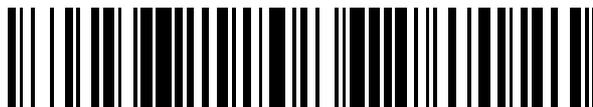


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 485 615**

21 Número de solicitud: 201330179

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**12.02.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**13.08.2014**

71 Solicitantes:

**ONCOMATRIX BIOPHARMA, S.L. (100.0%)**  
**Parque Tecnológico de Bizkaia. Edificio 801-B, 2ª**  
**planta**  
**48160 Derio (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**FREIRE SALINAS, Francisco Javier;**  
**GÓMEZ ROMÁN, Javier;**  
**DOMÍNGUEZ HORMAETXE, Saioa y**  
**SIMÓN BUELA, Laureano**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Métodos y productos para pronosticar la evolución clínica o predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama**

57 Resumen:

Métodos y productos para pronosticar la evolución clínica o predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama.

La presente invención se refiere a métodos y productos in vitro para pronosticar la evolución clínica o predecir el riesgo y tipo de recidiva de una lesión papilar de mama, en base a expresión de la proteína proCOL11A1, con el objetivo de determinar el tratamiento y patrón de seguimiento más adecuado para cada paciente.

**ES 2 485 615 A1**

## DESCRIPCIÓN

### MÉTODOS Y PRODUCTOS PARA PRONOSTICAR LA EVOLUCIÓN CLÍNICA O PREDECIR EL RIESGO DE RECIDIVA DE UNA LESIÓN PAPILAR DE MAMA

5

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a métodos y productos *in vitro* para pronosticar la evolución clínica o predecir el riesgo y tipo de recidiva de una lesión papilar de mama, útiles como herramienta para seleccionar el tratamiento y seguimiento más adecuados a cada paciente.

10

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a escala mundial. Según la base de datos GLOBOCAN, de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, más de 10 millones de casos de cáncer se diagnosticaron en todo el mundo durante el año 2000, y el número de muertes debidas al cáncer el año 2.000 fue superior a 6 millones de personas.

20

Las células tumorales durante el proceso de malignización cambian su patrón de expresión génica, lo que altera procesos celulares, tales como el mantenimiento de la arquitectura celular, la adhesión, la muerte y la proliferación celular. Estas modificaciones no sólo generan cambios en las propias células, sino que hacen que algunas células del estroma reciban señales moleculares alteradas y cambien su pauta de comportamiento y su patrón de expresión génica, adquiriendo una morfología típica de miofibroblastos. Las moléculas secretadas por estos miofibroblastos en respuesta al tumor adyacente pueden a su vez contribuir de diferente manera a promover el crecimiento e invasión tumoral, de manera que se establece un bucle paracrino entre tumor y estroma. En los últimos años, se han generado evidencias científicas que apuntan cada vez con mayor precisión hacia el estroma peritumoral, como uno de los principales promotores de la invasividad tumoral, así como de fenómenos de resistencia a terapia.

30

Los métodos y productos para diagnóstico que los autores de la presente invención reivindican, se enmarcan en este novedoso marco de investigación, ya que se basan en la explotación del gen col11a1 y de la proteína proCOL11A1, presente en células del

35

estroma de carcinomas invasivos, como potencial marcador para la clasificación de papilomas intraductales de mama según su tendencia a progresar a un tumor maligno.

5 El cáncer de mama es la neoplasia con mayor tasa de incidencia y mortalidad entre las mujeres, de ahí que su diagnóstico precoz y tratamiento sean de vital importancia. En los últimos años, con la introducción de la genética en la medicina (en especial en la oncología médica), se han realizado diversos descubrimientos que influyen en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama, que han llevado a reclasificar esta patología en cuanto a su perfil genético; los descubrimientos más significativos han sido  
10 acerca del componente epitelial de estos tumores, fundamentalmente los factores de crecimiento epidérmico (EGFR y Her-2), que se han convertido en dianas terapéuticas al igual que los receptores de estrógenos y progesterona (Perou C., Sorlie T., Eisen M., 2000, Nature, 406:747-752; Nielsen T., Hsu F., Jensen K., 2004, Clin. Cancer Res, 10:5367-5374). Además, se han desarrollado una serie de marcadores inmuno-  
15 histoquímicos, de gran utilidad para diferenciar entre lesiones benignas y malignas en los casos en que las técnicas histoquímicas convencionales son insuficientes. En la mama existen lesiones benignas esclerosantes, principalmente la adenosis esclerosante y la cicatriz radial que, en ocasiones (debido a su patrón morfológico), plantean dificultad en el diagnóstico diferencial con lesiones malignas infiltrantes (tales como el carcinoma  
20 tubular y carcinoma ductal infiltrante); esta situación es aún más compleja en biopsia con aguja gruesa, ya que al no existir una representación total de la lesión no se pueden apreciar los contornos de la misma, lo cual es una de las claves para el diagnóstico diferencial, especialmente cuando con las tinciones habituales no se pueden reconocer las células basales mioepiteliales presentes en las lesiones benignas y ausentes en las  
25 lesiones malignas infiltrantes.

Existen marcadores inmunohistoquímicos (como la p63, la  $\alpha$ -actina, la miosina de cadenas pesadas para músculo liso, la calponina, la proteína s100, o el CD10) que tiñen las células mioepiteliales de los conductos mamarios, ayudando a diferenciar entre este  
30 tipo de lesiones. Dentro de estos marcadores, la  $\alpha$ -actina, la miosina de cadenas pesadas para el músculo liso y la calponina, presentan una alta sensibilidad (89%) para las células basales mioepiteliales; sin embargo, no son específicas de éstas, tiñendo igualmente a las células musculares lisas vasculares y a los miofibroblastos estromales; problemas semejantes se plantean con s100 y CD10 (Lerwill, M.F., 2004, Am J Surg Path, 28:1076-  
35 1091). Werling y colaboradores (Werling, R. W., Hwang, H., Yaziji, H., 2003, Am J Surg Path, 27:82-90) estudiaron una serie de casos correspondientes a adenosis esclerosante,

carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar y carcinoma ductal *in situ*, analizando el patrón de reactividad de los anticuerpos p63, miosina de músculo liso y calponina, demostrando que todos ellos tiñeron las células mioepiteliales de los casos benignos y malignos no infiltrantes, corroborando a su vez la positividad de miosina y calponina en

5 miofibroblastos y células musculares lisas vasculares. En ese trabajo, p63 fue el marcador que menor reactividad cruzada presentó con los fibroblastos estromales, sin teñir ninguno de ellos, lo cual reveló su alta sensibilidad y especificidad para teñir células mioepiteliales en comparación con el resto de anticuerpos estudiados; no obstante, presentó algunas desventajas como la tinción en ocasiones discontinua de las células

10 mioepiteliales (en particular en los carcinomas *in situ*) e, igualmente, la positividad focal hasta en un 11% de los casos de las células tumorales. Meryem y colaboradores describieron, por otra parte, la positividad con p63 de 13 casos de carcinoma mamario metaplásico de un total de 14 casos (Meryem, Koker, M., Kleer, C.G., 2004, Am J Surg Path, 28:1506-1512). Actualmente p63 es uno de los marcadores más usados para el

15 diagnóstico diferencial entre lesiones benignas esclerosantes y malignas infiltrantes de la mama; sin embargo, hasta la fecha no existe ningún marcador estromal que ayude a diferenciar entre estas lesiones (Mattia Barbareschi, M., Pecciarini L., Cangi G., 2001, Am J Surg Path, 25:1054-1060).

