ($p < 0,001$), Aurora A ($p < 0,001$), PLK1 ($p = 0,002$) y H3S10ph ($p < 0,001$) y la inestabilidad genómica. También se produjo una disminución significativa en la proporción de Mcm2/Ki67 ($p = 0,004$). Tomados conjuntamente, estos datos demuestran una mayor proporción de células en ciclo activo en los tumores aneuploides comparado con los tumores diploides. De manera interesante, de nuevo, al igual que en el caso del estado de diferenciación de estos tumores, no existen pruebas de un avance acelerado del ciclo celular en tumores aneuploides, en contraste con los descubrimientos de los inventores en el cáncer de ovario, en el que aumentan varias proporciones de biomarcador del ciclo celular/Ki67.

No se descubrió ninguna asociación significativa entre la expresión de Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A y PLK1 y la

metástasis de nódulos linfáticos (tabla 5). Se observó una débil asociación con la expresión de H3S10ph ($p = 0,02$). Se produce una fuerte asociación inversa con la expresión de ER ($p = 0,007$) y PR ($p = 0,005$). Esto contrasta con los descubrimientos de los inventores en el ovario, en el que se descubrió una fuerte asociación entre Aurora A ($p = 0,006$), H3S10ph ($p = 0,002$), Aurora A/Ki67 ($p = 0,003$), H3S10ph/Ki67 ($p = 0,005$) y el estadio tumoral, que refleja el papel de la desregulación de la Aurora A en la tumorigénesis ovárica epitelial temprana y el avance a un estadio de la enfermedad avanzado. Los niveles de expresión de Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1, H3S10ph muestran una fuerte correlación positiva, y ER y PR una correlación negativa, con una mayor puntuación de NPI (tabla 6). También se produjo una significativa disminución en la proporción de Mcm2/Ki67, que significa un desplazamiento desde un estado no proliferativo licenciado a un estado de proliferación activa con una mayor puntuación de NPI. La expresión de biomarcadores del ciclo celular no está significativamente asociada con el estado de Her2, pero se produce una fuerte asociación inversa con la expresión de PR ($p < 0,001$) (tabla 7). También se produce una asociación entre la mayor puntuación de NPI y la sobreexpresión de Her2, y se observó una asociación débil entre la aneuploidía y una mayor puntuación de NPI (tabla 8). También se observó una débil asociación entre una mayor puntuación de Her2 y la aneuploidía ($\chi^2 = 3,03$, $p = 0,082$).

15 Relación entre biomarcadores, estado de ploidía del ADN tumoral y resultado del paciente

Análisis de una variable

La puntuación de NPI es una potente variable predictiva de la recurrencia del cáncer de mama y la muerte por cáncer de mama en esta cohorte de pacientes, aumentado el riesgo de recurrencia justo por debajo de dos veces por unidad de puntuación de NPI (HR = 1,81 [1,47-2,23], $p < 0,001$) y aumentando el riesgo de muerte justo por encima de dos veces por unidad de puntuación de NPI (HR = 2,15 [1,61-2,88], $p < 0,001$). La edad de la paciente no es un factor predictivo (tabla 9) (figura 7A). Se identificaron a Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1 y H3S10ph como potentes variables predictivas de la recurrencia del cáncer de mama (HR = 2,77 [1,44-5,30], $p = 0,002$; HR = 3 [1,56-5,76], $p < 0,001$; HR = 3,93 [1,98-7,80], $p < 0,001$; HR = 3,31 [1,67-6,57], $p < 0,001$; HR = 4,48 [2,21-9,09], $p < 0,001$; HR = 3,49 [1,76-6,92], $p < 0,001$, respectivamente) (figura 7B y 7C). Estas asociaciones también se observaron para la supervivencia pero no eran tan potentes debido al número más pequeño de acontecimientos en esta cohorte (Mcm2: HR = 2,32 [0,99-5,43], $p = 0,05$; geminina: HR = 2,43 [1,04-5,68], $p = 0,04$; Aurora A: HR = 2,18 [0,93-5,12], $p = 0,07$; PLK1: HR = 3,46 [1,37-8,71], $p = 0,009$; H3S10ph: HR = 3,29 [1,31-8,30], $p = 0,01$). Se observó un menor riesgo de recurrencia en el grupo diploide, pero no fue significativo (HR = 0,62 [0,33-1,18], $p = 0,14$). Aparece una tendencia creciente significativa en el riesgo de recurrencia y muerte a medida que aumenta la categoría de la expresión de Her2 (HR = 1,44 [1,13-1,83], $p = 0,003$; y HR = 1,40 [1,02-1,94], $p = 0,04$, respectivamente).

Valor predictivo de biomarcadores además de NPI

El análisis de múltiples variables demuestra que los efectos de estos biomarcadores del ciclo celular siguen siendo estadísticamente significativos y predictivos de la recurrencia del cáncer, incluso después de ajustar para NPI. Se identificó a Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1, y H3S10ph como potentes variables predictivas independientes del cáncer de mama además de NPI (HR = 2,13 [1,08-4,23], $p = 0,03$; HR = 2,22 [1,12-4,41], $p = 0,02$; HR = 2,64 [1,27-5,49], $p = 0,01$; HR = 2,82 [1,37-5,80], $p = 0,005$; HR = 3,31 [1,57-6,97], $p = 0,002$; HR = 2,07 [1,02-4,20], $p = 0,04$, respectivamente) (figuras 8 y 9). Aunque resulta valioso utilizar un biomarcador del ciclo celular para predecir la recurrencia, no se logró un valor añadido por la inclusión de dos o más marcadores. Esto en parcialmente debido a que existe una correlación entre marcadores y variables ciclinopatológicas. De manera interesante, las quinasas mitóticas Aurora A y PLK1 se identificaron como las variables predictivas independientes más poderosas de la recurrencia del cáncer de mama.

Relación entre el fenotipo del ciclo celular, las variables clinicopatológicas y el resultado del paciente

Los inventores han descubierto que los biomarcadores específicos de la fase del ciclo celular individuales son poderosos marcadores de prognosis independientes en el cáncer de mama. Esto plantea la cuestión de si la cinética del ciclo celular o el fenotipo del ciclo celular de un tumor también pueda tener un impacto sobre la patobiología de este tipo de tumor concreto. Los inventores habían demostrado previamente en sus ensayos de replicación de ADN *in vitro*, que la infrarregulación de los factores de licencia Mcm2-7, constituyentes de la ADN helicasa, es un mecanismo corriente abajo ubicuo mediante el cual se disminuye la capacidad proliferativa de las células, a medida que las células salen del ciclo de división celular hacia estados fuera de ciclo quiescentes (G0), diferenciados o senescentes (Williams y Stoeber, Curr. Opin. Cell Biol., 19:672-679, 2007; Blow y Hodgson, Trends Cell Biol., 12:72-78, 2002; Stoeber *et al.*, EMBO J., 17:7219-7229, 1998; Stoeber *et al.*, J. Cell Sci., 114:2027-2041, 2001; Kingsbury *et al.*, Exp. Cell Res., 309:56-67, 2005; Barkley *et al.*, Exp. Cell Res., 313:3789-3799, 2007). Para determinar el fenotipo del ciclo celular, los inventores seleccionaron un punto de corte del 30% para la expresión de la proteína Mcm2 para definir un grupo (Mcm2 <30%, fenotipo I) en el que la mayoría de las células tumorales están en un estado fuera de ciclo (figura 13, figura 14). Este grupo (fenotipo I), 18% de todos los tumores, tiene unos niveles de geminina menores que 7%. Esto está de acuerdo con las observaciones de los inventores en los ensayos *in vitro* y en tejidos en autorrenovación, de que la geminina también es fuertemente infrarregulada a medida que las células entran en estados fuera de ciclo quiescentes (G0) y diferenciados (Williams y Stoeber, 2007, *supra*; Eward *et al.*, J.

Cell Sci., 177:5875-5886, 2004; Kingsbury *et al.*, 2005, *supra*; Barkley *et al.*, 2007, *supra*) (figura 4, tabla 1). En contraste, la mayoría de los cánceres tienen unos niveles de expresión de Mcm2 mayores que 30% (Mcm2 >30%), en los que la mayoría de las células tumorales están en un estado dentro del ciclo (Williams y Stoeber, 2007, *supra*) (figura 13, figura 14, tabla 15). De estos tumores, 58% (fenotipo III) mostraron un avance del ciclo celular activo indicado por unos niveles de geminina mayores que 7%, un punto de corte definido por el índice de marcaje para el estado fuera de ciclo (figura 14, tabla 15). De manera notable, un gran número de cánceres de mama (fenotipo II), 24% de todos los tumores, muestra un fenotipo dentro de ciclo (Mcm2 >30%) pero expresa unos niveles de geminina menores que 7% que son indicativos de un estado G1 retrasado o detenido (Williams y Stoeber, 2007, *supra*; Stoeber *et al.*, 2001, *supra*; Blow y Hodgson, 2002, *supra*; Shetty *et al.*, Br. J. Cancer, 93:1295-1300, 2005; Dudderidge *et al.*, Clin. Cancer Res., 11:25110-2517, 2005; González *et al.*, J. Pathol., 204:121-130, 2004) (figura 14, tabla 15). De manera importante, la distribución de los otros biomarcadores de S-G2-M entre los tres grupos es un reflejo exacto de la observada para la geminina, lo cual refuerza aún más la segregación en tres fenotipos de ciclo celular diferenciados (figura 14).

Después, los inventores investigaron si el fenotipo del ciclo celular influye en el comportamiento *in vivo* y su asociación con variables clinicopatológicas que incluye NPI. De manera notable, no había asociación con la edad, el tamaño del tumor, la metástasis de nódulos linfáticos, ER/PR o el estado del receptor de Her2. Sin embargo, una mayor proporción de tumores de grado 3, los que muestran una diferenciación detenida, muestra el fenotipo de ciclo activo. Este perfil de ciclo celular también está asociado con una mayor puntuación de NPI ($p < 0,001$) (tabla 15). El análisis de una variable y de múltiples variables ajustado para NPI también demuestra que el fenotipo de ciclo celular es una potente variable predictiva de la supervivencia sin enfermedad. El fenotipo en ciclo activo (fenotipo III) muestra un riesgo mucho mayor de recaída que los fenotipos I y II en análisis de una variable y de múltiples variables, HR = 3,90 (1,81-8,40), $p < 0,001$, y HR = 2,17 (1,81-6,23), $p = 0,019$, respectivamente (figura 15). De manera intrigante, se observó un riesgo de recaída bajo casi idéntico entre tumores fuera de ciclo bien diferenciados y tumores de grado alto que muestran un fenotipo de G1 retrasada/detenida (fenotipos I y II) (HR = 1,00 [0,22-4,46], $p = 0,99$; figura 15). De manera notable, se observó una fuerte asociación significativa entre el subtipo del cáncer de mama y el fenotipo del ciclo celular ($p < 0,001$). La proporción de pacientes con un fenotipo en ciclo activo (fenotipo III) fue significativamente mayor en los subtipos de Her-2 (91%, 10/11) ($p = 0,003$) y el subtipo triple negativo (96%, 25/26) ($p < 0,001$) que en el subtipo luminal (49%, 71/145) (figura 16). Mientras que la proporción de tumores negativos a receptores de hormonas muestran el fenotipo fuera de ciclo (fenotipo I), y el fenotipo de G1 retrasada/detenida (fenotipo II) es sólo 4% (1/26) y 9% (1/11), respectivamente, en el subtipo luminal la proporción es de 51% (74/145), de los cuales 21% (30/145) muestra el fenotipo I y 30% (44/145) el fenotipo II (figura 16).

Análisis

El análisis de las vías complejas y redundantes que controlan procesos tales como la proliferación, la diferenciación, la apoptosis y la respuesta a daños en el ADN mediante un análisis amplio del genoma global está demostrando tener limitaciones como herramienta de prognosis en el cáncer de mama (Dunkler *et al.*, Eur. J. Cancer, 43:745-751, 2007). Los inventores se han centrado en la maquinaria del ciclo celular altamente conservada en la evolución que se encuentra corriente abajo de las vías de señalización complejas que afectan al avance del ciclo celular y por tanto pueden considerarse como un punto de integración para la información transducida a través de estas vías. Los inventores han descubierto que esta nueva forma de análisis del ciclo celular de múltiples parámetros no sólo proporciona nuevos conocimientos de la cinética del ciclo celular de los tumores, sino que también tiene importancia para la prognosis en una serie de tipos de tumores, incluyendo cáncer de próstata, renal y de ovario.

Los análisis de los inventores de los factores de licencia de replicación del ADN y los reguladores mitóticos caracterizan aún más el inusual estado del ciclo celular en tejido de mama premenopáusico. Aunque la fracción de crecimiento identificada por el marcador de la proliferación convencional Ki67 es pequeña, un gran número de células epiteliales mamarias dentro de TDLU expresa Mcm2, lo cual indica que un gran número de células parecen tener licencia y por tanto están "dentro de ciclo". Sin embargo, estas células no expresan marcadores del avance del ciclo celular, que incluyen los marcadores de S-G2-M geminina, Aurora A, PLK2 y el marcador mitótico H3S10ph, lo cual indica que estas células están en un estado G1 detenido. Este estado con licencia cebado en la mama que no está en proliferación puede ser una adaptación evolutiva que permite una respuesta rápida al embarazo, pero también la incapacidad para infrarregular la vía de licencia de replicación de ADN puede hacer que sea más fácil la transición hacia un estado de proliferación celular incontrolada.

Los análisis de los inventores del ciclo celular del cáncer de mama demuestran que unos menores niveles de diferenciación tumoral y una mayor inestabilidad genómica, que son características de los tumores más agresivos, están asociados con unos mayores niveles de Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1 y H3S10ph, que son indicativos de una mayor proporción de células dentro del ciclo celular. Sin embargo, en contraste con el ovario, unos menores niveles de diferenciación tumoral y aneuploidía no están asociados con una avance acelerado del ciclo celular. Además, no se observó asociación entre el estadio tumoral y los biomarcadores del ciclo celular, de nuevo en contraste con el ovario, en el que existen asociaciones muy significativas entre Aurora A, H3S10ph y el estadio FIGO del tumor. Esto implica que existen diferencias fundamentales en la desregulación de la maquinaria del ciclo celular entre diferentes tipos de tumores y que pueden estar relacionadas con diferentes entornos genéticos del cáncer.

Los análisis de los inventores del cáncer de mama han demostrado que los constituyentes centrales de la vía de licencia de replicación del ADN (reguladores de G1-S) y la maquinaria mitótica (reguladores de G2-M) son poderosos marcadores de prognosis independientes en el cáncer de mama, y añaden valor al valor de prognosis de la puntuación de NPI por sí sola. De manera intrigante, los marcadores de prognosis más poderosos de la recurrencia y la supervivencia son las quinasas mitóticas Aurora A y PLK1, siendo ambas en la actualidad un importante centro de atención de los programas de descubrimiento de fármacos del cáncer de inhibidores de molécula pequeña. Esto plantea la posibilidad de que el análisis del ciclo celular de múltiples parámetros de muestras de biopsia tumorales puede utilizarse como ensayo predictivo para moléculas pequeñas que se dirigen a la maquinaria del ciclo celular. De manera importante, la expresión de PLK1 y Aurora A muestra un considerable solapamiento entre grados y estadíos lo cual indica que los parámetros clinicopatológicos tradicionales probablemente sean inadecuados para predecir la respuesta terapéutica. Los datos de los inventores apoyan el concepto de una coevolución de los biomarcadores y la terapia dirigida individualizada para la introducción con coste bajo de nuevos inhibidores de molécula pequeña en la práctica clínica. Además, de los compuestos terapéuticos basados en el mecanismo, el análisis del ciclo celular de múltiples parámetros también puede ser valioso para predecir la respuesta a agentes quimioterapéuticos convencionales y a la radiación ionizante. Las células que no están en proliferación que se han retirado del ciclo tienen una importancia particular para la quimioterapia, puesto que son inmunes a los agentes relacionados con la fase S y la mitosis. Además, la fase del ciclo celular determina la radiosensibilidad relativa de una célula tumoral, siendo las células en fase G2-M más radiosensibles, en fase G1 menos sensibles, y aún menos sensibles durante la fase tardía de la fase S.

Muchos de los marcadores del ciclo celular estudiados, que incluyen Ki67, Mcm2, geminina, Aurora A, PLK1 y H3S10ph, están asociados con la recurrencia del cáncer de mama. De manera importante, los efectos siguen siendo estadísticamente significativos después de ajustar para NPI y, por tanto, son factores de prognosis independientes. Sin embargo, estos componentes críticos de la maquinaria del ciclo celular se encuentran en el punto de convergencia de las vías de señalización mitogénicas corriente abajo de los genes de respuesta inmediata temprana y tardía y del sistema de control regulador transcripcional E2F.

En resumen, los inventores han demostrado que constituyentes centrales de la maquinaria del ciclo celular, un punto de integración para las vías reguladores del crecimiento corriente arriba, pueden potenciar en gran medida la evaluación de la prognosis en el cáncer de mama y proporcionan información adicional a la de los parámetros clinicopatológicos convencionales y la puntuación de NPI integrada. Aurora A y PLK1 parecen tener una importancia de prognosis particular y, por tanto, pueden tener potencial como marcadores predictivos para inhibidores selectivos de quinasas mitóticas que ahora están siendo introducidos en ensayos clínicos.

Ejemplo 2: Los factores de licencia de replicación del ADN y las Aurora quinasas están relacionados con la aneuploidía y el resultado clínico en el cáncer de ovario epitelial

Cohorte de estudio

Se identificaron 143 pacientes diagnosticadas con EOC entre el 1 de enero de 1999 y el 31 de diciembre de 2004, de la base de datos de carcinoma ovárico en el Departamento de Oncología (University College London Hospital Gynaecological Cancer Centre, UCL Hospitals, Londres, Reino Unido). Las pacientes se seleccionaron basándose en el material histológico disponible. Los especímenes histológicos habían sido evaluados por un patólogo de oncología ginecológica en el momento del diagnóstico y se clasificaron según el subtipo histológico y el grado nuclear según el criterio de la OMS. La mayoría de las pacientes fueron evaluadas después de completar el tratamiento cada 3 a 6 meses durante 2 años, y después una vez al año. Se obtuvo la siguiente información clínica directamente de las notas del hospital sobre el paciente: fecha de nacimiento, fecha del diagnóstico, descubrimientos operatorios incluyendo la cantidad de enfermedad residual, estadio de la Federation of International Obstetricians and Gynecologists (FIGO) basado en los descubrimientos del examen clínico y la exploración quirúrgica, junto con los resultados de citologías, valores de CA125 en el diagnóstico y recaída, estado de actuación al comienzo de la quimioterapia, fecha de recaída, fecha del último seguimiento, y fecha y causa de la muerte. De las 143 pacientes, 67 (47%) sufrieron una recaída durante el periodo de estudio. El tiempo medio hasta la recaída entre las que sufrieron una recaída fue de 16,9 meses (SD, 11,0 meses; intervalo, 0-47 meses). El tiempo medio de seguimiento entre las que no sufrieron una recaída fue de 33,2 meses (SD, 18,5 meses; intervalo, 5-75 meses). Murieron 34 pacientes (24%) dentro del periodo de estudio, y 107 aún estaban vivas en el último seguimiento. El tiempo medio de supervivencia entre las que murieron fue de 21,9 meses (SD, 15,6 meses; intervalo, 0-60 meses). El tiempo medio de seguimiento entre las que aún no habían muerto fue de 33,3 meses (SD, 18,8 meses; intervalo, 5-75 meses). Dos pacientes no siguieron el seguimiento. Se obtuvo la aprobación del comité de ética de los comités conjuntos de UCL/UCLH Committees on the Ethics of Human Research.

Anticuerpos

Se generaron anticuerpos policlonales de conejo contra la geminina humana según se ha descrito (Wharton *et al.*, Br. J. Cancer, 91:262-269, 2004). Se obtuvo el anticuerpo monoclonal de Ki67 (clon MIB-1) de DAKO, el anticuerpo monoclonal de Mcm2 (clon 46) de BD Transduction Laboratories, el anticuerpo monoclonal de Aurora A NCL-L-AK2 (clon JLM28) de Novocastra Laboratories, el anticuerpo policlonal de Aurora B Ab2254 de Abcam PLC, y el

anticuerpo policlonal de la histona H3 fosforilada en la serina 10 (H3S10ph) de Upstate.

Cultivo celular y sincronización

Se cultivaron células HeLa S3 (European Collection of Animal Cell Cultures 87110901) y se sincronizaron según se ha descrito (Stoeber *et al.*, 2001, *supra*). La sincronización del ciclo celular se verificó mediante citometría de flujo de núcleos aislados como se ha descrito previamente (Krude *et al.*, Cell, 88:109-119, 1997). Preparación de extractos de proteínas e inmunotransferencia: Las células HeLa S3 se recolectaron mediante un tratamiento con tripsina, se lavaron en PBS, y se resuspendieron en tampón de lisis [Tris-Cl 50 mmol/l (pH 7,5), NaCl 150 mmol/l, EDTA 20 mmol/l, NP40 al 0,5%] a 2×10^7 células/ml. Después de una incubación en hielo durante 30 min, el lisado se aclaró mediante centrifugación (13.000 x g, 15 min, 4 °C). Los lisados se separaron mediante una SDS del 4% al 20%-PAGE (75 µg/pocillo) y se inmunotransfirieron como se ha descrito previamente (Stoeber *et al.*, 2001, *supra*). El bloqueo, las incubaciones con anticuerpos y las etapas de lavado se realizaron utilizando las siguientes condiciones: PBS/Tween-20 al 0,1%/leche al 5% para Mcm2 y Aurora A, PBS/Tween-20 al 1%/leche al 10% para geminina, y PBS/leche al 5% para Aurora B y H3S10ph.

Inmunohistoquímica

Pudo utilizarse tejido de archivo introducido en parafina y fijado con formaldehído obtenido en el diagnóstico inicial para todas las pacientes, y para cada espécimen se eligió un bloque que contenía una muestra representativa de un tumor invasivo. Se utilizaron cortes de secciones en serie consecutivos de cada bloque de tejido introducido en parafina para la inmunohistoquímica. Se cortaron secciones de 3 µm sobre portaobjetos Superfrost Plus (Visions BioSystems), se retiró la cera con xileno, y se rehidrataron con alcohol de graduación descendiente hasta agua. Las secciones de tejido se cocieron a presión en tampón citrato 0,1 mol/l a pH 6,0 durante 2 min y se inmunotifieron utilizando el kit Bond Polymer Refine Detection y el sistema automático Bond-X (Vision BioSystems). Se aplicaron anticuerpos primarios a las siguientes diluciones: Ki67 (1:100), Mcm2 (1:2.000), geminina (1:600), Aurora A (1:50), Aurora B (1:200), y H3S10ph (1:300). Se aplicaron los cubreobjetos con medio de montaje Pertex (Cell Path Ltd.). Se empleó una incubación sin anticuerpos primarios como control negativo y secciones epiteliales colónicas como controles positivos.

Análisis del perfil de expresión de proteínas

Se realizó el análisis de expresión de proteínas mediante la determinación del índice de marcaje de los marcadores en cada tumor según se ha descrito previamente (Shetty *et al.*, 2005, *supra*; Dudderidge *et al.*, 2005, *supra*). Se evaluaron los portaobjetos con un aumento bajo (100 x) para identificar regiones del tumor con la mayor intensidad de tinción. A partir de estas áreas seleccionadas se capturaron de tres a cinco campos con un aumento de 400 x con una cámara con dispositivo acoplado cargado y un paquete informático de análisis (SIS). Las imágenes después se imprimieron para el análisis cuantitativo, que se realizó sin que el observador supiera las variables clinicopatológicas. Se contaron las células positivas y negativas dentro del campo y se excluyeron las células estromáticas o inflamatorias. El criterio para la identificación de células positivas depende del biomarcador: para Ki67, Mcm2, geminina, Aurora B y H3S10ph, las células con cualquier grado de tinción nuclear se clasificaron como positivas. Para Aurora A, las células con cualquier grado de tinción nuclear o citoplásmica se clasificaron como positivas (Gritsko *et al.*, 2003, *supra*). Se contó un mínimo de 500 células para cada caso. El índice de marcaje se calculó utilizando la siguiente fórmula: índice de marcaje = número de células positivas/número de células totales x 100. La reevaluación de 10 casos seleccionados al azar por un asesor independiente mostró unos altos niveles de concordancia.

Citometría de imagen de ADN

Para cada caso se empleó una sección de 40 µm de tejido introducido en parafina obtenido del mismo bloque que el utilizado en la evaluación mediante inmunohistoquímica, para preparar núcleos según se ha descrito (Sudbo *et al.*, 2001, *supra*; Haroske *et al.*, 1997, *supra*). Se empleó el sistema de ploidía del ADN Fairfield (Fairfield Imaging Ltd.) para el procesamiento, análisis y clasificación de imágenes, según se ha descrito (Sudbo *et al.*, 2001, *supra*). Se incluyeron linfocitos y células plasmáticas como controles internos y secciones de 40 µm de tumor de vejiga de grado alto y de tejido colónico normal como controles externos para poblaciones aneuploides y diploides, respectivamente. Los histogramas se clasificaron según criterios publicados (Sudbo *et al.*, 2001, *supra*; Haroske, 1998, *supra*). Los histogramas fueron clasificados por dos asesores independientes con un alto nivel de concordancia sin que conociesen las variables clinicopatológicas. Para el análisis estadístico, los tumores tetraploides y poliploides se agruparon junto con los tumores aneuploides.

Análisis estadísticos

Se utilizó el coeficiente de correlación de rangos de Spearman para estudiar las asociaciones entre marcadores. Se evaluaron las relaciones entre la expresión de biomarcadores y el grado del tumor, el estadio, y el estado de poliploidía utilizando el ensayo no paramétrico de Jonckheere-Terpstra y el ensayo de la U de Mann-Whitney según fuera apropiado. Los datos entonces se resumieron como el valor de la mediana y el intervalo intercuartil de los índices de marcaje observados a lo largo de la cohorte. El análisis de los datos de supervivencia sin enfermedad y

global se realizó utilizando una gráfica de Kaplan-Meier (utilizando terciles para biomarcadores), un ensayo de rangos logarítmicos, y una regresión de Cox (tratando a los biomarcadores como variables continuas a menos que se indique lo contrario). Para cada biomarcador, la cohorte se dividió en grupos de terciles basándose en el índice de marcaje. Dentro de cada grupo de terciles se calculó la proporción que quedaba sin enfermedad o viva, para la supervivencia sin enfermedad o global, respectivamente, utilizando el método de Kaplan-Meier. En un primer momento, se consideró que las proporciones de riesgo (HR, "hazard ratio") con intervalos de confianza del 95% (CI 95%) para los biomarcadores no estaban ajustadas, y después se ajustaron para la edad, el grado y el estadio. Los pacientes con datos incompletos se excluyeron del análisis de múltiples variables. Los biomarcadores candidatos se listan en la tabla suplementaria S1. Todos los análisis fueron bilaterales, y se utilizó un nivel de significancia de 0,05 y no se hicieron concesiones para ensayos de hipótesis múltiples. Los análisis se realizaron utilizando SPSS 12.0 para Windows (SPSS, Inc.).

Resultados

Validación del análisis de múltiples parámetros de los biomarcadores y sus implicaciones biológicas

Se confirmó la mono especificidad de los anticuerpos contra Mcm2, geminina, Aurora A, Aurora B y H3S10ph en extractos de células totales de células HeLa S2 asincrónicas mediante la detección de una única proteína con una masa molecular coherente con la movilidad electroforética referida del correspondiente antígeno humano (figura 10A). Las células HeLa S2 se seleccionaron en primera instancia para estudios *in vitro*, puesto que esta línea tiene unos tiempo de tránsito de fase del ciclo celular bien caracterizados y unos protocolos de sincronización establecidos. Se inmunotransfirieron lisados de células totales de células sincronizadas, con los anticuerpos caracterizados (figura 10B). Los niveles de Mcm2 no variaron significativamente durante el paso a través del ciclo celular, mientras que la expresión de geminina se limitó a S-G2-M. Los niveles de Aurora A aumentaron durante la fase S y alcanzaron un máximo durante la mitosis, produciéndose la degradación de 2 a 4 horas después de abandonar la detención mitótica. De manera similar, los niveles de Aurora B fueron insignificantes durante la fase G1, aumentando gradualmente durante la fase S para alcanzar un máximo durante G2-M, y disminuyeron después de la mitosis. La presencia de H3S10ph se limitó a la mitosis, lo cual consolida la lógica para su uso como marcador mitótico. Se observó una expresión dependiente del ciclo celular idéntica de estos biomarcadores en células de cáncer de ovario SK-OV 3 sincronizadas (los datos no se muestran). Puesto que Ki67 se expresa a lo largo del ciclo celular en células en proliferación, y la expresión de geminina se limita a la fase S-G2-M, los investigadores han propuesto que la proporción de geminina/Ki67 pueda utilizarse como indicador de la longitud relativa de G1 y, por tanto, la velocidad de avance del ciclo celular. Los datos descritos anteriormente confirman que la expresión dependiente del ciclo celular de Aurora A y Aurora B también permite el uso de sus proporciones con Ki67 como indicadores del avance del ciclo celular. Una mayor expresión de geminina siempre se limita a la fase S-G2-M, incluso en tumores muy agresivos. Por tanto, los descubrimientos de los inventores *in vitro* también indican que el aumento en la proporción relativa entre Aurora A o Aurora B y geminina (proporción > 1) sería indicativa de una sobreexpresión de la quinasa durante el ciclo celular. Para evaluar la importancia de prognosis de estos descubrimientos *in vitro* y sus implicaciones biológicas en el EOC, se analizó la expresión de los biomarcadores en una serie de 143 casos (figura 10C). También se estudió la expresión de proteínas en cinco casos de tejido ovárico normal. La expresión de los biomarcadores fue extremadamente baja (<4%) en el epitelio superficial de ovario normal, de acuerdo con su menor capacidad proliferativa (los datos no se muestran). Por contraste, EOC muestra unos niveles altos de expresión de los biomarcadores, indicativos de la reentrada en el ciclo celular y la proliferación.

Después se estudiaron las correlaciones entre parejas de biomarcadores a través de la serie tumoral. Los niveles de expresión de Aurora A y Aurora B muestran una fuerte correlación positiva con los de su sustrato H3S10ph [correlación de Spearman, 0,57 (CI 95%, 0,45-0,67) y 0,52 (CI 95%, 0,39-0,63), respectivamente]. Los niveles de expresión de Mcm2, geminina, y H3S10ph presentaban una fuerte correlación positiva con los niveles de Ki67 [correlación de Spearman, 0,73 (CI 95%, 0,64-0,8); 0,74 (CI 95%, 0,66-0,81); y 0,52 (CI 95%, 0,39-0,63) respectivamente], lo cual apoya su papel como marcadores de la proliferación. De manera notable, las proporciones de geminina/Ki67 y Aurora A/Ki67 presentaban una correlación positiva pero menos fuerte con H3S10ph [correlación de Spearman, 0,25 (CI 95%, 0,09-0,40) y 0,42 (CI 95%, 0,27-0,55), respectivamente], lo cual refleja los cambios en la longitud relativa de G1 en oposición a unos tiempos de tránsito de S-G2-M prolongados que pueden surgir por la activación de las vías de punto de control intra-S o G2-M.