20 Dentro de las lesiones de mama, las de arquitectura papilar (papiloma intraductal, papilomatosis, papiloma atípico y carcinoma papilar intraductal) son las que generan una mayor dificultad en su diagnóstico (Collins, L.C. and S.J. Schnitt, Histopathology, 2008. 52(1):20-9). Debido a su similitud, el diagnóstico certero de estas lesiones mediante morfología únicamente se puede complicar, por lo que el anatomopatólogo recurre a

25 marcadores diferenciales. El principal indicador de la invasividad de una lesión papilar es la presencia o ausencia de células mioepiteliales (Ueng, S.H., et al. Arch Pathol Lab Med, 2009. 133(6):893-907) que se pueden poner de manifiesto mediante tinción inmunohistoquímica de los marcadores comentados en el párrafo anterior (Mulligan, A.M. and F.P. O'Malley, Adv Anat Pathol, 2007. 14(2):108-19). También se han utilizado

30 los receptores de estrógenos (Mulligan & O'Malley citado *supra*) o distintas citoqueratinas tales como CK5/6 y CK8 (Moumen, M., et al. Int J Dev Biol, 2011. 55(7-9):763-71). Sin embargo, aunque estas técnicas ayudan en el diagnóstico no hay un consenso claro que determine la sensibilidad y precisión de estos marcadores (Ueng, S.H., et al. Arch Pathol Lab Med, 2009. 133(6):893-907; Shouhed, D., et al. Am Surg, 2012. 78(10):1161-5).

De todas las lesiones papilares de la mama, el papiloma intraductal es la patología que más discrepancias genera, en cuanto al diagnóstico y el tratamiento (Mulligan & O'Malley citado *supra*). Este desacuerdo se debe principalmente a que, aunque el papiloma intraductal es *per se* una lesión benigna, la asociación entre el papiloma intraductal y la

5 recidiva en forma de patologías malignas es bastante alta, llegando hasta el 33% si la lesión inicial posee atipias (Ueng, S.H., et al. Arch Pathol Lab Med, 2009. 133(6):893-907; Ahmadiyah, N. et al., Ann Surg Oncol, 2009,16(8):2264-9; Valdes, E.K., et al. Ann Surg Oncol, 2006. 13(4):480-2; Rosen, Papilloma and related benign tumors, in Rosen's breast pathology, R. PP, Editor. 2009, Williams & Wilkins: Philadelphia. pp. 85-136).

10

De hecho, existe gran controversia en la forma de actuar cuando se diagnostica un nuevo caso, al existir grupos que abogan por una extirpación completa de la lesión en todos los casos (Rizzo, M., et al., Ann Surg Oncol, 2008. 15(4):1040-7) o sólo en los casos en los que se presenten atipias o papilomas múltiples (Agoff, S.N. and T.J. Lawton, Am J Clin

15 Pathol, 2004. 122(3):440-3.; Rosen, E.L., et al., AJR Am J Roentgenol, 2002. 179(5):1185-92).

20

Un correcto diagnóstico entre los papilomas de comportamiento presumiblemente maligno y los benignos es esencial (Mulligan & O'Malley citado *supra*; Choi, Y.D., et al., Acta Cytol, 2006. 50(1):35-40; Gomez-Aracil, V., et al., Cytopathology, 2002. 13(1):22-30) no sólo por el bien del paciente, ya que se evitarían intervenciones innecesarias, sino por su repercusión económica. Marcadores como el CD44 (Tse, G.M., et al., J Clin Pathol, 2005. 58(11):1185-8) o la ciclina D1 (Saddik, M., et al., Arch Pathol Lab Med, 1999. 123(2):152-6) se han propuesto como genes diferencialmente expresados entre las

25 distintas lesiones papilares malignas y benignas, pero no existe una correlación con la recidiva maligna de los papilomas intraductales. También se han propuesto en algunas publicaciones alteraciones genéticas en los papilomas intraductales que son capaces de predecir una mayor susceptibilidad para la recidiva maligna, como puede ser la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 16 (Yoshida, M., et al., Virchows Arch, 2012. 460(5):497-504). Sin embargo, debido a problemas intrínsecos a la propia técnica, la

30 ausencia de LOH no implica un diagnóstico benigno.

35

Sigue existiendo, por tanto, la necesidad de desarrollar métodos y productos para predecir las recidivas de las lesiones papilares de mama, en particular, las recidivas del papiloma intraductal de mama, bien en papilomas benignos o, ventajosamente, en recidivas con progresión maligna a carcinomas. Dichos métodos y productos serían

herramientas útiles para pronosticar la evolución clínica y/o para predecir el riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama así como para seleccionar el tratamiento y seguimiento más adecuados a cada paciente (sujeto diagnosticado de lesión papilar de mama) y/o para seleccionar un paciente (sujeto diagnosticado de lesión papilar de mama) para un tratamiento determinado. Adicionalmente, dichos métodos y productos podrían ser utilizados para clasificar las lesiones papilares de mama, en concreto, los papilomas intraductales de mama, según su riesgo de recidiva y malignización.

El colágeno es el principal componente de la matriz extracelular (ECM). La correcta expresión de los genes que codifican para los distintos tipos de colágeno es necesaria para el correcto ensamblaje de la ECM durante el desarrollo embrionario y para su mantenimiento en el organismo adulto. El Colágeno XI (COL11) es un tipo de colágeno poco estudiado, pero juega un papel fundamental en la regulación de los entramados fibrilares en matrices cartilaginosas y no cartilaginosas (Li, Y., et al., *Cell*, 1995, 80:423-430); estos entramados de fibras están implicados en distintos procesos de morfogénesis durante el desarrollo embrionario en animales vertebrados. Se han encontrado transcritos de la cadena alpha 1 del Colágeno XI (COL11A1) durante el desarrollo fetal en tejidos cartilaginosos y también en otros tejidos como hueso, riñón, piel, músculo, lengua, intestino, hígado, oído, cerebro y pulmón (Sandberg, J.M., et al., *Biochem. J.*, 1993, 294:595-602; Yoshioka, H., et al., *Dev. Dyn.*, 1995, 204:41-47). La matriz extracelular tiene también un papel importante en determinados procesos biológicos, como la diferenciación, proliferación y migración celular; por tanto, la desregulación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas que la componen, está asociada a procesos de carcinogénesis y metástasis (Boudreau, N., and Bissell, M.J., *Curr. Opin. Cell Biol.*, 1998, 10:640-646; Stracke, M.L., et al., *In vivo*, 1994, 8:49-58). En el caso particular de COL11A1, se ha demostrado que los fibroblastos del estroma presentan niveles elevados de expresión del gen col11a1 en carcinomas colorrectales esporádicos, mientras que este gen no se expresa en colon sano (Fischer, H., et al., *Carcinogenesis*, 2001, 22:875-878). Se ha asociado también la expresión del gen col11a1 a cáncer de páncreas, mama, colon, pulmón, cabeza y cuello (Kim, H. et al., *BMC Medical Genomics*, 2010, 3:51; Iacobuzio-Donahue, C., *Am. J. Pathology*, 2002, 160(4):1239-1249; Ellsworth, R.E., et al., *Clin. Exp. Metastasis*, 2009, 26: 205–13; Feng, Y., et al., *Breast Cancer Res. Treat.*, 2007, 103(3):319-329; *J.Gast.Liv.dis.*, 2008; Fischer, H., et al., *BMC Cancer*, 2001, 1:17-18; Fischer, H., et al., *Carcinogenesis*, 2001, 22:875-878; Suceveanu, A.I., et al., *J. Gastrointestin. Liver Dis*, 2009, 18(1):33-38; Chong, IW, et al., *Oncol Rep*, 2006, 16(5):981-988; Whan, K., *Oncogene*, 2002, 21:7598-7604; Schmalbach., C.E., et al.,

Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 2004, 130(3):295-302) y vejiga (WO 2005/011619) y la expresión de la proteína COL11A1 a cáncer de páncreas y de colon (Pilarsky, C., et al., J. Cel. Mol. Med., 2008, 12(6B):2823-35; Erkan, M., et al., Mol. Cancer, 2010, 9:88-103; Bowen, K.B., et al., J. Hist. Cyt., 2008, 56(3):275-283).