Esto es coherente con que una masa tumoral sólo se hace clínicamente detectable después de que las células tumorales hayan experimentado una proporción importante de su duplicación de la población, aproximadamente 30 de duplicaciones de un total de 40. El número de duplicaciones de la población representa la máxima masa compatible con la vida, un punto en la evolución clonal somática en el que la mayoría de los mecanismos de punto de control del ciclo celular han sido anulados.

Relación entre biomarcadores, estado de ploidía del ADN tumoral y parámetros clinicopatológicos

Las características clinicopatológicas de la cohorte del estudio se resumen en la tabla 10. Para investigar la relación entre los biomarcadores y la inestabilidad genómica, los inventores conectaron sus perfiles de expresión con el contenido en ADN tumoral. Se produce una asociación muy significativa entre los niveles de expresión de todos los

biomarcadores y varias proporciones de biomarcador/Ki67 y la inestabilidad genómica (tabla 11), lo cual refleja una mayor proporción de células dentro de ciclo y un avance acelerado del ciclo celular en tumores aneuploides comparado con tumores diploides.

5 Los seis biomarcadores también presentaban una fuerte asociación con el grado del tumoral (tabla 12); sin embargo, existe algo de solapamiento entre la distribución de los niveles de biomarcadores entre los grados (por ejemplo, niveles de Aurora A, figura 11). Estos datos confirman una proporción creciente de células dentro del ciclo a medida que aumenta la anaplasia del tumor, pero también indican que los biomarcadores no distinguen totalmente entre los grados para todos los pacientes dentro de cada grado.

10 De acuerdo con estos descubrimientos, se encontró una asociación muy significativa entre el grado del tumor y el estado de ploidía ($p < 0,001$). Las proporciones de geminina/Ki67, Aurora A/Ki67, Aurora B/Ki67 y H3S10ph/Ki67 también están significativamente asociados con la diferenciación del tumor (tabla 12), lo cual indica una velocidad acelerada del avance del ciclo celular en tumores de grado alto. Por contraste, y en coherencia con los descubrimientos de los inventores en otros tipos de tumores, la proporción de Mcm2/Ki67 disminuye a medida que aumenta el grado del tumor (tabla 12), lo cual refleja un desplazamiento en la proporción de células no proliferativas pero con licencia de replicación del ADN en tumores bien diferenciados, a células en ciclo activo en tumores poco diferenciados. La correlación positiva entre la expresión de geminina y el aumento de la anaplasia del tumor y la inestabilidad genómica (tablas 11 y 12) indica que este represor de la licencia no se comporta como un supresor tumoral en el EOC.

20 Se descubrió una asociación significativa entre Aurora A, H3S10ph, Aurora A/Ki67, H3S10ph/Ki67 y el estadio tumoral (tabla 13). Esto sugiere que la desregulación de la Aurora A puede ser un acontecimiento clave en la tumorigénesis ovárica epitelial temprana y el avance a un estadio de la enfermedad avanzado. Además, el estadio de la enfermedad avanzado estaba significativamente asociado con un aumento en la proporción de Aurora A/geminina ($p = 0,04$; tabla 13), lo cual apoya la conexión entre la desregulación de la Aurora A y el avance del tumor.

25 Relación entre biomarcadores, estado de ploidía del ADN tumoral y resultado del paciente

Análisis de una variable

30 Aurora A ($p = 0,01$; figura 12A), Aurora A/Ki67, Aurora B/Ki67, y H3S10ph (tabla 14) estaban todos significativamente asociados con una supervivencia sin enfermedad más corta pero no con la supervivencia global. La edad del paciente, el grado del tumor, y el estadio también son variables predictivas de la supervivencia sin enfermedad, teniendo un tiempo hasta la recaída significativamente más largo las pacientes más jóvenes, los tumores bien diferenciados y, en particular, la enfermedad en un estadio temprano [HR, 1,02 (1,00-1,05), $p = 0,05$; HR, 1,59 (1,03-2,45), $p = 0,04$; HR, 2,07 (1,58-2,71), $p < 0,0001$, respectivamente]. La edad del paciente y el estadio tumoral también predicen la supervivencia global [HR, 1,05 (1,02-1,09), $p = 0,003$; HR, 3,21 (1,33-7,79), $p = 0,01$, respectivamente], pero no el grado del tumor ($p = 0,70$), lo cual enfatiza las limitaciones de los actuales sistemas de clasificación. El estado de ploidía del tumor también está significativamente correlacionado con la supervivencia sin enfermedad [HR, 1,80 (1,05-3,08), $p = 0,03$; figura 12B], con una tendencia a una supervivencia global más corta en pacientes con tumores aneuploides, aunque esto no alcanzó significancia estadística [HR, 1,95 (0,88-4,31), $p = 0,10$].

40 Los inventores subdividieron la serie en dos grupos, la enfermedad de estadio temprano (FIGO estadios I y II) y la enfermedad en estadio avanzado (FIGO estadios III y IV) para definir con más precisión los subgrupos específicos para los cuales los biomarcadores pueden tener una importancia de pronóstico particular. Tanto Aurora A como la proporción Aurora A/Ki67 fueron fuertemente predictivos de una supervivencia sin enfermedad más corta [HR, 1,72 (1,19-2,48), $p = 0,004$ (figura 12C); HR, 1,59 (1,13-2,24), $p = 0,008$, respectivamente] y la supervivencia global [HR, 1,81 (1,14-2,87), $p = 0,01$ (figura 12E); HR, 1,68 (1,11-2,54), $p = 0,01$, respectivamente] en el subgrupo de estadio temprano. Esta asociación no se descubrió en el subgrupo de estadio avanzado [HR, 1,06 (0,81-1,37), $p = 0,67$; HR, 1,04 (0,90-1,20), $p = 0,58$ para la supervivencia sin enfermedad; y HR, 0,88 (0,58-1,33), $p = 0,88$; HR, 0,89 (0,69-1,15), $p = 0,36$ para la supervivencia global, respectivamente]. El estado de ploidía del tumor también predice la supervivencia sin enfermedad [HR, 4,58 (1,04-20,19), $p = 0,04$; figura 12D], con una tendencia hacia una supervivencia global más corta en pacientes con tumores aneuploides [HR, 6,34 (0,82-49,18), $p = 0,08$; figura 12D] en el subgrupo de estadio temprano. Sin embargo, pierde su valor predictivo en el subgrupo de estadio avanzado [HR, 1,47 (0,81-2,66), $p = 0,21$; y HR, 1,36 (0,55-3,33), $p = 0,5$ para la supervivencia sin enfermedad y la supervivencia global, respectivamente].

Análisis de múltiples variables

55 Un análisis de la supervivencia con regresión de Cox demuestra que el estadio tumoral era la única variable predictiva independiente significativa de la supervivencia sin enfermedad [HR, 2,06 (1,49-2,85), $p < 0,0001$]. La edad del paciente y el estadio tumoral son variables predictoras independientes de la supervivencia global, teniendo las pacientes más mayores y los tumores de estadio avanzado los tiempos de supervivencia global más cortos [HR, 1,05 (1,01-1,09), $p = 0,007$; HR, 3,19 (1,31-7,75), $p = 0,01$, respectivamente]. Aunque varios biomarcadores

resultaron factores de prognosis significativos en los análisis de una variable, ninguno fue una variable predictiva significativa de la supervivencia sin enfermedad o global después del ajuste para la edad, el grado y el estadio. Esto es debido parcialmente a las asociaciones altamente significativas entre los biomarcadores y el grado y estadio tumoral, lo que hace difícil separar sus efectos independientes.

5 Análisis

Este estudio se llevó a cabo para alcanzar un mayor conocimiento de los marcadores biológicos del EOC que puedan tener un valor de prognosis y predictivo, y que podrían conducir a una mayor comprensión de su patogénesis. Los descubrimientos de los inventores demuestran que los factores de licencia de replicación Mcm2 y geminina, y las Aurora A y B quinasas, junto con su sustrato H3S10ph, tienen valor de prognosis en EOC. La asociación encontrada entre la diferenciación del tumor y este conjunto de biomarcadores tiene implicaciones para su uso como marcadores de la proliferación con un potencial para mejorar aún más el actual sistema de clasificación. El análisis de múltiples parámetros de los inventores demuestra que también puede utilizarse para proporcionar información acerca del avance del ciclo celular en muestras de tumores de pacientes, datos que se traducen en importante información de prognosis.

Estos descubrimientos están de acuerdo con los análisis de los factores de licencia en el cáncer de mama y de células renales. Además, la asociación altamente significativa encontrada entre este conjunto de biomarcadores y el estado de ploidía del tumor sugiere que la desregulación de la maquinaria de licencia y las quinasas mitóticas está relacionada, de modo intrincado, con el desarrollo de inestabilidad genética en el EOC. La Aurora A desempeña un papel regulador en varias etapas clave de la transición G2-M. En la presente se presenta una conexión intrigante entre la regulación aberrante de Aurora A y el avance del EOC. Los datos de los inventores demuestran asociaciones altamente significativas entre Aurora A, H3S10ph y el estadio tumoral FIGO, apoyando la opinión de que la desregulación de Aurora A podría ser un acontecimiento temprano en la carcinogénesis ovárica epitelial y sugiriendo que su desregulación podría desempeñar un papel en el avance hacia la enfermedad avanzada.

En línea con estos descubrimientos, la proporción de Aurora A/geminina es significativamente mayor en los tumores de estadio avanzado, lo cual también sugiere que la sobreexpresión de Aurora A podría desempeñar un papel o podría ser el resultado del avance del tumor. *In vivo*, es probable que dicha sobreexpresión sea regulada no sólo por la amplificación de genes sino también por otros mecanismos, tales como la activación transcripcional y la supresión de la degradación de proteínas. Los datos de los inventores sugieren que el análisis de múltiples parámetros de Aurora A y H3S10ph permitiría una estadificación molecular que podría utilizarse para complementar los métodos de estadificación clínica. El estadio FIGO es un indicador de prognosis importante en el EOC, aunque los métodos de estadificación quirúrgicos y radiológicos tienen sus limitaciones. Ensayos aleatorizados han demostrado que una quimioterapia adyuvante es particularmente beneficiosa en pacientes subóptimamente estadificados con enfermedad de estadio I. Sin embargo, en un reciente gran ensayo controlado aleatorizado, sólo 34% de los pacientes estaban óptimamente estadificados según las líneas directrices (Vegote, I., *et al.*, *Curr. Op. Oncol.*, 2003, 15:452-455). En los pacientes que no están estadificados de modo adecuado, estos biomarcadores podrían proporcionar pruebas de apoyo de un verdadero estadio I o de enfermedad más avanzada, ayudando a la decisión acerca del uso de quimioterapia adyuvante. Los descubrimientos de los ensayos ICON 1/ACTION sugieren un pequeño beneficio global para la quimioterapia adyuvante (Trimbos, J.B., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2003, 95:105-112) pero sigue sin estar claro cuáles son los pacientes estadificados de forma adecuada con enfermedad de estadio I que realmente necesitan quimioterapia.

Aurora A, H3S10ph y la inestabilidad genómica también son variables predictivas significativas de la supervivencia sin enfermedad en esta cohorte de estudio. Otros análisis de subgrupos demuestran que Aurora A y el estado de ploidía del tumor son variables predictivas de la supervivencia sin enfermedad (la expresión de Aurora A también predice la supervivencia global) en la enfermedad temprana. Sin embargo, esta asociación se reduce cuando se toman en cuenta factores de prognosis, tales como la edad y el estadio. Por contraste, estas variables pierden su valor predictivo en la enfermedad avanzada [por ejemplo, HR para Aurora A disminuye de 1,72 (1,19-2,48) en la enfermedad de estadio temprano, a 1,06 (0,81-1,37) para la enfermedad de estadio avanzado], lo cual sugiere que otros factores biológicos podrían tener prioridad para influir en la recaída y el resultado en estos pacientes. Además, la complejidad y la heterogeneidad de los regímenes de tratamiento podría ocultar el valor predictivo de estos biomarcadores en estadios avanzados.

Tomados conjuntamente, los datos de los inventores apoyan un mecanismo biológico por el cual la desregulación de Aurora A en un momento temprano durante la tumorigénesis podría contribuir a la inestabilidad genética, dando como resultado tumores agresivos y una supervivencia más corta en un subgrupo de pacientes con la enfermedad en estadio temprano.

Los factores de licencia de replicación del ADN y las quinasas mitóticas son reguladores críticos del avance del ciclo celular, y así son el foco de atención de los actuales programas de desarrollo de fármacos terapéuticos. En la presente, los inventores han demostrado que el análisis de múltiples parámetros de la expresión de reguladores centrales de las transiciones G1-S y G2-M permite la evaluación de la velocidad del avance del ciclo celular en muestras de tumores de pacientes individuales, variables que están relacionadas con el comportamiento biológico

5 de estos tumores. Este tipo de análisis podría utilizarse como ensayo predictivo para moléculas pequeñas que se dirigen a la maquinaria del ciclo celular o a vías de transducción de señales del crecimiento corriente arriba que aceleran el avance del ciclo celular. Además, la observación de que la expresión de Aurora A no distingue totalmente entre los grados demuestra que las variables clinicopatológicas tradicionales no siempre permiten la predicción de la respuesta terapéutica, lo cual apoya el concepto de coevolución de los biomarcadores y la terapia dirigida individualizada. A la vista de los recientes desarrollos de inhibidores de Aurora quinasas específicos, los datos de los inventores tienen importantes implicaciones (de prognosis, predictivas y terapéuticas) para el uso de Aurora A como biomarcador y diana terapéutica potencial.

Bibliografía

- 10 Barkley *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 313:3789-3799, 2007.
 Blow y Hodgson, *Trends Cell Biol.*, 12:72-78, 2002.
 Dudderidge *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11:2510-2517, 2005.
 Dudderidge *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 11:25110-2517, 2005.
 Dunkler *et al.*, *Eur. J. Cancer*, 43:745-751, 2007.
- 15 Eward *et al.*, *J. Cell Sci.*, 177:5875-5886, 2004.
 González *et al.*, *J. Pathol.*, 204:121-130, 2004.
 Gritsko *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 9:1420-1426, 2003.
 Haroske *et al.*, *Anal. Cell Pathol.*, 1998, 17:189-200, 1997.
 Kingsbury *et al.*, *Exp. Cell Res.*, 309:56-67, 2005.
- 20 Krude *et al.*, *Cell*, 88:109-119, 1997.
 Shetty *et al.*, *Br. J. Cancer*, 93:1295-1300, 2005.
 Stoeber *et al.*, *J. Cell Sci.*, 114:2027-2041, 2001.
 Stoeber *et al.*, *EMBO J.*, 17:7219-7229, 1998.
 Sudbo *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 344:1270-1278, 2001.
- 25 Wharton *et al.*, *Br. J. Cancer*, 91:262-269, 2004.
 Williams y Stoeber, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19:672-679, 2007.

Tabla 1: Dianas de proliferación de agentes quimioterapéuticos

Fármaco	Diana	Mecanismo de acción	Fase afectada
5-fluorouracilo	timidilato sintetasa	disminución de ribonucleótidos	S
Hidroxiurea	ribonucleótido reductasa	disminución de ribonucleótidos	S
Metotrexato	dihidrofolato reductasa	disminución de ribonucleótidos	S
Doxorrubicina	topoisomerasa II	estabilización del complejo de topoisomerasa II-ADN que conduce a la detención de la replicación	S
Etopósido	topoisomerasa II	estabilización del complejo de topoisomerasa II-ADN que conduce a la detención de la replicación y a la rotura de las hebras	S o G2/M
Cisplatino	ADN	entrecruzamiento intracatenario, que conduce a la detención de la replicación	G1/S y G2/M
Taxol	tubulina	estabilización de los microtúbulos	G2/M
Flavopiridol	CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 y CDK7	inhibición de las CDK mediante la interferencia con la unión del ATP	varias
Estaurosporina (UCN-01)	CDK1	activación inapropiada de CDK1 por fosforilación	G2/M abrogada
ZM447439	Aurora quinasa A y B	inhibe la fosforilación de la histona H3 en la serina 10	G2/M
BI 2536	Plk-1	detiene a la célula en la prometafase e inicia la destrucción de la ciclina A	M

CDK, quinasa dependiente de ciclina

Tabla 2: Características de los pacientes

		Frecuencia (número)
Edad (años)	<40	7% (12)
	40-49	19% (34)
	50-59	28% (51)
	60-69	22% (41)
	70+	24% (44)
Tamaño (mm)	<11	9% (16)
	11-20	33% (60)
	21-30	30% (54)
	31-40	16% (29)
	>40	13% (23)
Estado de los nódulos linfáticos	nódulos negativos	53% (97)
	positivos, 1 a 3	22% (40)
	positivos, 4 o más	18% (32)
	desconocido	7% (13)
Grado	1	13% (24)
	2	44% (80)
	3	43% (78)
Puntuación de NPI	media (SD), 4,49 (1,31)	
	<3,4	18% (32)
	3,4-5,4	51% (93)
	>5,4	24% (44)
	desconocido	7% (13)
Estado de ploidía	diploide	47% (86)
	aneuploide	50% (90)
	desconocido	3% (6)
Her2	0	59% (108)
	1+	18% (33)
	2+	7% (13)
	3+	15% (28)
ER	positivo (100%)	53% (96)
	negativo (<100%)	47% (86)
PR	positivo (<63%)	50% (91)
	negativo (>63%)	50% (91)

ER positivo PR positivo		37% (67)
ER o PR negativo		63% (115)
Invasión linfovascular	ausente	47% (86)
	presente	38% (69)
	desconocido	15% (27)
Tipo de tumor	invasivo ductal	78% (142)
	lobular	14% (26)
	mucinoso	2% (4)
	mixto	5% (9)
	micropapilar	1% (1)
Recurrencia del cáncer de mama	sí	26% (48)
	no	68% (124)
	desconocido	6% (10)
Muerte por cáncer de mama	sí	26% (48)
	no	68% (124)
	desconocido	6% (10)
Recurrencia en seguimiento (años)		632 (3,8 por sujeto)
Supervivencia en seguimiento (años)		684 (4,1 por sujeto)

Tabla 3: Relación entre biomarcadores y diferenciación tumoral

	Grado 1 (n = 24)	Grado 2 (n = 80)	Grado 3 (n = 78)	valor de p [†]
Ki67*	7,3 (2,4-17,6)	16,6 (8,05-30,9)	40,2 (25-66,9)	<0,001
Mcm2*	45,8 (17,1-65,6)	57,8 (29,3-83)	92,3 (70,0-100,0)	<0,001
Geminina*	2,0 (0,9-5,8)	6,5 (3,3-10,6)	17,4 (10,6-24,8)	<0,001
ER*	100,0 (100,0-100,0)	100,0 (94,0-100,0)	30,2 (0,0-100,0)	<0,001
PR*	93,5 (52,8-100,0)	87,9 (38,0-100,0)	0,0 (0,0-90,3)	<0,001
Aurora A*	1,7 (0,4-4,1)	4,3 (1,4-7,2)	11,7 (6,2-20,2)	<0,001
Plk1*	2,3 (0,3-5)	5,3 (2,6-9,7)	14,2 (8,9-21,7)	<0,001
H3phS10*	0,2 (0,03-0,5)	0,8 (0,3-1,6)	2,5 (1,4-3,8)	<0,001
Mcm2/Ki67	4,48 (2,74-6,35)	2,77 (2,04-5,00)	1,71 (1,25-3,00)	<0,001
Geminina/Ki67	0,36 (0,21-0,60)	0,36 (0,25-0,52)	0,38 (0,29-0,58)	0,29
Aurora A/Ki67	0,26 (0,11-0,42)	0,24 (0,13-0,33)	0,29 (0,16-0,42)	0,11
Plk1/Ki67	0,27 (0,12-0,51)	0,29 (0,22-0,50)	0,34 (0,26-0,50)	0,09
H3phS10/Ki67	0,045 (0,01-0,08)	0,046 (0,02-0,09)	0,060 (0,04-0,09)	0,04

[†] ensayo de Jonckheere-Terpstra

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↓ mediana (intervalo intercuartil)

Tabla 4: Relación entre biomarcadores y estado de ploidía del ADN tumoral

Biomarcador	Aneuploide (n = 90)	Diploide (n = 86)	valor de p [†]
Ki67*	30,0 (16,8-53,1)	17,5 (7,2-33,1)	<0,001
Mcm2*	75,8 (48,8-96,7)	63,1 (31,2-84,4)	0,009
Geminina*	11,5 (5,9-21,9)	6,9 (2,4-12,2)	<0,001
ER*	96,9 (8,0-100,0)	100,0 (65,7-100,0)	0,054
PR*	59,1 (0,0-97,0)	69,3 (0,0-100,0)	0,12
Aurora A*	7,3 (3,5-14,9)	4,1 (1,0-8,4)	<0,001
Plk1*	9,8 (4,8-15,7)	7,1 (2,1-11,1)	0,002
H3phS10*	1,78 (0,78-2,89)	0,70 (0,22-1,7)	<0,001
Mcm2/Ki67	2,16 (1,43-3,40)	2,85 (1,97-4,99)	0,004
Geminina/Ki67	0,38 (0,25-0,58)	0,36 (0,28-0,54)	0,74
Aurora A/Ki67	0,28 (0,15-0,40)	0,25 (0,12-0,42)	0,40
Plk1/Ki67	0,32 (0,22-0,48)	0,30 (0,22-0,57)	0,65
H3phS10/Ki67	0,053 (0,03-0,09)	0,050 (0,02-0,10)	0,48

[†] ensayo de Mann-Whitney

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↓ mediana (intervalo intercuartil)

5

Tabla 5: Relación entre biomarcadores y estado de los nódulos linfáticos

Biomarcador	Negativo (n = 97)	Positivo (n = 72)	valor de p [†]
Ki67*	22,7 (9,5-43,3)	24,8 (11,1-47,3)	0,49
Mcm2*	70,3 (36,2-90,1)	71,9 (42,2-98)	0,25
Geminina*	7,9 (3,6-16,3)	10,4 (5,1-18,2)	0,22
ER*	100,0 (60,6-100,0)	90,7 (0,0-100,0)	0,007
PR*	74,3 (4,5-100,0)	31,3 (0,0-96,1)	0,005
Aurora A*	5,3 (1,5-10,8)	7,0 (2,9-14,0)	0,16
Plk1*	7,5 (3,3-14,3)	9,2 (4,2-14,7)	0,22
H3phS10*	0,94 (0,37-2,38)	1,67 (0,68-2,93)	0,02
Mcm2/Ki67	2,57 (1,54-3,77)	2,25 (1,64-4,78)	0,92

Geminina/Ki67	0,36 (0,25-0,56)	0,38 (0,29-0,56)	0,38
Aurora A/Ki67	0,26 (0,12-0,38)	0,29 (0,17-0,48)	0,15
Plk1/Ki67	0,28 (0,22-0,48)	0,37 (0,22-0,52)	0,20
H3phS10/Ki67	0,046 (0,02-0,08)	0,061 (0,04-0,10)	0,02

↑ ensayo de Mann-Whitney

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↓ mediana (intervalo intercuartil)

Tabla 6: Relación entre biomarcadores y NPI

	Valor de expresión que define la mediana del marcador	Media de NPI por debajo de la mediana del marcador	Media de NPI por encima de la mediana del marcador	Correlación entre el marcador y NPI [↑]
Ki67*	24,0	4,13	4,86	+0,42, p<0,001
Mcm2*	70,7	4,10	4,88	+0,40, p<0,001
Geminina*	9,0	4,00	4,99	+0,44, p<0,001
ER*	99,9	4,97	4,05	-0,39, p<0,001
PR*	63,0	4,78	4,19	-0,34, p= 0,005
Aurora A*	6,10	4,09	4,87	+0,39, p<0,001
Plk1*	8,40	3,97	5,01	+0,46, p<0,001
H3phS10*	1,25	3,95	5,01	+0,47, p<0,001
Mcm2/Ki67	2,43	4,72	4,28	-0,24, p= 0,02
Geminina/Ki67	0,370	4,44	4,57	+0,05, p= 0,53
Aurora A/Ki67	0,263	4,33	4,66	+0,14, p= 0,07
Plk1/Ki67	0,310	4,33	4,68	+0,12, p= 0,12
H3phS10/Ki67	0,05087	4,23	4,76	+0,20, p= 0,01

5 * índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↑ coeficiente de correlación de Spearman no paramétrico

Tabla 7: Relación entre biomarcadores y estado de HER2

	0 (n = 108)	1+ (n = 33)	2+ (n = 13)	3+ (n = 28)	valor de p [†]
Ki67*	21,4 (9,5-43,9)	22,0 (7,2-35,8)	24,6 (10,2-52,1)	32,2 (19,7-48,2)	0,17
Mcm2*	70,5 (35,0-94,2)	63,3 (38,9-80,1)	75,0 (28,7-90,0)	78,3 (54,8-95,6)	0,67
Geminina*	8,4 (3,3-16,9)	7,9 (4,0-13,3)	10,6 (4,7-17,9)	15,7 (7,8-21,7)	0,056
ER*	100,0 (15,2-100,0)	100,0 (71,0-100,0)	96,4 (61,6-100,0)	70,0 (0,0-100,0)	0,12
PR*	81,2 (0,0-100,0)	58,4 (0,4-95,1)	45,8 (15,0-97,4)	0,0 (0,0-52,6)	<0,001
Aurora A*	5,8 (2,0-12,3)	6,0 (1,0-11,8)	5,9 (1,1-9,6)	8,9 (4,5-13,1)	0,43
Plk1*	7,5 (3,3-13,8)	6,1 (3,4-12,5)	10,2 (2,8-13,4)	11,2 (8,8-17,0)	0,073
H3phS10*	0,9 (0,34-2,67)	1,0 (0,46-2,60)	1,7 (0,72-2,39)	1,9 (0,98-2,82)	0,044
Mcm2/Ki67	2,57 (1,51-4,62)	2,96 (1,55-5,62)	2,22 (1,25-3,76)	2,27 (1,67-2,70)	0,38
Geminina/Ki67	0,37 (0,26-0,55)	0,35 (0,25-0,52)	0,43 (0,21-0,69)	0,37 (0,32-0,54)	0,60
Aurora A/Ki67	0,26 (0,15-0,39)	0,29 (0,13-0,44)	0,27 (0,11-0,38)	0,25 (0,15-0,41)	0,79
Plk1/Ki67	0,30 (0,21-0,48)	0,30 (0,23-0,55)	0,34 (0,16-0,54)	0,33 (0,25-0,50)	0,51
H3phS10/Ki67	0,050 (0,03-0,09)	0,062 (0,03-0,12)	0,066 (0,03-0,08)	0,050 (0,04-0,08)	0,47

[†] ensayo de Jonckheere-Terpstra

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↓ mediana (intervalo intercuartil)

Tabla 8: Relación del estado de HER2 y el estado de ploidía con NPI

	Media de NPI	Diferencia en las medias de NPI (CI 95%), valor de p
Ploidía		
Aneuploide (n = 83)	4,67	Diferencia = 0,33 (-0,07 a +0,74), p = 0,11*
Diploide (n = 81)	4,33	
HER2		
0 (n = 101)	4,35	Media de NPI es mayor por categoría de HER2 en 0,22 (0,04 a 0,40), p = 0,014 [†]
1+ (n = 31)	4,44	
2+ (n = 11)	4,53	
3+ (n = 26)	5,09	

* ensayo de la t desapareado

[†] ensayo de regresión lineal para la tendencia lineal

Tabla 9: Efecto de NPI sobre la recurrencia y sobre la muerte por cáncer

	Tasa de recurrencia	Tasa de muerte por cáncer
NPI		
<3,4	3% (1/30)	3% (1/30)
3,4-5,4	20% (17/87)	7% (6/87)
>5,4	54% (22/41)	34% (14/41)
HR (CI 95%)	1,79 (1,46 a 2,20), p<0,001	2,18 (1,63 a 2,93), p<0,001
HR después de ajustar para la edad	1,89 (1,47 a 2,23), p<0,001	2,15 (1,61 a 2,88), p<0,001

5

Tabla 10: Características de los pacientes

		n (%)
Edad (años)	media: 61	143
	intervalo: 20-88	
Grado histológico (n = 124)	1 (bien diferenciado)	16 (13%)
	2 (moderadamente diferenciado)	33 (27%)
	3 (poco diferenciado)	75 (60%)
Subtipo histológico (n = 143)	seroso	64 (45%)
	endometrioide	31 (21%)

ES 2 395 890 T3

	de células claras	20 (14%)
	mucinoso	13 (9%)
	adenocarcinoma (no especificado)	11 (8%)
	otro	4 (3%)
Estadio tumoral FIGO (n = 142)	1	48 (34%)
	2	14 (10%)
	3	66 (46%)
	4	14 (10%)
Terapia (n = 143)	cirugía + quimioterapia adyuvante	109 (76%)
	cirugía + quimioterapia neoadyuvante	18 (13%)
	sólo cirugía	13 (9%)
	sólo quimioterapia	3 (2%)
Enfermedad residual (n = 96)	ninguna	39 (41%)
	micro	17 (18%)
	<2 cm	17 (18%)
	>2 cm	23 (24%)
Citología (n = 95)	negativa	32 (34%)
	positiva	63 (66%)
ECOG* (n =61) (al principio de la quimioterapia de primera línea)	0	49 (80%)
	1	7 (11%)
	2	1 (2%)
	3	3 (5%)
	4	1 (2%)
Respuesta CA125 (n = 95) (al final de la quimioterapia de primera línea)	<35	82 (86%)
	>35	13 (14%)

* Estado de actuación

Tabla 11: Relación entre biomarcadores y estado de ploidía del ADN tumoral

Biomarcador	Diploide (n = 52)	Aneuploide (n = 91)	valor de p [†]
Ki67*	46 (33-63) [‡]	65 (53-74)	<0,0001

Mcm2*	69 (54-83)	86 (71-92)	<0,0001
Geminina*	9 (5-16)	16 (11-24)	<0,0001
Aurora A*	11 (5-15)	19 (12-28)	<0,0001
Aurora B*	5 (3-9)	11 (8-19)	<0,0001
H3phS10*	1,1 (0,7-1,7)	2,3 (1,6-3,6)	<0,0001
Mcm2/Ki67	1,3 (1,1-1,7)	1,3 (1,2-1,4)	0,17
Geminina/Ki67	0,23 (0,14-0,31)	0,26 (0,18-0,34)	0,05
Aurora A/Ki67	0,24 (0,15-0,33)	0,32 (0,21-0,43)	0,01
Aurora A/geminina	1,1 (0,7-1,5)	1,1 (0,8-1,6)	0,61
Aurora B/Ki67	0,12 (0,07-0,20)	0,29 (0,13-0,27)	0,001
Aurora B/geminina	0,55 (0,34-1,08)	0,81 (0,46-1,05)	0,17
H3phS10/Ki67	0,02 (0,02-0,04)	0,04 (0,03-0,06)	0,001