5

Recientemente se ha descrito el empleo de la proteína proCOL11A1 como marcador diferencial entre carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y patologías benignas de cabeza y cuello (García-Ocaña et al., Póster “Immunohistochemical validation of procollagen COL11A1 as a desmoplastic tumor stroma marker”, 18 de noviembre de 2010, III Simposio Internacional del IUOPA, Oviedo); como marcador diferencial entre adenocarcinoma ductal infiltrante de mama y adenosis esclerosante (García Pravia et al., Abstract ESSR2009/218, “Anti-proCOL11A1, a new marker of infiltrating breast cancer”, British J. Surgery, 2009, 96 (S5):11; García-Ocaña et al., Póster “Immunohistochemical validation of procollagen COL11A1 as a desmoplastic tumor stroma marker”, 18 de noviembre de 2010, citado *supra*); y como marcador diferencial entre adenocarcinoma ductal pancreático y pancreatitis crónica (García Pravia et al., Abstract ESSR2009/272, “ProCOL11A1 is an efficient marker of pancreatic cancer” ” Bristish J. Surgery, 2009, 96 (S5):17; García-Ocaña et al., Póster “Immunohistochemical validation of procollagen COL11A1 as a desmoplastic tumor stroma marker”, 18 de noviembre de 2010, citado *supra*)).

20

Recientemente se ha desarrollado un anticuerpo monoclonal dirigido específicamente frente a la proteína proCOL11A1, válido para la detección de dicha proteína mediante inmunohistoquímica, identificado como 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54).

25

### COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto, mediante análisis inmunohistoquímico de papilomas intraductales de mama empleando el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54, que la proteína proCOL11A1 se expresa en papilomas intraductales de mama que tienen capacidad de mostrar un comportamiento agresivo, y no se expresa en los papilomas intraductales de mama que muestran un comportamiento benigno.

35

Esta evidencia convierte a dicho anticuerpo específico de proCOL11A1 en un anticuerpo idóneo para el desarrollo de nuevos métodos y productos *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de lesiones papilares de mama, más particularmente, para pronosticar la evolución clínica y predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, tal como un papiloma intraductal de mama, en los que basar la decisión terapéutica para cada paciente diagnosticado de una lesión papilar de mama. En concreto, la invención proporciona unos métodos y productos para identificar *in vitro*, con alta sensibilidad y especificidad, aquellas lesiones papilares de mama, en particular aquellos papilomas intraductales de mama, con riesgo de progresión hacia lesiones potencialmente agresivas, y que son susceptibles de ser resecados de manera completa en el momento del diagnóstico y sometidos a un seguimiento posterior más exhaustivo, y distinguirlos de las lesiones papilares de mama benignas, en particular, papilomas intraductales de mama benignas, que no precisan una conducta terapéutica agresiva.

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la evolución clínica y/o predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, seleccionado entre el Método (A) y el Método (B), en donde

A) el Método (A) comprende

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1;

en donde

- la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o
- la no detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo, y

B) el Método (B) comprende

- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

5

en donde

- un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o

10

- un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo.

15

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama para un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva, que comprende

20

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, la presencia de la proteína proCOL11A1; o
- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

25

30

en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento:

- si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o

35

- si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama para un tratamiento seleccionado entre un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora y un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama, que comprende

10

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o
- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

15

en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento:

20

- si no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o
- si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

25

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, que comprende

30

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o
- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

35

en donde dicho tratamiento se selecciona entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos,

5 en donde se selecciona dicho tratamiento:

- si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o

10 - si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la proteína proCOL11A1 como marcador para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

20 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1 como marcador para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende un reactivo que reconoce la proteína proCOL11A1, o un reactivo para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen col11a1, para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La Figura 1 muestra los resultados de la inmunotinción para proCOL11A1 en una muestra de papiloma intraductal de mama negativo (A) que no presentó recidiva y en una muestra de papiloma intraductal de mama positivo (B) que presentó recidiva en forma de carcinoma ductal de mama infiltrante. Información adicional puede encontrarse en el Ejemplo 1.

La Figura 2 es un diagrama de barras que muestra el número de casos clasificados según su inmunomarcaje para proCOL11A1. Información adicional puede encontrarse en el Ejemplo 1.

10

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

### Definiciones

15 Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones tal y como se utilizan dentro del contexto de la presente invención.

El término “anticuerpo” se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina “antígeno”. El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio o “determinante” antigénico.

25

El término “cáncer” o “carcinoma” se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.

30

El término “cáncer de mama” o “adenocarcinoma de mama” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células de la mama.

El término “epítipo”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

35

El término “especificidad” se refiere a la capacidad de detectar los verdaderos negativos. Una especificidad del 100% significa que no hay falsos positivos (sujetos no afectados que obtienen resultado positivo).

5

El término “evolución clínica”, se refiere, en general, a la progresión del cuadro clínico del paciente a los largo del proceso asistencial de su enfermedad, y, específicamente, en el sentido utilizado en esta descripción, aplicado a una lesión papilar de mama incluye la valoración de la progresión o recidiva de dicha lesión papilar de mama hacia una lesión maligna, un carcinoma de mama, o benigna, así como del efecto del tratamiento, o ausencia de tratamiento, aplicado a un sujeto que padece una lesión papilar de mama.

10

El término “gen” se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos que codifica una proteína.

15

El término “gen col11a1” se refiere al gen que codifica un componente del colágeno XI denominado “cadena pro- $\alpha$ 1(XI)” que se combina con otras dos cadenas de colágeno (pro- $\alpha$ 2(XI) y pro- $\alpha$ 1(II)) para formar una molécula de procolágeno (proCOL11A1) que es procesada enzimáticamente en las células para formar las fibras de colágeno XI. El gen col11a1 humano (también conocido como COLL6 o STL2), cuya secuencia génica de referencia es NG\_008033.1, ocupa unas 150 kilobases (kb), contiene 68 exones, se localiza en el cromosoma 1 (1p21) entre los pares de bases 103342023 y 103574052, y codifica una proteína de 1806 aminoácidos (según la isoforma) y 181 KDa que contiene un péptido-sígnal (aminoácidos 1-36). Este gen está conservado en humanos, chimpancé, vaca, pollo, ratón, rata y pez cebra. Mutaciones en este gen se han asociado a los síndromes Stickler II y Marshall. Polimorfismos de un nucleótido en este gen se han asociado a susceptibilidad de padecer hernia discal lumbar. Se han descrito varios transcritos que se diferencian principalmente en la transcripción de las variantes del exón 6, por ejemplo, uno de 7,2 kb, que codifica la isoforma A (NM\_001854.3 (GI:98985806), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011) de 1.806 aminoácidos, otro de 7,3 kb, que codifica la isoforma B (NM\_080629.2 base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011) de 1806 aminoácidos (GI:98985810), otro de 6,9 kb, que codifica la isoforma C (NM\_080630.3 (GI:299523252), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011) de 1690 aminoácidos (GI:299523253), otro de 7,2kb que codifica la isoforma E (NM\_001190709.1, base de datos NCBI a 1 de agosto de 2011) de 1767 aminoácidos (GI:299523257), etc. El término “col11a1”, tal y como se usa en la presente descripción,

20

25

30

35

no se refiere únicamente al gen humano sino también a los ortólogos de otras especies. Se observa expresión baja y homogénea del gen col11a1 en todos los tejidos analizados excepto en adipocitos dónde es notablemente más elevada (BioGPS: Gene Atlas U133A). En líneas celulares, se detecta expresión elevada en células UASMC (células de  
5 músculo liso de arteria umbilical), HN\_NP (precursores neuronales), HN\_Os (osteoblastos), Panc-1 (células de cáncer de páncreas), H522 (células de cáncer de pulmón) y U251 (células de glioma) (RefExA), A-204 (células de rdbomiosarcoma de corazón), SAOS-2 (células de osteosarcoma de médula ósea) y SK-MEL28 (células de cáncer de piel) (GeneCards).