↑ ensayo de Mann-Whitney

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↓ mediana (intervalo intercuartil)

Tabla 12: Relación entre biomarcadores y diferenciación tumoral^Ω

Biomarcador	Grado 1 (n = 16)	Grado 2 (n = 33)	Grado 3 (n = 75)	valor de p [†]
Ki67*	44 (28-49) [↓]	54 (42-67)	67 (49-77)	<0,001
Mcm2*	60 (54-71)	77 (62-86)	87 (76-93)	<0,001
Geminina*	6 (3-13)	11 (6-16)	17 (10-25)	<0,001
Aurora A*	5 (2-11)	13 (7-21)	19 (12-30)	<0,001
Aurora B*	3 (1-6)	8 (4-15)	11 (8-19)	<0,001
H3phS10*	0,8 (0,6-1,7)	1,3 (0,9-2,2)	2,6 (1,8-3,9)	<0,001
Mcm2/Ki67	1,4 (1,3-1,7)	1,3 (1,2-1,5)	1,3 (1,1-1,4)	0,02
Geminina/Ki67	0,18 (0,13-0,25)	0,20 (0,14-0,32)	0,28 (0,20-0,35)	0,007
Aurora A/Ki67	0,14 (0,09-0,24)	0,26 (0,16-0,36)	0,33 (0,21-0,44)	0,0002
Aurora A/geminina	1,0 (0,3-1,3)	1,1 (0,6-1,6)	1,1 (0,8-1,6)	0,12
Aurora B/Ki67	0,09 (0,03-0,14)	0,16 (0,09-0,26)	0,20 (0,13-0,27)	0,001
Aurora B/geminina	0,45 (0,20-0,89)	0,64 (0,40-1,42)	0,82 (0,46-1,05)	0,20
H3phS10/Ki67	0,02 (0,01-0,04)	0,03 (0,02-0,04)	0,04 (0,03-0,07)	0,0002

5 † ensayo de Jonckheere-Terpstra

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

↓ mediana (intervalo intercuartil)

^Ω 19 (13%) de los 143 casos no pudieron incluirse en ninguno de los grados.

Tabla 13: Relación entre biomarcadores y etapa tumoral^Ω

ES 2 395 890 T3

Biomarcador	Etapas 1 (n = 48)	Etapas 2,3,4 (n = 94)	valor de p [†]
Ki67*	52 (43-69) [‡]	62 (43-72)	0,20
Mcm2*	76 (60-86)	82 (68-91)	0,11
Geminina*	12 (8-17)	16 (8-24)	0,10
Aurora A*	12 (6-20)	17 (11-27)	0,006
Aurora B*	7 (4-12)	10 (4-17)	0,06
H3phS10*	1,3 (0,8-2,2)	2,2 (1,3-3,5)	0,002
Mcm2/Ki67	1,3 (1,1-1,5)	1,3 (1,1-1,5)	0,39
Geminina/Ki67	0,24 (0,16-0,30)	0,25 (0,18-0,36)	0,24
Aurora A/Ki67	0,21 (0,15-0,33)	0,30 (0,19-0,43)	0,003
Aurora A/geminina	1,0 (0,6-1,4)	1,2 (0,8-1,6)	0,04
Aurora B/Ki67	0,14 (0,08-0,22)	0,17 (0,11-0,26)	0,13
Aurora B/geminina	0,75 (0,40-1,02)	0,68 (0,37-1,07)	0,76
H3phS10/Ki67	0,03 (0,02-0,04)	0,04 (0,02-0,06)	0,005

[†] ensayo de Mann-Whitney

* índice de marcaje (expresado como porcentaje)

[‡] mediana (intervalo intercuartil)

^Ω Un caso se excluyó del análisis porque faltaba información del estadío.

5 Tabla 14: Relación entre biomarcadores y supervivencia sin enfermedad

Biomarcador	Proporción de riesgo (CI 95%)	valor de p [†]
Ki67*	1,07 (0,95 a 1,22)	0,25
Mcm2*	1,13 (0,98 a 1,29)	0,09
Geminina*	1,17 (0,93 a 1,47)	0,19
Aurora A*	1,29 (1,06 a 1,58)	0,01
Aurora B*	1,19 (0,95 a 1,49)	0,13
H3phS10 ^Ω	1,76 (1,08 a 2,88)	0,02
Mcm2/Ki67	0,79 (0,45 a 1,41)	0,42
Geminina/Ki67 [^]	1,09 (0,90 a 1,32)	0,38
Aurora A/Ki67 [^]	1,20 (1,06 a 1,36)	0,004
Aurora A/geminina	1,23 (0,97 a 1,56)	0,09
Aurora B/Ki67 [^]	1,22 (1,03 a 1,45)	0,02

Aurora B/geminina	1,38 (0,98 a 1,96)	0,07
H3phS10/Ki67°	1,58 (0,96 a 2,57)	0,07

† ensayo de rangos logarítmicos

* Las proporciones de riesgo se refieren a un aumento absoluto del 10% en el porcentaje del biomarcador.

^ Las proporciones de riesgo se refieren a un aumento absoluto de 0,1 en la proporción.

5 ° Las variables estaban muy sesgadas y por tanto se dividieron en dos categorías en el valor de la mediana (1,99 para H3S10ph, 0,032 para H3S10ph/Ki67). Las proporciones de riesgo son para el grupo elevado comparado con el grupo bajo para cada variable.

Para otras variables, las proporciones de riesgo se refieren a un aumento de 1 unidad.

Tabla 15: Relación entre el fenotipo del ciclo celular y los parámetros clinicopatológicos

	I (fuera de ciclo)	II (en ciclo con G1 retrasada/detenida)	III (en ciclo activo)
	Mcm2 <30%	Mcm2 ≥30%	Mcm2 ≤30%
		geminina <7%	geminina ≥7%
	N = 33 (18%)	N = 44 (24%)	N = 105 (58%)
Edad-media (SD) (p = 0,13)	61,9 (12,4)	61,2 (14,1)	57,4 (13,9)
Grado (p<0,001)*			
1	27% (9/33)	23% (10/44)	5% (5/105)
2	61% (20/33)	64% (28/44)	30% (32/105)
3	12% (4/33)	14% (6/44)	65% (68/105)
Tamaño-media (SD) (p = 0,55)	24,7 (17,5)	29,1 (19,8)	28,0 (17,4)
Nódulos positivos (p = 0,23)	39% (12/31)	33% (13/40)	48% (47/98)
NPI-media (SD) (p<0,001)	3,8 (1,3)	4,0 (1,2)	4,9 (1,2)
ER casos +ve† (p = 0,08)	100% (73,9% a 100%)	100% (100% a 100%)	88,9% (0% a 100%)
PR casos +ve† (p = 0,14)	72,4% (35,8% a 100%)	92,2% (47% a 100%)	18,8% (0% a 97,8%)
Her-2			
0	66,7% (22/33)	68,2% (30/44)	53,5% (56/105)
1+	15,2% (5/33)	18% (8/44)	19% (20/105)
2+	9,1% (3/33)	4,5% (2/44)	7,6% (8/105)
3+	9,1% (3/33)	9,1% (4/44)	20% (21/105)
(p = 0,45)			

† mediana (intervalos intercuartiles)

* Asociación significativa limitada al fenotipo III.

10

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para determinar un protocolo de tratamiento para un sujeto que tiene cáncer, comprendiendo el método las etapas de:
- 5 (a) evaluar el nivel de un primer biomarcador seleccionado de al menos uno de Mcm2 a 7 en una muestra biológica del sujeto; y
- (b) evaluar el nivel de un segundo biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, y Ki67 en la muestra biológica del sujeto;
- 10 en el que la combinación del nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es indicativa del régimen de tratamiento prescrito para el sujeto;
- en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:
- 15 (i) un control; y
- (ii) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos no específicos de la fase del ciclo celular;
- en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:
- 20 (i) un control;
- (ii) un tratamiento con agentes específicos de G1 o no específicos de la fase del ciclo celular; y
- (iii) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos no específicos de la fase del ciclo celular S y G2/M; y
- en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, el protocolo de tratamiento se selecciona de uno o más de:
- 25 (i) la cirugía; y
- (ii) un tratamiento con agentes quimioterapéuticos específicos de la fase del ciclo celular S y G2/M.
- 2.- El método de la reivindicación 1, que comprende además evaluar el nivel de un tercer biomarcador que es H3S10ph en la muestra biológica de dicho sujeto.
- 30 3.- El método según la reivindicación 1, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en biopsia de tumor, tejido, sangre completa, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, frotis del cérvix, orina, lavado bronquial, esputo y cepillado del tracto alimentario.
- 4.- El método según la reivindicación 1, en el que el nivel del primer y segundo biomarcador se determina utilizando un método de ensayo inmunológico.
- 35 5.- El método según la reivindicación 4, en el que el método de ensayo inmunológico se selecciona del grupo que consiste en un análisis de la transferencia por puntos, un análisis de la transferencia por ranuras, RIA, una micromatriz peptídica, y ELISA.
- 6.- El método según la reivindicación 1, en el que el nivel del primer y segundo biomarcador se determina utilizando un método de ensayo con base biológica molecular.
- 40 7.- El método según la reivindicación 6, en el que el método de ensayo con base biológica molecular se selecciona del grupo que consiste en un análisis de la transferencia Northern, un análisis de la transferencia Southern, un análisis de la transferencia Western, RT-PCR, PCR, ensayos de amplificación basados en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA), una amplificación mediada por transcripción (TMA), o una matriz de detección por ordenador.
- 45 8.- El método según la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer endometrial, cáncer ovárico, cáncer ovárico epitelial, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de la mucosa oral, cáncer esofágico, cáncer del sistema linforreticular, cáncer de cerebro, cáncer genitourinario, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de vejiga,

cáncer del uréter, y cáncer del tracto aereodigestivo.

9.- El método según la reivindicación 1, en el que el primer y el segundo biomarcador pueden medirse de modo secuencial o al mismo tiempo.

5 10.- El método según la reivindicación 1, en el que el nivel del primer biomarcador se mide antes de medir el nivel del segundo biomarcador.

11.- Un método para determinar una prognosis del avance de un cáncer en un sujeto, comprendiendo dicho método las etapas de:

(a) evaluar el nivel de un primer biomarcador seleccionado de al menos uno de Mcm2-7 en una muestra biológica del sujeto; y

10 (b) evaluar el nivel de un segundo biomarcador seleccionado de al menos uno de geminina, Aurora A, Plk1, Ki67 y H3s10ph en la muestra biológica del sujeto;

en el que la combinación del nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es indicativa del avance del cáncer en el sujeto;

15 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad reducida del avance del cáncer;

en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es bajo, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad reducida del avance del cáncer; y

20 en el que cuando el nivel del primer biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, y el nivel del segundo biomarcador comparado con un valor predeterminado es alto, la prognosis del sujeto es indicativa de una probabilidad aumentada del avance del cáncer; y

25 en el que el valor predeterminado para el primer biomarcador es de 30% de células positivas para el primer biomarcador y el valor predeterminado para el segundo biomarcador es de 7% de células positivas para el segundo biomarcador.

12.- El método de la reivindicación 11, que comprende además evaluar el nivel de un tercer biomarcador que es H3S10ph en la muestra biológica de dicho sujeto.

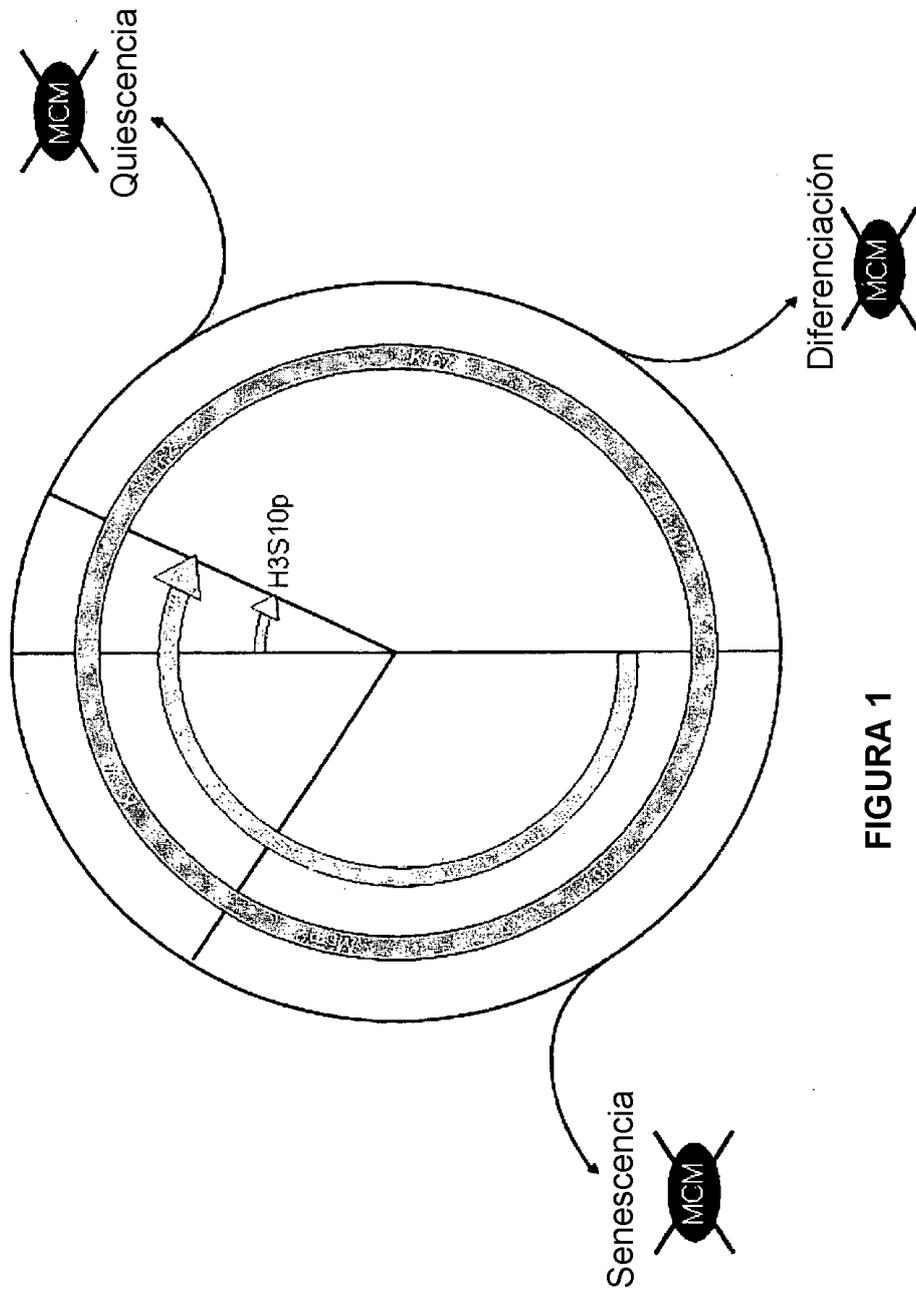


FIGURA 1

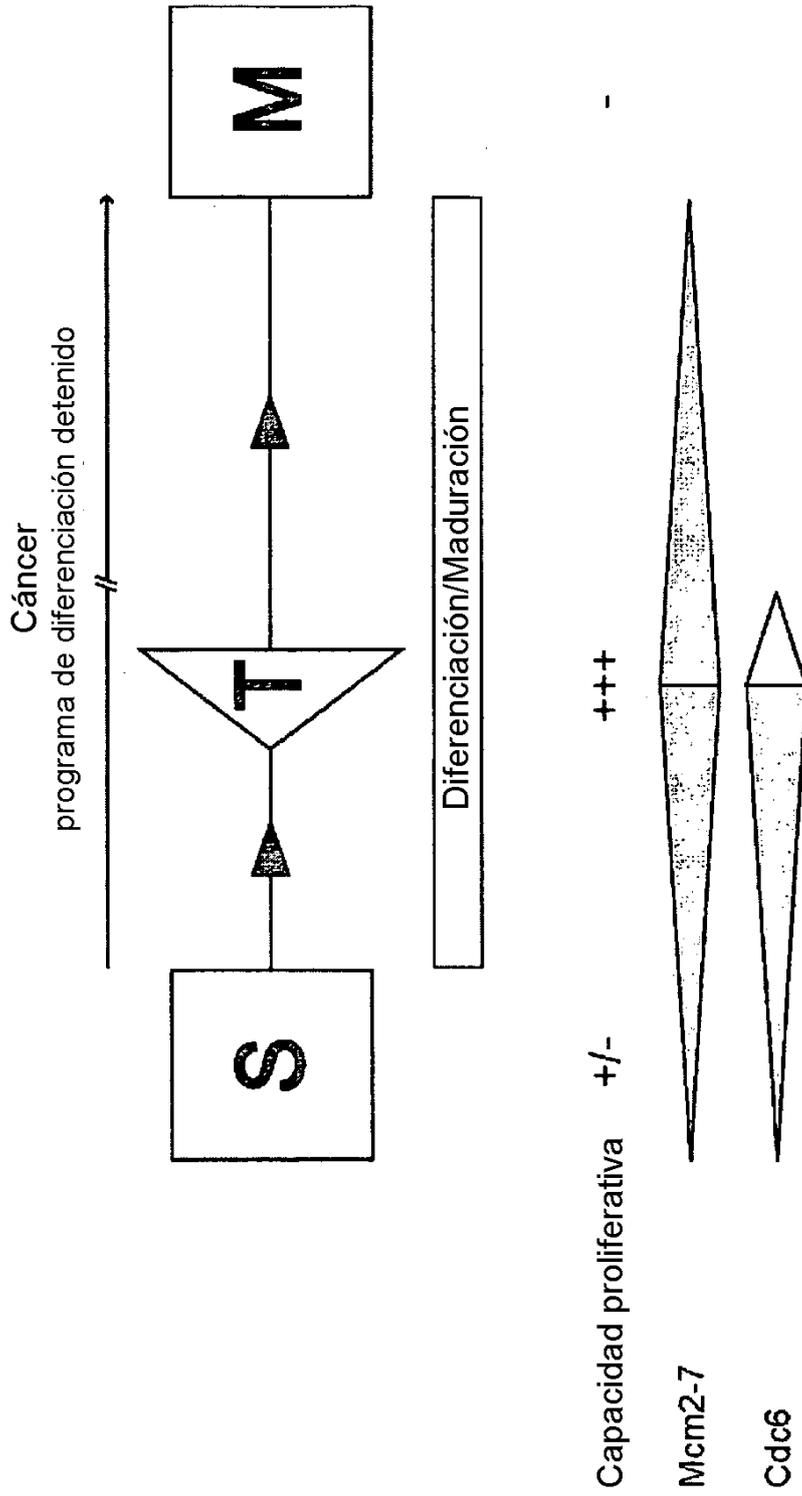


FIGURA 2

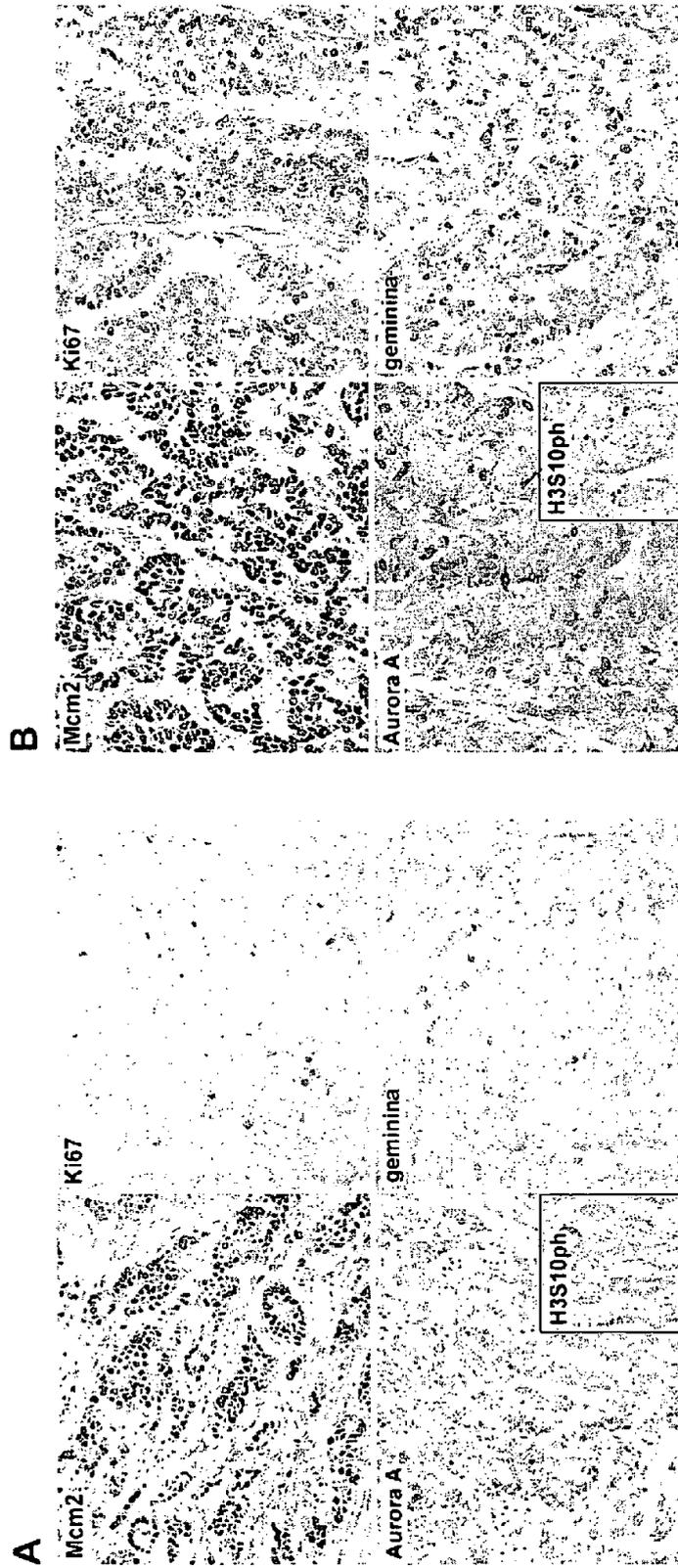


FIGURA 3

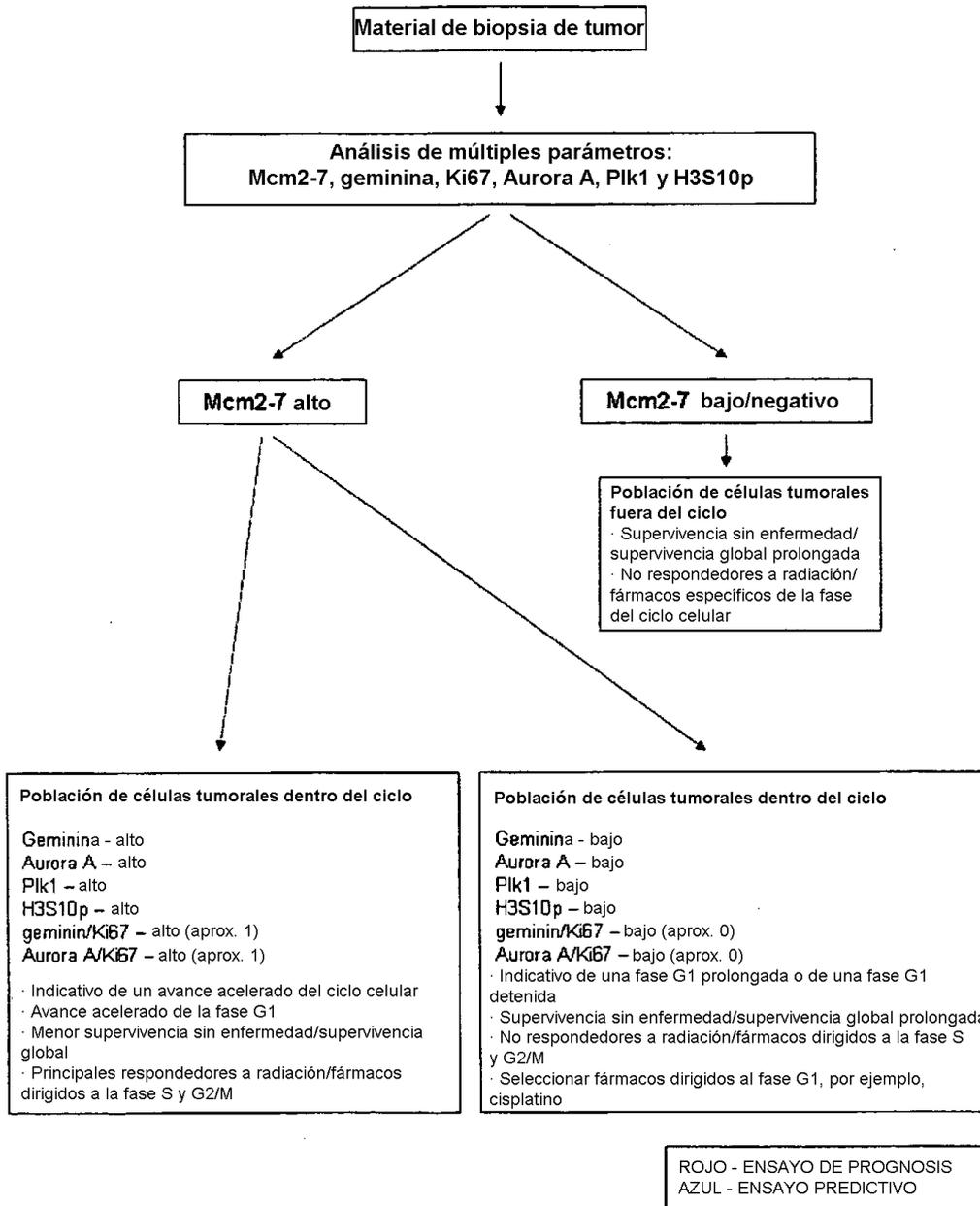


FIGURA 4

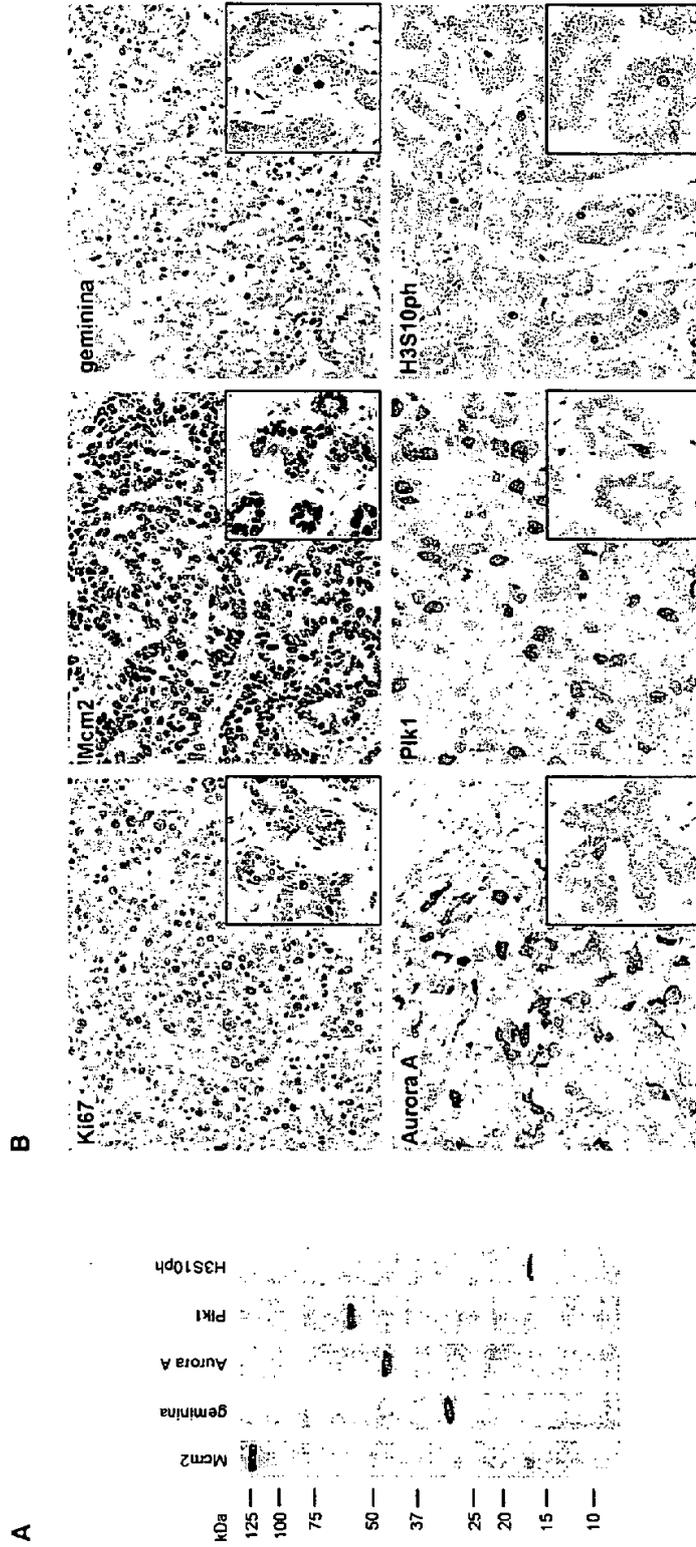


FIGURA 5

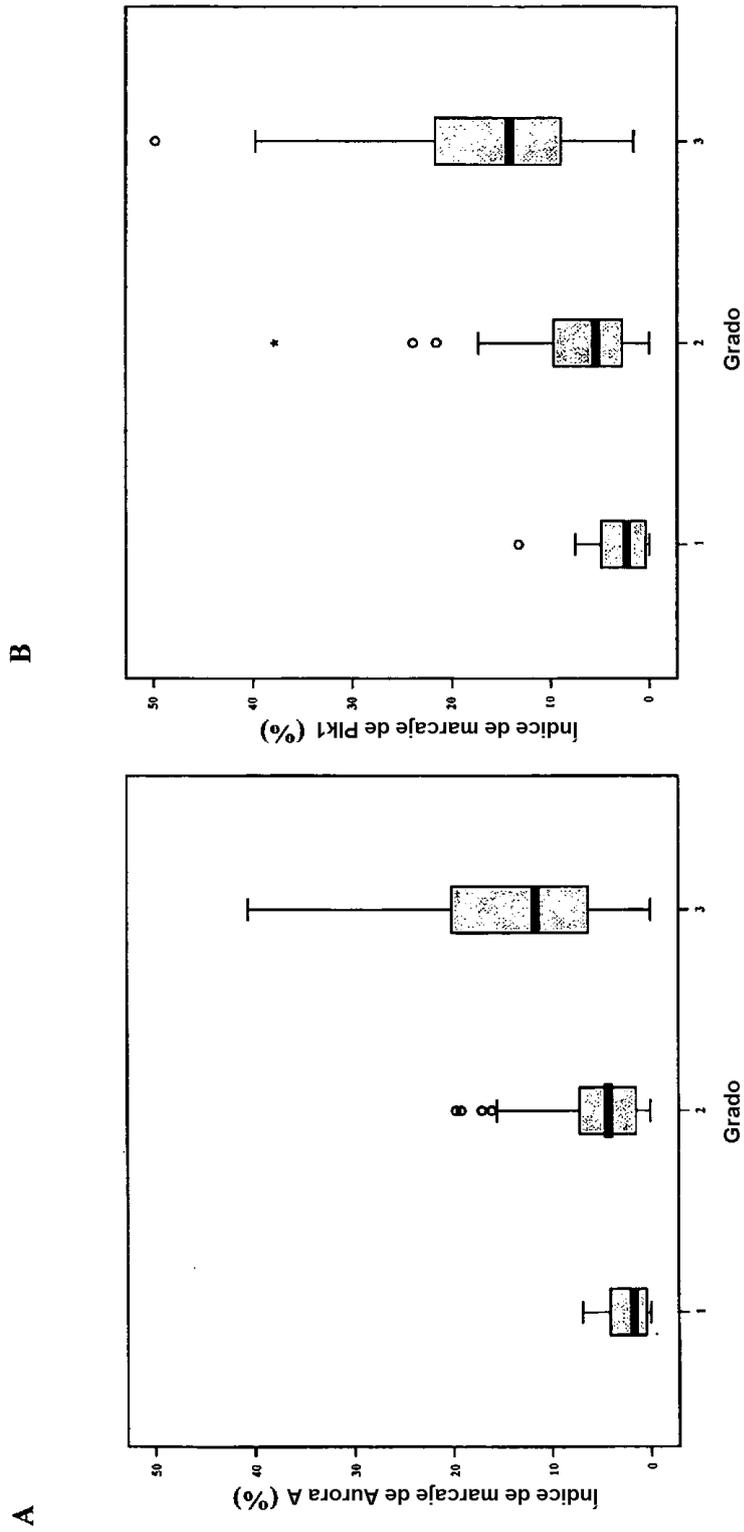