10

Los término “igual” o “inferior”, aplicados al nivel de expresión de una proteína, en concreto la proteína proCOL11A, significa que la cantidad o concentración de dicha proteína en una determinada muestra es sustancialmente la misma (igual) que, o menor (inferior) que, en otra muestra considerada como muestra control o valor de referencia;  
15 así el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, tal como un papiloma intraductal de mama, sin tendencia a progresar a carcinoma (es decir, con un bajo riesgo de recidiva) es igual (sustancialmente la misma) o inferior (menor que) al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control obtenida a partir de una población control de sujetos  
20 sin historial de tumores de mama o de lesiones papilares de mama (e.g., papiloma intraductal de mama) sin riesgo de recidiva y/o de progresión a carcinoma, o sin historial clínico de carcinoma invasivo. En el contexto de la presente invención, se considera que un nivel de expresión de una proteína, tal como la proteína proCOL11A1, en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es “igual” que el nivel de  
25 expresión de dicha proteína en la muestra control cuando el nivel de expresión de dicha proteína en la muestra del sujeto es sustancialmente el mismo que el nivel de expresión de dicha proteína, por ejemplo, está comprendido entre el valor de referencia (nivel de expresión de la proteína proCOL11A1) más/menos una cantidad menor del 3% de dicho valor de referencia. Asimismo, en el contexto de la presente invención, se considera que  
30 un nivel de expresión de una proteína, tal como la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es “inferior” (o “menor que”) cuando el nivel de expresión de dicha proteína en la muestra del sujeto disminuye, por ejemplo, un 3%, un 5%, un 10%, un 25%, un 50%, o incluso un 100%, con respecto al valor de referencia.

35

El término "lesión papilar de mama" se refiere a un grupo heterogéneo de lesiones mamarias de arquitectura papilar. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de lesiones papilares de mama incluyen papilomas intraductales, papilomatosis, papiloma atípico y carcinomas papilares intraductales. En una realización particular de la invención, para todos los aspectos inventivos considerados, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

El término "papiloma intraductal de mama" se refiere a una proliferación papilomatosa y por lo tanto epitelial, vellosa, con eje conjuntivo-vascular, baja actividad mitótica, fase de metaplasia apocrina y ausencia de patrón cribiforme. Por su presentación puede ser solitario o único y múltiple. Es una masa ocupante de los conductos de gran calibre con localización subareolar, de gran tamaño cuando es único o de pequeño cuando son varios. Puede asociar alteraciones hiperplásicas en el interior de las unidades lobulillares.

El término "predecir", tal como se usa en la presente descripción, aplicado al riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, se refiere a la determinación de la probabilidad de que una lesión papilar de mama progrese o recidive (o no) hacia una lesión maligna en un sujeto diagnosticado de dicha lesión papilar de mama.

El término "probabilidad", tal como aquí se utiliza, mide la frecuencia con la que se obtiene un resultado (o conjunto de resultados) al llevar a cabo un experimento aleatorio, del que se conocen todos los resultados posibles, bajo condiciones suficientemente estables. La probabilidad de que se obtenga un determinado resultado puede ser "alta", es decir, la frecuencia con la que se obtiene un resultado es superior al 50%, o "baja", es decir, la frecuencia con la que se obtiene tal resultado es inferior al 50%. De acuerdo con la presente invención, la probabilidad de que se detecte la proteína proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o la probabilidad de que el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama sea superior al nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en una muestra control, es más alta en aquellos casos en los que dicha lesión papilar de mama progrese hacia una lesión maligna, tal como, por ejemplo, un carcinoma invasivo. Como entenderán los técnicos en la materia, la probabilidad no tiene por qué ser del 100% para todos los sujetos evaluados, aunque preferentemente debería ser así. Sin embargo, dicho término, dentro del contexto de la presente invención, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos diagnosticados de una lesión papilar de mama puedan ser identificados como sujetos que tienen una

probabilidad mayor de obtener un resultado determinado, por ejemplo, que una lesión papilar de mama progrese hacia o recidive en una lesión potencialmente maligna o recidiva maligna. El técnico en la materia puede determinar si un evento es estadísticamente significativo o no, sin grandes complicaciones, utilizando distintas herramientas conocidas de evaluación estadística, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, el test de Student, el test de Mann-Whitney, etc. Información adicional sobre estas herramientas estadísticas puede encontrarse en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*. John Wiley & Sons, New York 1983. Los intervalos de confianza preferidos son de al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95%. Los valores de p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 ó inferiores.

El término “proCOL11A1” se refiere a la cadena  $\alpha 1$  del colágeno XI, cuyo procesamiento da lugar al colágeno XI  $\alpha 1$  (COL11A1). El proCOL11A1 tiene un dominio central triple-hélice con una estructura en forma de bastón, el cual está flanqueado por propéptidos no colagénicos en los extremos N- y C- terminal; estos propéptidos pueden ser eliminados por peptidasas específicas al ser secretados al exterior de la célula generando el COL11A1 maduro, donde cadenas  $\alpha 1$  de colágeno XI se ensamblan entre sí y con cadenas  $\alpha 2$  y/o  $\alpha 3$  para formar fibras de colágeno XI. El proCOL11A1 es codificado por el gen col11a1. Se han descrito varias isoformas de proCOL11A1 humano, por ejemplo, la isoforma A [NM\_001854.3 (GI:98985806), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011] de 1.806 aminoácidos, la isoforma B [NP\_542196.2 (GI:98985810), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011], la isoforma C [NM\_080630.3 (GI:299523252), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011], etc. El término “proCOL11A1”, tal y como se usa en la presente descripción, no se refiere únicamente a la proteína proCOL11A1 humana sino también a los ortólogos de otras especies.

El gen col11a1 codifica una proteína de 1806 aminoácidos, que presenta su región triple helicoidal entre los aminoácidos 529 y 1542. Posee dos dominios que no siempre están presentes en la proteína madura, el C-terminal (aminoácidos 1564-1806) y el N-terminal (aminoácidos 37-511). Forma parte del colágeno tipo XI, que en el cartílago está formado por tres cadenas que forman una triple hélice, la  $\alpha 1$ (XI), la  $\alpha 2$ (XI) (codificada por el gen COL11A2) y la  $\alpha 3$ (XI) (generada por sobreglicosilación de  $\alpha 1$ (II)) que puede ser sustituida por la  $\alpha 1$ (V). Es un componente de la matriz extracelular del cartílago hialino, aunque también se expresa en tejidos no cartilaginosos y en líneas celulares tumorales o transformadas por virus, pero en este caso no siempre se coexpresan las tres cadenas

del colágeno tipo XI, lo que podría significar que las fibras presentarán una composición de cadenas diferente a la del cartílago, homotrimérica o heterotípica en estas localizaciones (Yoshioka, H., J Biol Chem, 1990; 265(11):6423-6426; Lui, LCH, Biochem J, 1995; 311:511-516). Se cree que participa en la fibrillogénesis, regulando el crecimiento lateral de las fibras de colágeno II, sirviendo de soporte para éstas, y situándose en el interior de la fibra formada (Weis, MA., J Biol Chem 2010; 285(4):2580-2590). Se sintetiza como procolágeno, que es proteolíticamente procesado tras la secreción, eliminándose los péptidos N (37-511) y C (1564-1806) terminales (Halsted, KC., Mod Pathol 2008; 21(10):1246-1254). Dentro del péptido amino terminal (NTD) está contenida una región Npp (amino propeptide) o TSP (38-229), que aparece también en otros 7 tipos de colágenos, en la laminina y en la trombospondina, y contiene un sitio de procesamiento para BMP-1 (Warner, L., J Biol Chem 2006; 281(51):39507-39515, Gregory, KE., J Biol Chem 2000; 275(15): 11498-11506). En el caso de  $\alpha 1(XI)$ , esta región no siempre es eliminada, quedando en ocasiones expuesta en la superficie de las fibras de colágeno por largo tiempo (Fallahi, A., Prot Sci 2005; 14:1526-1537). Esta región es muy similar a los dominios LNS, presentando sitios de unión potenciales para heparina y calcio, lo que podría significar una actividad de comunicación célula-ME por unión a los proteoglicanos de heparán sulfato (Warner, L., J Biol Chem 2006; 281(51):39507-39515, Fallahi, A., Prot Sci 2005; 14:1526-1537), incluso después de ser proteolizada del dominio helicoidal. Además, el NTD abarca una región variable, que presenta secuencias y características diferentes según el splicing alternativo, combinando los exones 6-7-8 del gen. Estas variantes presentan especificidad tisular y temporal (Warner, L., J Biol Chem 2006; 281(51):39507-39515), e influyen en el tiempo de procesamiento del Npp.