FIGURA 6

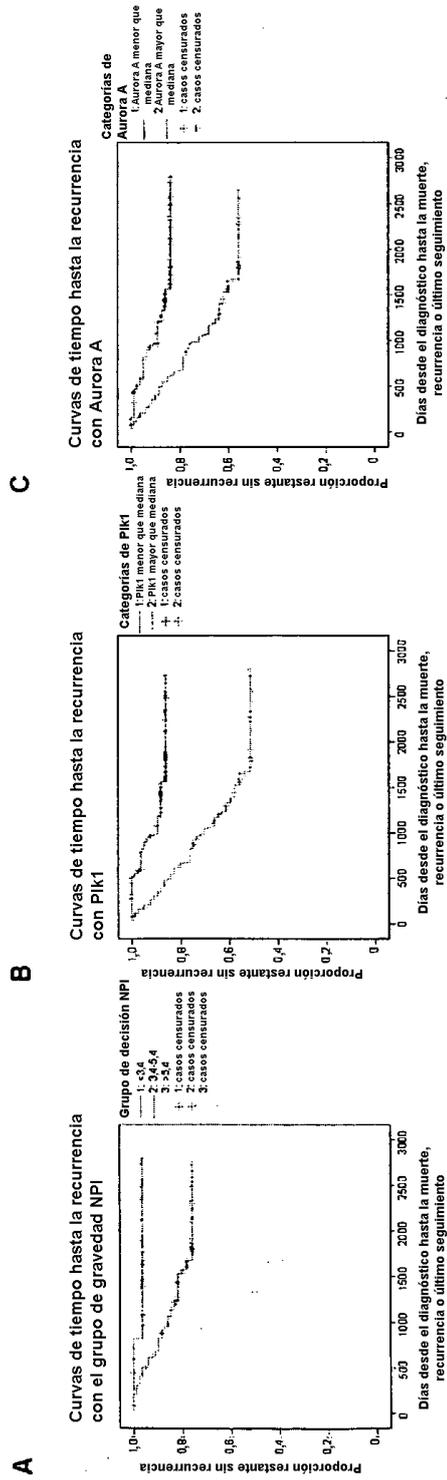


FIGURA 7

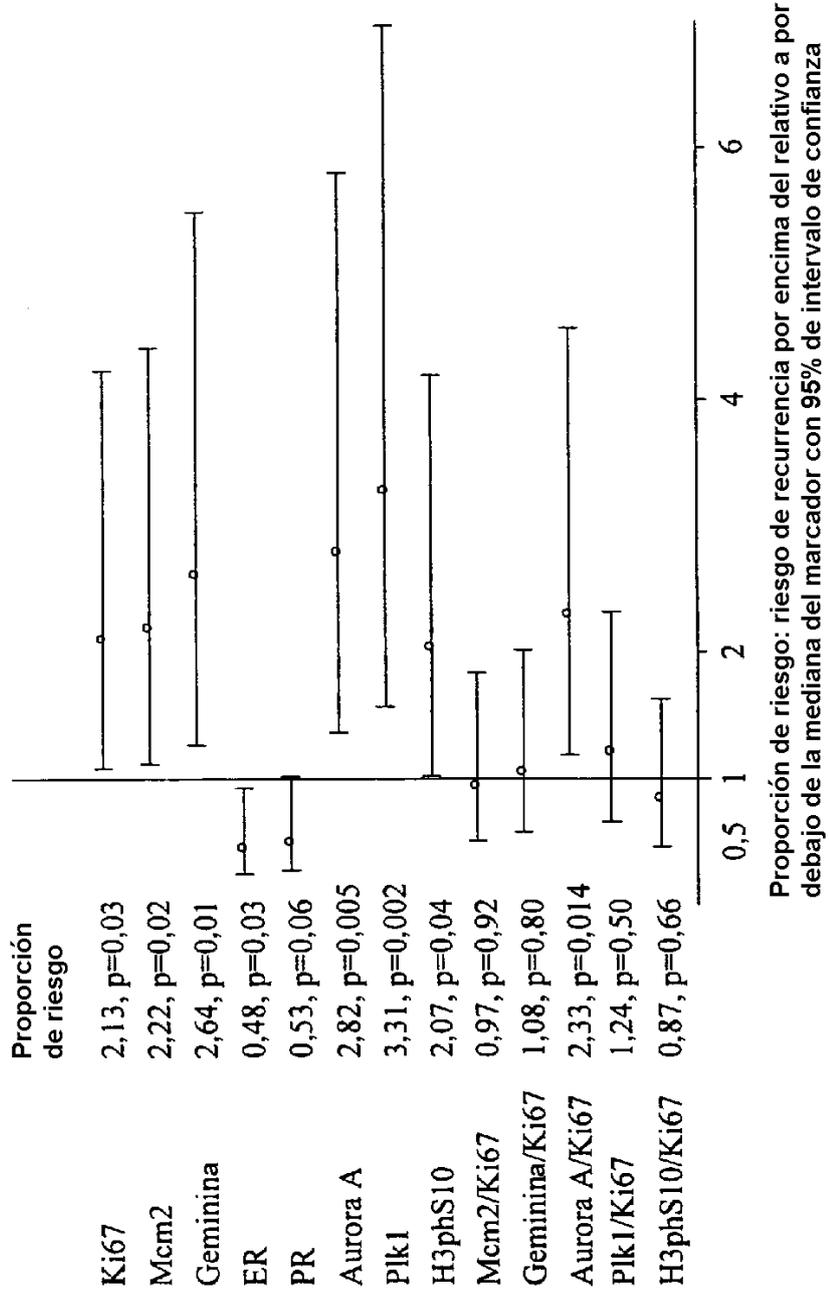


FIGURA 8

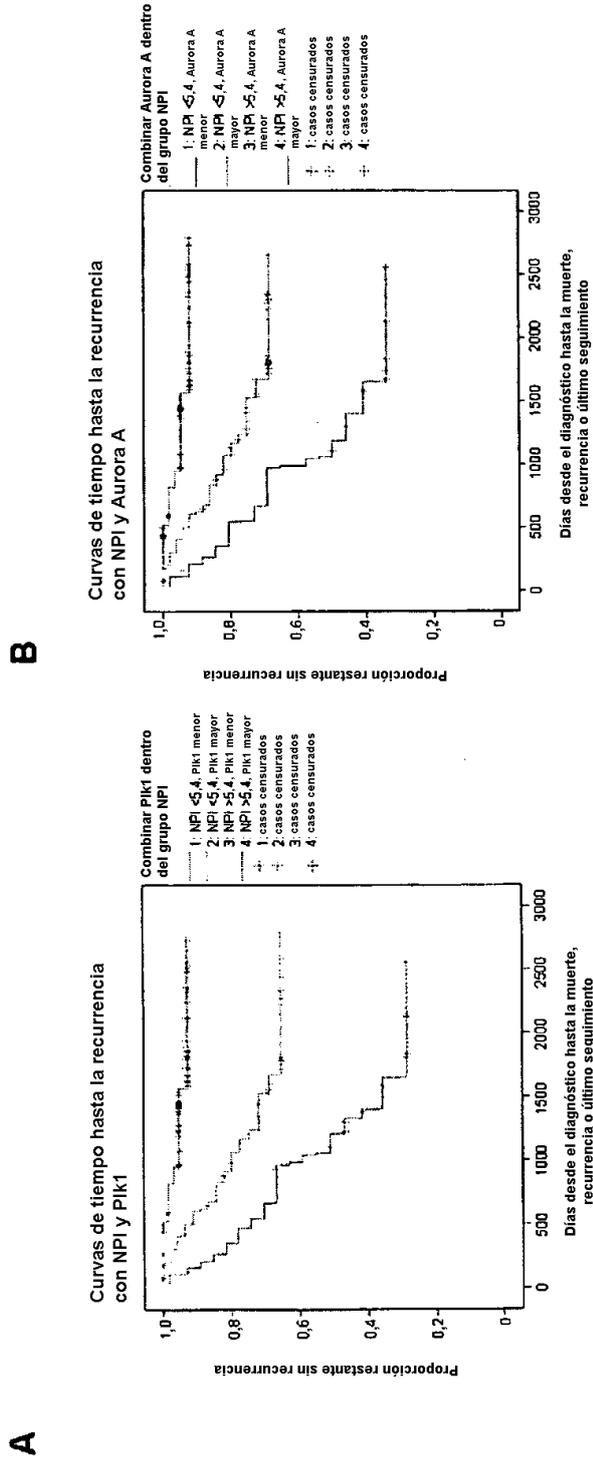


FIGURA 9

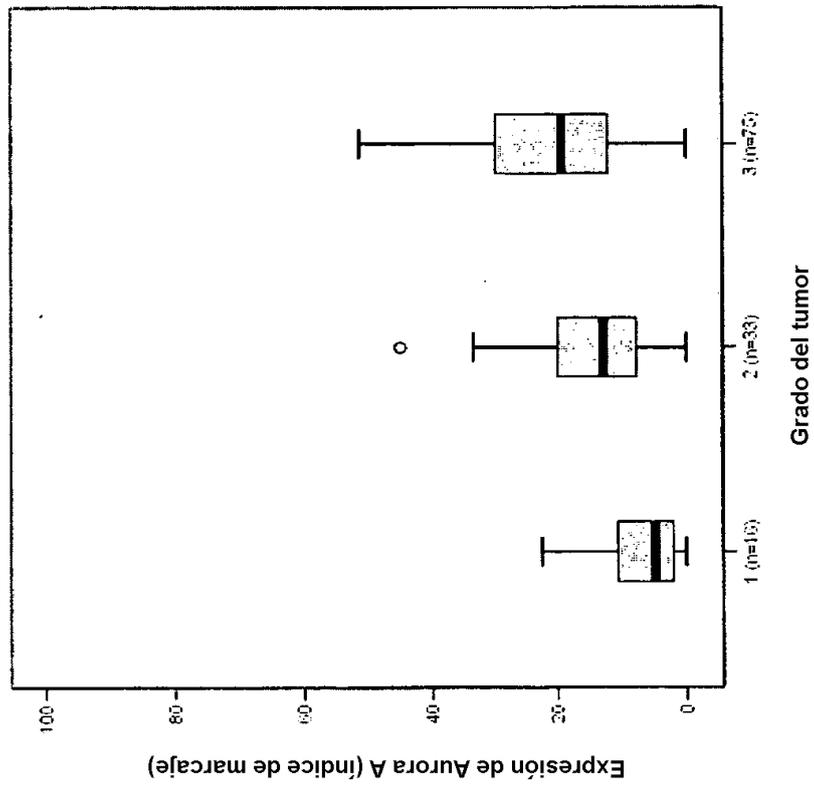


FIGURA 11

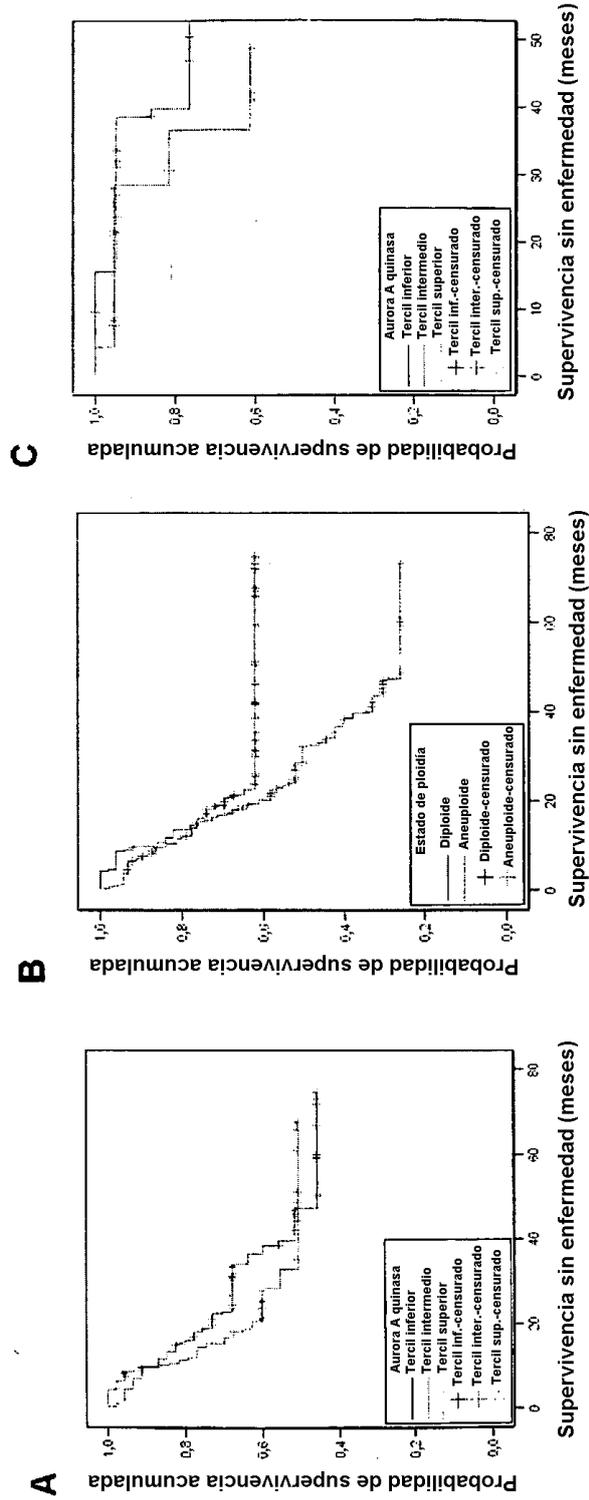


FIGURA 12

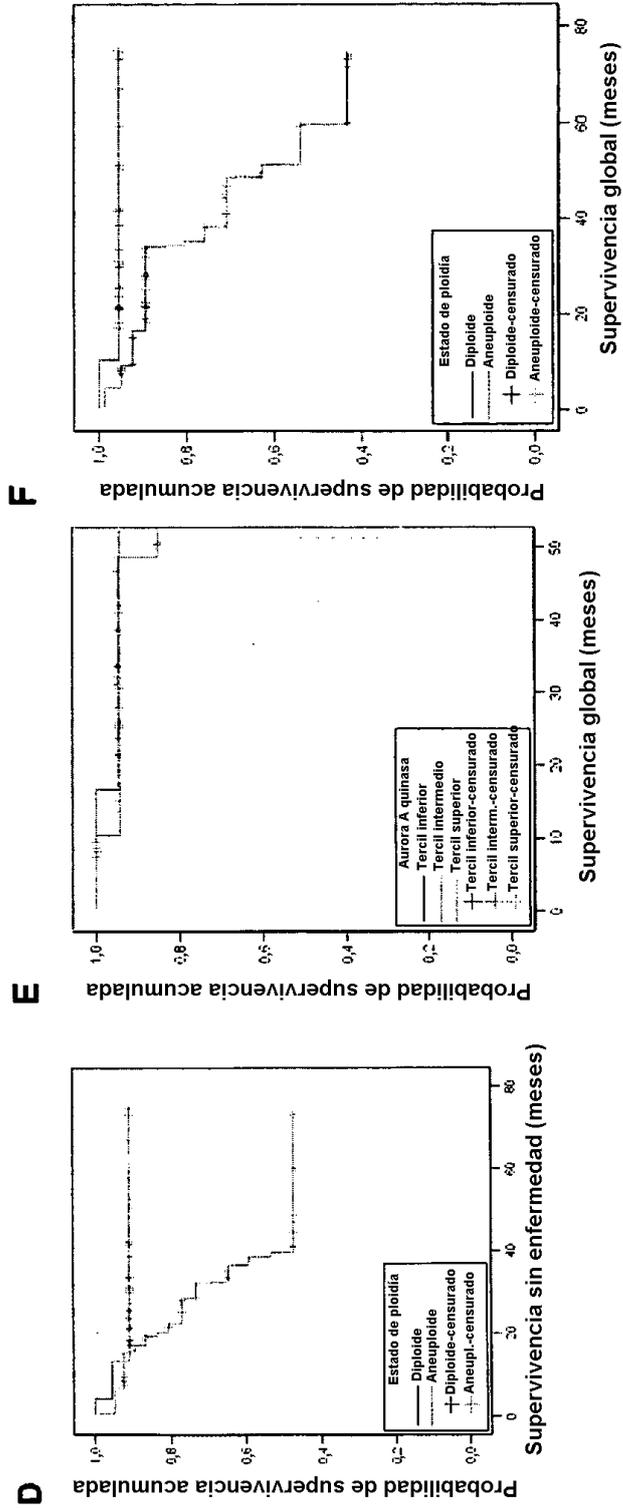


FIGURA 12 (continuación)

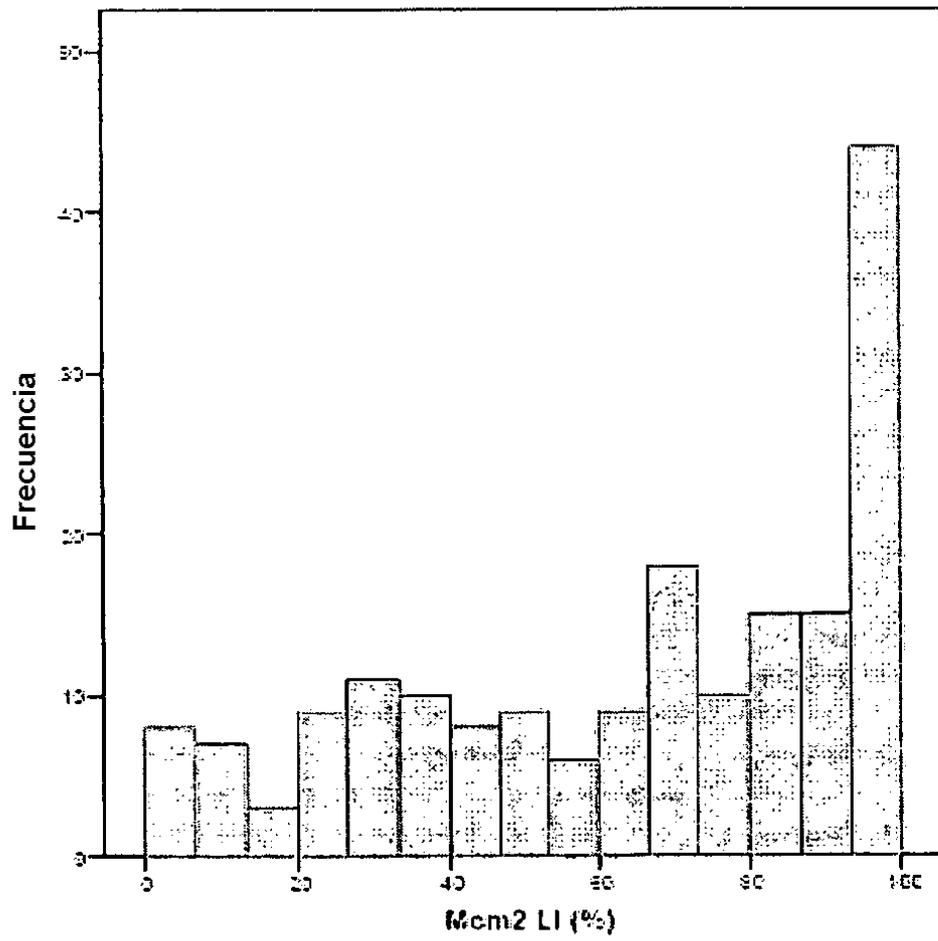


FIGURA 13

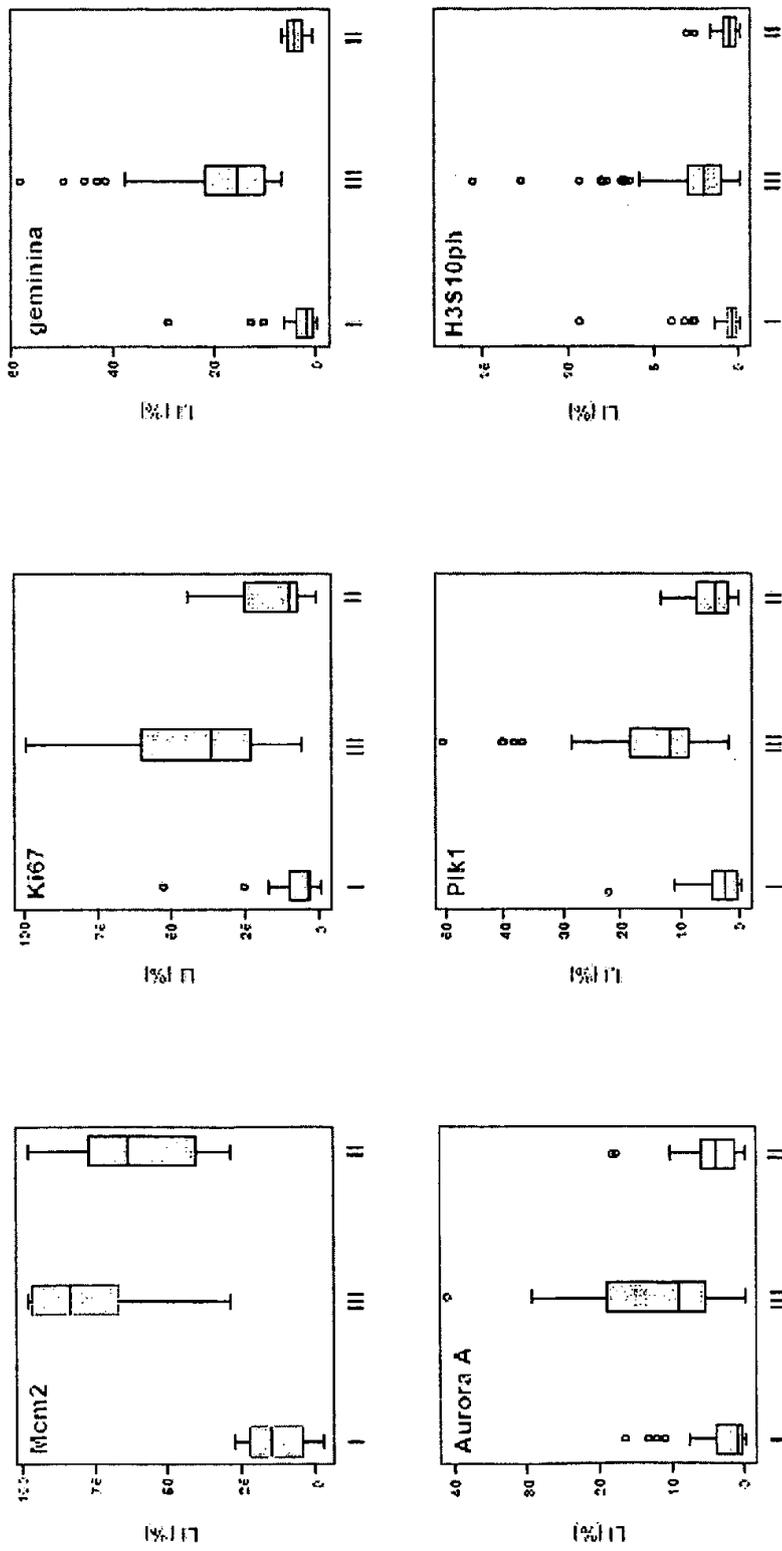


FIGURA 14

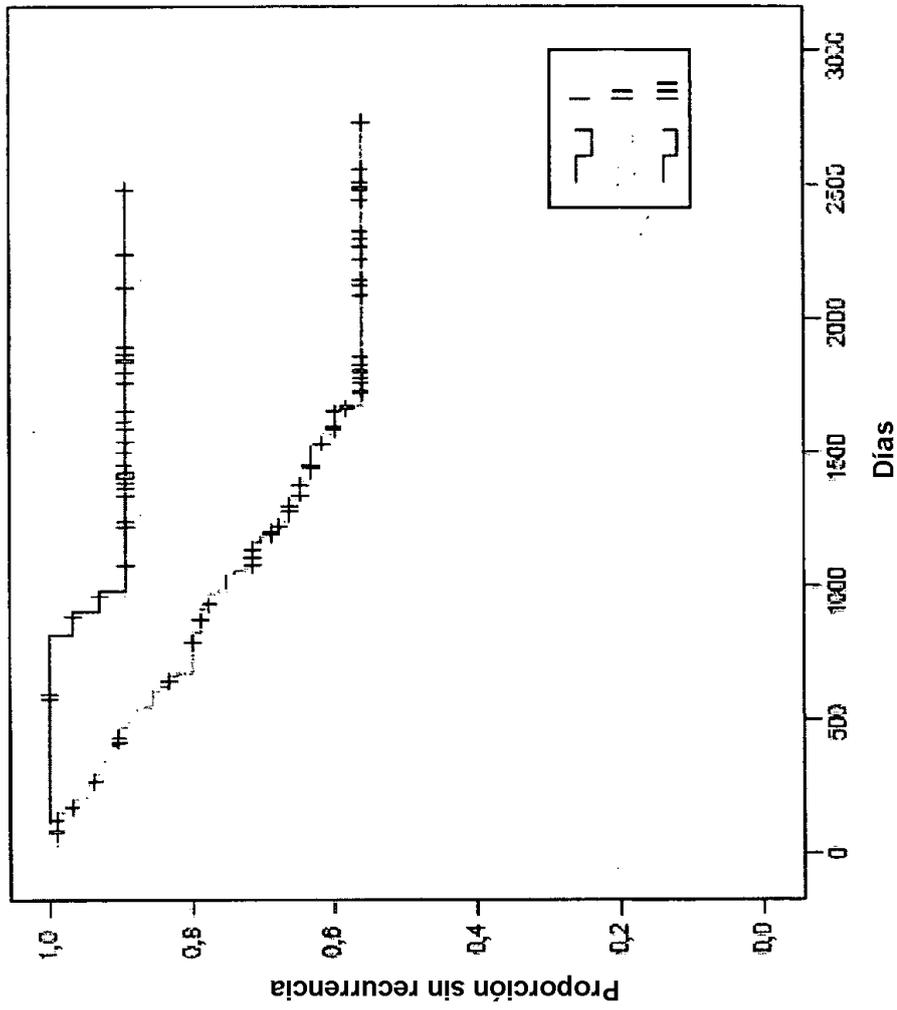


FIGURA 15

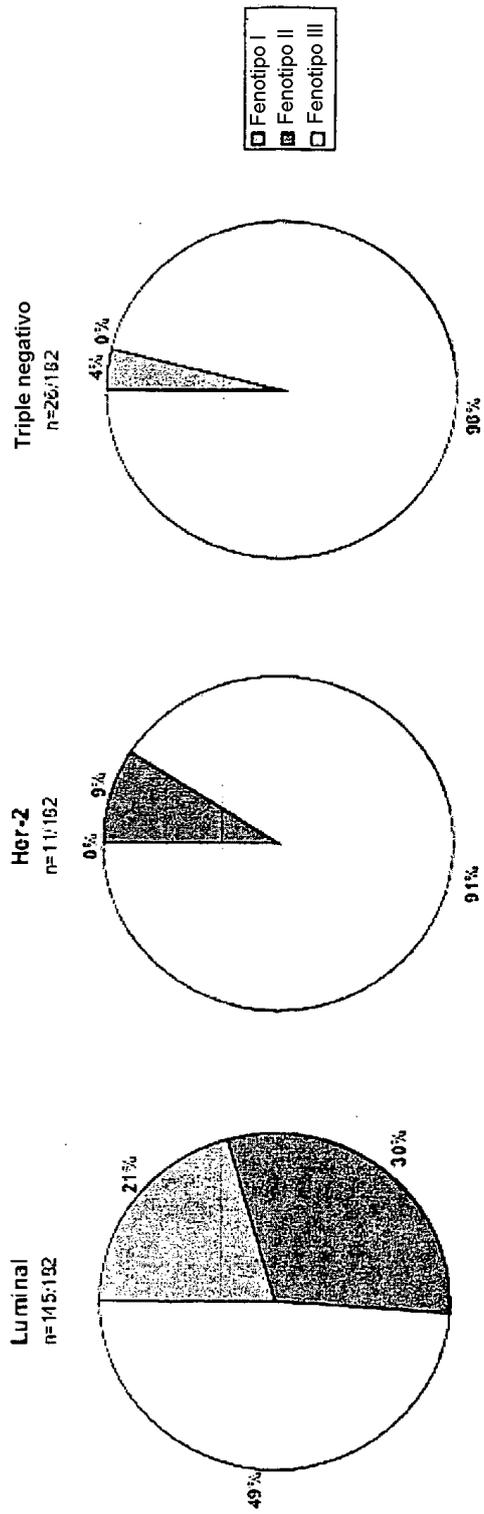


FIGURA 16