La expresión “pronosticar la evolución clínica”, en el sentido utilizado en esta descripción, de una lesión papilar de mama se refiere a predecir, en general, la progresión del cuadro clínico de la lesión papilar de mama a lo largo del proceso asistencial de la enfermedad, y, en particular, si recidivará en un carcinoma de mama. A modo ilustrativo, si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control, entonces el pronóstico de la evolución clínica será de recidiva en carcinoma de mama. Asimismo, si no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra es inferior al nivel de expresión de dicha proteína

proCOL11A1 en una muestra control, entonces el pronóstico de la evolución clínica será de no recidiva en carcinoma de mama.

5 El término “proteína” se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, con una actividad biológica. El término incluye todas las formas de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación o acetilación. Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan indistintamente en esta descripción.

10 El término “recidiva”, se refiere, en general, a la reaparición de la lesión tras un periodo más o menos largo de ausencia de enfermedad. En particular, el término “recidiva”, en el sentido utilizado en esta descripción, aplicado a una lesión papilar de mama se refiere a la reaparición de una lesión papilar de mama en forma de lesión maligna, tal como en un tumor o carcinoma de mama, adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular  
15 invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

20 El término “riesgo”, tal como aquí se utiliza, hace referencia al riesgo relativo o probabilidad de que una determinada lesión papilar de mama progrese hacia una lesión potencialmente maligna, tal como, por ejemplo, hacia un tumor o carcinoma de mama, adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar,  
25 carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico. El riesgo puede ser “alto” o “elevado” o, alternativamente, “bajo” o “reducido”. El riesgo, puede ser determinado sin grandes complicaciones, por un técnico en la materia, utilizando distintas herramientas conocidas de evaluación estadística en función de la información obtenida sobre la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 o del nivel de expresión de la proteína  
30 proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

35 El término “sensibilidad” se refiere a la detección de verdaderos positivos (e.g., diagnóstico positivo de una patología, cuando el paciente está afectado de dicha patología); una sensibilidad del 100% significa que no hay falsos negativos (diagnóstico negativo en pacientes afectados).

El término “sujeto” o “individuo” se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o  
5 raza.

El término “superior”, aplicado al nivel de expresión de una proteína, en concreto la proteína proCOL11A, significa que la cantidad o concentración de dicha proteína en una determinada muestra es mayor que en otra muestra considerada como muestra control o  
10 valor de referencia; así el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, tal como un papiloma intraductal de mama, con tendencia a progresar a carcinoma (es decir, con riesgo de recidiva maligna) es mayor que (superior) el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control obtenida a partir de una población control de sujetos  
15 sin historial de tumores de mama o de lesiones papilares de mama (e.g., papiloma intraductal de mama) sin riesgo de recidiva y/o de progresión a carcinoma, o sin historial clínico de carcinoma invasivo. En el contexto de la presente invención, se considera que un nivel de expresión de una proteína, tal como la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es “superior” (o “mayor que”) al  
20 nivel de expresión de dicha proteína en una muestra control (valor de referencia) cuando el nivel de expresión de dicha proteína en la muestra del sujeto aumenta, por ejemplo, un 3%, un 5%, un 10%, un 25%, un 50%, un 100%, o incluso, más cuando se compara con el valor de referencia para dicha proteína en la muestra control, o cuando aumenta, por ejemplo, al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces,  
25 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces, o incluso más, cuando se compara con el valor de referencia para dicha proteína.

El término “tratamiento”, tal como aquí se utiliza, hace referencia en general a la aplicación de una terapia para aliviar o eliminar una patología o para reducir o eliminar  
30 uno o más síntomas asociados a dicha patología. Dicha terapia puede incluir una intervención quirúrgica, un tratamiento farmacológico, un tratamiento radioterápico, etc.

El término “tumor” se refiere a cualquier masa anormal de tejido producto de un proceso neoplásico, benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

35

El término “variante”, aplicado a las secuencias de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, tal como aquí se utiliza, se refiere a secuencias sustancialmente similares. En general, las variantes poseen la misma actividad biológica, desde el punto de vista cualitativo, que la secuencia nativa. Una variante de una secuencia polipeptídica puede ser un derivado de una secuencia polipeptídica que comprende la adición, deleción o sustitución de uno o más aminoácidos presentes en la secuencia nativa. Las variantes de las secuencias de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo pueden diferir de las secuencias descritas dentro de las regiones marco o dentro de las regiones determinantes de complementariedad o CDRs (del inglés “complementarity determining regions”) de cualquiera de las cadenas pesada o ligera. A modo ilustrativo, el término “variante”, aplicado al anticuerpo monoclonal 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54) incluye secuencias de aminoácidos que tienen al menos, aproximadamente, al menos, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las CDRs comprendidas dentro de la región variable de la cadena pesada o de la región variable de la cadena ligera de dicho anticuerpo monoclonal 1E8.33, siempre y cuando la variante resultante mantiene la actividad biológica de la secuencia nativa, es decir, la variante del anticuerpo mantiene la capacidad de reconocer específicamente a la proteína proCOL11A1.

Métodos de pronóstico de evolución clínica/predicción de riesgo

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la expresión de la proteína proCOL11A1 se ve incrementada en papilomas intraductales de mama, una lesión papilar de mama representativa de este grupo de lesiones, que tienen tendencia a progresar a carcinoma de mama.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para pronosticar la evolución clínica y/o predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en adelante “primer método de la invención”, seleccionado entre el Método (A) y el Método (B), en donde

A) el Método (A) comprende

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1;

en donde

- 5 - la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o
- 10 - la no detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo, y

B) el Método (B) comprende

- 15 - comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

en donde

- 20 - un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o
- 25 - un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo.

30 El primer método de la invención es un método de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de una lesión papilar de mama, tal como, por ejemplo, un papiloma intraductal de mama, con tendencia a recidivar o progresar a carcinoma, expresan y muestran proCOL11A1 o presentan niveles elevados de proCOL11A1 en términos absolutos o en comparación con los correspondientes  
35 niveles en muestras control, procedentes de sujetos sin historial clínico de tumores de

mama o con lesiones papilares de mama, por ejemplo, papilomas intraductales de mama, sin riesgo de recidiva, o con otras lesiones benignas de mama.

5 Para la puesta en práctica del primer método de la invención, en cualquiera de sus alternativas [Método (A) o (Método (B))], se obtiene una muestra, tal como una muestra biológica, del individuo a estudiar. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dicha muestra incluyen un cilindro de tejido obtenido mediante biopsia de aguja gruesa (BAG), una pieza de tejido mamario obtenida por cirugía, por ejemplo, mediante biopsia, citología o resección quirúrgica, así como un fluido biológico, tal como sangre, suero, aspirado de 10 pezón, orina, etc. Dependiendo del tipo de muestras, para simplificar su conservación y manejo, estas se pueden fijar en formol y embeber en parafina, o, alternativamente, se pueden congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable.

15 Las muestras a analizar pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de una lesión papilar de mama. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

#### Método (A)

20 En una realización particular, el primer método de la invención comprende detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1 [Método (A)], en donde la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o en donde la no detección de la 25 presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo.

30 La presencia de proCOL11A1 en la muestra a analizar puede ser detectada mediante cualquier método convencional que permita detectar la presencia de una proteína, en concreto proCOL11A1, en una muestra. En una realización particular, dicha muestra es una muestra de tejido mamario. Prácticamente cualquier método convencional para la detección de la presencia de una proteína en una muestra de tejido puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar la presencia de proCOL11A1. Ejemplos 35 ilustrativos, no limitativos, de dichos métodos incluyen métodos basados en el empleo de anticuerpos, técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligandos, etc.

En una realización particular, la detección de la presencia de proCOL11A1 se realiza mediante un inmunoensayo basado en la formación de un complejo de tipo antígeno-anticuerpo, mediante el empleo de uno (o más anticuerpos) que reconocen uno (o más) epítomos de proCOL11A1, y posterior visualización de los complejos formados por cualquier técnica apropiada, incluyendo tanto técnicas radiactivas como no radiactivas tales como, por ejemplo, técnicas colorimétricas, fluorimétricas, luminiscentes (e.g., bioluminiscentes, quimioluminiscentes, etc.), etc., utilizando para ello, en su caso, unos anticuerpos secundarios marcados con los marcadores apropiados.

Los anticuerpos a utilizar para la puesta en práctica de esta realización particular del primer método de la invención [Método (A)] son anticuerpos específicos que reconocen la proteína proCOL11A1, o un fragmento antigénico de proCOL11A1, es decir, anticuerpos que reconocen un epítomo de proCOL11A1. Los anticuerpos que pueden utilizarse en este tipo de ensayos pueden ser sueros policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv ("single chain Fv"), diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, combibodies, etc., capaces de reconocer y unirse a proCOL11A1, o a un fragmento antigénico de la misma; dichos anticuerpos pueden ser humanos, humanizados o de origen no humano. Ventajosamente, el anticuerpo que reconoce la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce específicamente el subdominio VAR, en el propéptido N-terminal de proCOL11A1. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos que detectan específicamente proCOL11A1 se mencionan en la solicitud de patente internacional PCT/ES2012/070616 [WO .....]. En una realización particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54), un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína proCOL11A1, sin detectar otras proteínas con alta homología de secuencia, tal como la proteína COL5A1.

El anticuerpo que reconoce a proCOL11A1 puede estar, opcionalmente, conjugado a un portador. Asimismo, dicho anticuerpo que reconoce a proCOL11A1 puede estar marcado o no; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores que pueden ser utilizados incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Los anticuerpos no marcados pueden utilizarse en ensayos de aglutinación, mientras que los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos.

35

Existen una amplia variedad de ensayos bien conocidos por los técnicos en la materia que se pueden usar para la puesta en práctica de esta realización particular del primer método de la invención [Método (A)], que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) que reconocen a proCOL11A1 y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); entre estas técnicas se incluyen Western-blot o inmunotransferencia, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA (inmunoensayo enzimático) competitivo, DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), ensayos inmunohistoquímicos, ensayos inmunohistoquímicos, técnicas de detección multiplex basadas en el empleo de microesferas, biochips o microarrays de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, o ensayos basados en precipitación coloidal, etc.

En una realización particular y preferida, la detección de la presencia de proCOL11A1 según el Método (A) se lleva a cabo mediante un ensayo inmunohistoquímico, un procedimiento histopatológico conocido que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, normalmente marcado con un marcador (por ejemplo, una enzima), que puede transformar un sustrato en un compuesto visible sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno (proCOL11A1 en este caso), aplicado a una muestra de tejido orgánico. Con la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa, antiperoxidasa, fluoresceína, etc.), el complejo antígeno-anticuerpo formado puede localizarse e identificarse en las muestras tisulares o citológicas a estudiar, con lo que se identifican los marcadores antigénicos característicos de distintas células y se puede determinar el tipo de célula involucrado en la muestra.

Brevemente, en una realización particular del Método (A), la muestra que comprende tejido mamario a analizar con el fin de detectar la presencia de proCOL11A1 mediante un ensayo inmunohistoquímico, que puede ser una muestra fresca, una muestra congelada o una muestra embebida en parafina y fijada usando un agente protector (e.g., formol o similar), se tiñe con un anticuerpo específico frente a proCOL11A1 y se determina la frecuencia de células que se han teñido y la intensidad de la tinción. En caso necesario, la muestra a analizar se somete a un tratamiento acondicionador que puede incluir uno o más de los siguientes procesos: fijar el tejido, obtener cortes de espesor adecuado, recuperar el antígeno, bloquear moléculas que puedan interferir en la reacción indirecta, evitar uniones inespecíficas, etc. Ventajosamente, la detección mediante dicho ensayo inmunohistoquímico de proCOL11A1 en la muestra a analizar se lleva a cabo en paralelo con muestras tisulares o citológicas que sirven como marcador positivo y como marcador

negativo, y, si se desea, como referencia, se pueden usar tejidos sanos del mismo origen que el de la lesión papilar de mama que se está analizando. También es frecuente usar un control de fondo. Típicamente, se asigna a la muestra un valor indicativo de la expresión total que se calcula en función de la frecuencia de células teñidas y de la intensidad en cada una de las células teñidas. Los criterios típicos para asignar valores de expresión a las muestras han sido descritos en, por ejemplo, Handbook of Immunohistochemistry and In Situ Hybridization in Human Carcinomas, M. Hayat Ed., 2004, Academic Press.

10 En el Ejemplo 1 se describe un ensayo inmunohistoquímico para detectar la presencia de proCOL11A1 en el que la muestra que comprende tejido mamario a analizar, previamente acondicionada, se pone en contacto con el anticuerpo monoclonal frente a proCOL11A1, y, finalizado el periodo de incubación, se revela con diaminobencidina (DAB) usando un sistema de detección apropiado.

15

La detección de la presencia de proCOL11A1 mediante un ensayo inmunohistoquímico presenta numerosas ventajas ya que se utiliza de forma generalizada en los laboratorios de Anatomía Patológica, lo que posibilita la aplicabilidad inmediata del primer método de la invención, en particular, el Método (A), mediante dicha técnica, y, además, se encuentra muy automatizada, lo que facilita que se realice bajo las mismas condiciones.

20

A partir de la detección de la presencia de proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, es posible relacionar la detección de la presencia (o la no detección de la presencia - ausencia) de proCOL11A1 en dicha muestra con el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar o con la predicción del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

25

Así, en una etapa posterior, el Método (A) implica correlacionar la detección de la presencia (o la no detección de la presencia - ausencia) de proCOL11A1 con un pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar o con la predicción del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama.

30

Esta correlación puede indicar que:

35

- el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar de mama es de recidiva en carcinoma de mama cuando se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio; o que

5

- el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar de mama es de no recidiva en carcinoma de mama, cuando no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio.

10

Alternativamente, esta correlación puede indicar que:

- el riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama es alto cuando se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio; o que

15

- el riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama es bajo cuando no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio.

20

Esta información puede ser utilizada eficientemente por el especialista para seleccionar el tratamiento más apropiado a administrar al sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, en función del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama.

25

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “detección de la presencia de proCOL11A1”, o similar, se refiere a la capacidad de detectar proCOL11A1 en la muestra analizada utilizando alguno de los métodos a los que se ha hecho referencia previamente. Asimismo, en el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “no detección de la presencia de proCOL11A1”, o similar, se refiere a la incapacidad de

30

detectar proCOL11A1 en la muestra analizada utilizando alguno de los métodos a los que se ha hecho referencia previamente.

Método (B)

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en la muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control, en donde un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o en donde un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

Las características de la muestra a analizar ya han sido mencionadas previamente.

El Método (B) comprende determinar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama y compararlo con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control.

En una realización particular, la determinación del nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 se lleva a cabo mediante la cuantificación o determinación de la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 en dicha muestra.

La cantidad o concentración de proteína proCOL11A1 presente en dichas muestras puede ser cuantificada mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en las muestras a analizar. En este caso, el Método (B) comprende la realización de una etapa de extracción para obtener un extracto proteico que contenga dicha proteína. La obtención de extractos proteicos puede realizarse mediante métodos convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Prácticamente cualquier método convencional para determinar la cantidad o concentración de proteínas en una muestra, debidamente adaptado, puede ser utilizado dentro del marco de la presente invención para cuantificar la cantidad o concentración de proteína proCOL11A1 presente en una muestra. A modo ilustrativo, no limitativo, la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 puede ser determinada mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con

capacidad de unirse a proCOL11A1 y posterior cuantificación de los complejos formados. En una realización particular, el Método (B) comprende poner en contacto el extracto de proteínas de la muestra con una composición que comprende uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína proCOL11A1, bajo condiciones que  
 5 permiten la formación de complejos anticuerpo: proCOL11A1 y determinar la cantidad o concentración de proteína proCOL11A1 presente en la muestra. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos métodos incluyen métodos basados en el empleo de anticuerpos, técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligandos, etc.

10 En una realización particular, la detección de la presencia de proCOL11A1 se realiza mediante un inmunoensayo basado en la formación de un complejo de tipo antígeno-anticuerpo, mediante el empleo de uno (o más anticuerpos) que reconocen uno (o más) epítomos de proCOL11A1, y posterior visualización y cuantificación de los complejos formados por cualquier técnica apropiada, incluyendo tanto técnicas radiactivas como no  
 15 radiactivas tales como, por ejemplo, técnicas colorimétricas, fluorimétricas, luminiscentes (e.g., bioluminiscentes, quimioluminiscentes, etc.), etc., utilizando para ello, en su caso, unos anticuerpos secundarios marcados con los marcadores apropiados.

Los anticuerpos a utilizar para la puesta en práctica de esta realización particular del  
 20 primer método de la invención [Método (B)] son anticuerpos específicos que reconocen la proteína proCOL11A1, o un fragmento antigénico de proCOL11A1, es decir, anticuerpos que reconocen un epítomo de proCOL11A1. Los anticuerpos que pueden utilizarse en este tipo de ensayos pueden ser sueros policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv ("single chain Fv"),  
 25 diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, combibodies, etc., capaces de reconocer y unirse a proCOL11A1, o a un fragmento antigénico de la misma; dichos anticuerpos pueden ser humanos, humanizados o de origen no humano. Ventajosamente, el anticuerpo que reconoce la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce específicamente el subdominio VAR, en el propéptido N-terminal de proCOL11A1. Ejemplos ilustrativos de  
 30 anticuerpos que detectan específicamente proCOL11A1 se han mencionado en relación con el Método (A), cuyo contenido se incorpora aquí por referencia. La solicitud de patente internacional PCT/ES2012/070616 [WO .....] describe unos anticuerpos que específicamente reconocen el subdominio VAR, en el propéptido N-terminal de proCOL11A1. En una realización particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal  
 35 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54).

El anticuerpo que reconoce a proCOL11A1 puede estar, opcionalmente, conjugado a un portador. Asimismo, dicho anticuerpo que reconoce a proCOL11A1 puede estar marcado o no; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de marcadores que pueden ser utilizados incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, 5 sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Los anticuerpos no marcados pueden utilizarse en ensayos de aglutinación, mientras que los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos.

Existen una amplia variedad de ensayos bien conocidos por los técnicos en la materia 10 que se pueden usar para la puesta en práctica de esta realización particular [Método (B)] del primer método de la invención, que usan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) que reconocen a proCOL11A1 y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); entre estas técnicas se incluyen Western-blot o inmunotransferencia, ELISA, RIA, EIA competitivo, DAS-ELISA, ensayos inmunohistoquímicos, ensayos 15 inmunohistoquímicos, técnicas de detección multiplex basadas en el empleo de microsferas, biochips o microarrays de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, o ensayos basados en precipitación coloidal, etc.

En una realización particular y preferida, la detección de la presencia de proCOL11A1 20 según el Método (B) se lleva a cabo mediante un ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA), un procedimiento de inmunodetección conocido que se basa en la utilización de uno o dos anticuerpos específicos, uno de ellos normalmente marcado con un enzima, que puede transformar un sustrato en un compuesto visible sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar un complejo con el antígeno (proCOL11A1 en este caso), aplicado 25 a un extracto de proteína proveniente por lo general de un fluido biológico (e.g., sangre, suero, orina, aspirado de pezón, etc.) o de una porción de tejido, o aplicado al fluido biológico en sí mismo. Con la utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa, antiperoxidasa, fluoresceína, etc.), el complejo antígeno-anticuerpo formado puede detectarse y cuantificarse en las muestras a estudiar, pudiendo cuantificar 30 fácilmente los niveles de proteína a analizar en muestras de distinto origen.

Brevemente, en una realización particular del Método (B), la muestra que comprende un fluido biológico con el fin de detectar la presencia de proCOL11A1 mediante un ensayo 35 inmunohistoquímico, que puede ser una muestra fresca o una muestra congelada de sangre, suero, orina, aspirado de pezón, etc., se pone en contacto con el/los anticuerpos anti-pro-COL11A1 marcados y se cuantifica la concentración de la proteína en función a

la intensidad de la reacción enzimática asociada al marcaje del anticuerpo. En caso necesario, la muestra a analizar se somete a un proceso de extracción de proteínas con el objetivo de concentrar las mismas, facilitando su detección, mediante métodos convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P.,  
5 Biotechniques, 1993, 15:532). Ventajosamente, la detección mediante dicho ensayo inmunohistoquímico de proCOL11A1 en la muestra a analizar se lleva a cabo en paralelo con muestras que contienen niveles conocidos de proCOL11A1 como referencia (curva patrón), formados por muestras humanas de concentración conocida, proteína recombinante proCOL11A1 o extractos de líneas celulares que expresan la proteína, que  
10 permitirán, por comparación de las intensidades obtenidas, calcular la concentración de proCOL11A en las muestras a analizar.

La detección de la presencia de proCOL11A1 mediante un ensayo de inmunodetección tipo ELISA presenta numerosas ventajas ya que se utiliza de forma generalizada en los  
15 laboratorios de Bioquímica, lo que posibilita la aplicabilidad inmediata del primer método de la invención, en particular, el Método (B), mediante dicha técnica, y, además, se encuentra muy automatizada, lo que facilita que se realice bajo las mismas condiciones.

El Método (B) comprende la etapa de comparar la cantidad o concentración de proteína proCOL11A1, determinada en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama objeto de estudio, con la cantidad o concentración de proteína proCOL11 de la muestra control (valor de referencia). En una realización particular, la muestra control es una muestra procedente de sujetos sin historial clínico de tumores de mama o de lesiones papilares de mama (e.g., papiloma intraductal de mama) sin riesgo de recidiva  
25 y/o de progresión a carcinoma.

Así, una vez que se ha establecido el valor de referencia, se compara el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio con el valor de referencia. Como consecuencia de  
30 esta comparación, el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto puede ser “superior” (mayor que), “inferior” (“menor que”) o “igual a” dicho valor de referencia para dicha proteína en la muestra control. Tal como se ha comentado previamente, en el contexto de la presente invención, se considera que un nivel de expresión de la proteína de interés (proCOL11A1) en la muestra del sujeto bajo estudio  
35 es “superior” al valor de referencia para dicha proteína cuando el nivel de expresión de dicha proteína en la muestra del sujeto bajo estudio aumenta, por ejemplo, un 3%, un 5%,

un 10%, un 25%, un 50%, un 100% o incluso más cuando se compara con el valor de referencia para dicha proteína, o cuando aumenta, por ejemplo, al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más cuando se compara con el valor de referencia para dicha proteína. Asimismo, en el contexto de la presente invención, se considera que un nivel de expresión del gen de interés en la muestra del sujeto es “inferior” al valor de referencia para dicha proteína cuando el nivel de expresión de dicha proteína en la muestra del sujeto bajo estudio disminuye, por ejemplo, un 3%, un 5%, un 10%, un 25%, un 50%, un 75%, o incluso un 100% cuando se compara con el valor de referencia para dicha proteína. Adicionalmente, en el contexto de la presente invención, se considera que un nivel de expresión del gen de interés en la muestra del sujeto es “igual” al valor de referencia para dicha proteína cuando el nivel de expresión de dicha proteína en la muestra del sujeto bajo estudio es sustancialmente el mismo que el valor de referencia para dicha proteína (es decir, el valor de referencia  $\pm$  3%).

Adicionalmente, en una etapa posterior, el Método (B) comprende la etapa de correlacionar el resultado obtenido tras comparar la cantidad o concentración de proteína proCOL11A1 en la muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama con la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control con el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar o con la predicción del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

Esta correlación puede indicar que:

- el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar de mama es recidiva en carcinoma de mama, cuando la cantidad o concentración de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior a la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control, o que
- el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar de mama es no recidiva en carcinoma de mama, cuando la cantidad o concentración de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar

de mama es inferior a la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

Alternativamente, esta correlación puede indicar que:

5

- el riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama es alto cuando la cantidad o concentración de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior a la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control, o que

10

- el riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama es bajo cuando la cantidad o concentración de la proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior a la cantidad o concentración de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

15

En otra realización particular del Método (B), la determinación del nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 se lleva a cabo mediante la cuantificación del nivel de expresión del gen col11a1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama. En este caso, la puesta en práctica del Método (B) comprende determinar el nivel de expresión del gen col11a1 en una muestra de dicho sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama y comparar el nivel de expresión de dicho gen col11a1 en dicha muestra con el nivel de expresión del gen col11a1 en una muestra control, y, finalmente, correlacionar el resultado obtenido tras dicha comparación con el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar y/o con la predicción del riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama.

20

El nivel de expresión de un gen puede ser cuantificado mediante la cuantificación del nivel de mRNA codificante de dicho gen (col11a1), o, alternativamente, del nivel del DNA complementario (cDNA) a dicho mRNA. En este caso, el Método (B) comprende la realización de una etapa de extracción para obtener el RNA total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532; Molina, M.A., et al., Cancer Res., 1999, 59: 4356-4362).

25

30

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la presente invención para cuantificar el nivel de mRNA del gen col11a1 o de su correspondiente cDNA. A modo ilustrativo, no limitativo, el nivel del mRNA del gen col11a1 puede ser cuantificado mediante el empleo de métodos que comprenden la  
5 amplificación del mRNA y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho mRNA, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del mRNA del gen col11a1 o de cDNA correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc. En una realización particular la amplificación y cuantificación  
10 del mRNA correspondiente al gen col11a1 se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR). Análogamente, el nivel del cDNA correspondiente a dicho mRNA del gen col11a1 también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente cDNA mediante transcripción inversa (RT) del mRNA  
15 correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho cDNA. En una realización particular, la amplificación se lleva a cabo de manera cualitativa o cuantitativa, mediante una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, PCR o RT-PCT, usando oligonucleótidos cebadores que amplifican específicamente una región del gen col11a1; en una realización particular, dicha RT-PCR se lleva a cabo en  
20 presencia de la pareja de oligonucleótidos cebadores cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

De acuerdo con esta realización particular del Método (B), el nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra del sujeto bajo estudio  
25 se compara con el nivel del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra control (valor de referencia). En una realización particular, la muestra control es una muestra procedente de sujetos sin historial clínico de tumores de mama o de lesiones papilares de mama (e.g., papiloma intraductal de mama) sin riesgo de recidiva y/o de progresión a carcinoma. Adicionalmente, si se desea, se puede usar un  
30 control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

Adicionalmente, según esta realización particular del Método (B), el resultado obtenido tras la comparación del nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA  
35 determinado en la muestra del sujeto bajo estudio con el nivel del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra control (valor de referencia) se

correlaciona con el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar o con la predicción del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

5 Esta correlación puede indicar que:

- 10 - el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar de mama es de recidiva en carcinoma de mama, cuando el nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra control, o que
- 15 - el pronóstico de la evolución clínica de dicha lesión papilar de mama es de no recidiva en carcinoma de mama, cuando el nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior al nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra control.

Alternativamente, esta correlación puede indicar que:

20

- 25 - el riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama es alto cuando el nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra control, o que
- 30 - el riesgo de recidiva de la lesión papilar de mama es bajo cuando el nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior al nivel de mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA determinado en la muestra control.

Esta información puede ser utilizada eficientemente por el especialista para seleccionar el tratamiento a administrar al sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama más apropiado en función del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama.

- 5 Actualmente, debido a la falta de marcadores fiables, existe una gran controversia sobre el tratamiento de las lesiones papilares de mama, y, en particular, del papiloma intraductal de mama (una lesión papilar de mama benigna cuya probabilidad de recidiva en una patología maligna es bastante alta (33%) cuando la lesión inicial presenta atipias), por lo que algunos especialistas se muestran partidarios de realizar una extirpación
- 10 completa de la lesión en todos los casos, mientras que otros son partidarios de la extirpación completa de la lesión cuando se presenten atipias o papilomas múltiples.

Ahora, mediante la información proporcionada por el primer método de la invención [Método (A) y Método (B)], el especialista podrá seleccionar el tratamiento a administrar

15 al sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama más apropiado en función del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama, optimizando de este modo la atención terapéutica a aplicar al sujeto y evitando los inconvenientes asociados con la aplicación de un tratamiento inapropiado.

- 20 En una realización particular, la lesión papilar de mama que padece el sujeto bajo estudio es un papiloma intraductal de mama.

En otra realización particular, la recidiva de la lesión papilar de mama es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama.

- 25 En otra realización particular, la recidiva de la lesión papilar de mama es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar,
- 30 carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

#### Métodos de selección

- 35 Existen distintos tratamientos que pueden ser aplicados sobre el sujeto diagnosticado que una lesión papilar de mama aunque existen discrepancias sobre el tratamiento concreto a

aplicar. A modo ilustrativo, algunos especialistas son partidarios de tratar las lesiones papilares de la mama mediante extirpación quirúrgica de la mama; otros especialistas son partidarios de tratar dichas lesiones mediante la extirpación quirúrgica de la lesión papilar de mama mediante cirugía conservadora, por ejemplo, pero sin limitarse a, resección por mamotomo o resección por cilindros. En ocasiones, estos tratamientos suelen ir acompañados de un tratamiento farmacológico y/o radioterápico posterior y de un seguimiento por el especialista de la evolución de las lesiones y/o del tratamiento aplicado.

10 Ahora se ha observado que, debido a que es posible correlacionar la detección de la presencia de, y/o la cuantificación del nivel de expresión de, la proteína proCOL11A1 en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama con el pronóstico de su evolución clínica y/o con la predicción del riesgo de recidiva de dicha lesión, el especialista puede elegir el tratamiento más apropiado a aplicar a dicho sujeto en función del riesgo de recidiva de dicha lesión papilar de mama. De este modo, se optimiza la atención terapéutica al sujeto y se evitan inconvenientes asociados con la aplicación de un tratamiento inapropiado, por ejemplo, se evitan intervenciones quirúrgicas innecesarias con la consiguiente repercusión económica que ello conlleva.

20 Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama para un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva, en adelante “segundo método de la invención”, que comprende

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o

- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento:

- si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o
- 5 - si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

De acuerdo, por tanto, con el segundo método de la invención, se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 y/o se determina el nivel de expresión de dicha proteína  
10 proCOL11A1 en una muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama que está siendo evaluado y se correlaciona el resultado obtenido con la posibilidad de seleccionar a dicho sujeto para recibir un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la  
15 recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva.

Las características de la muestra, el sujeto a tratar y la proteína proCOL11A1 ya han sido mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención, al igual que  
20 los métodos para detectar y/o cuantificar dicha proteína, y se incorporan aquí por referencia.

En una realización particular, el tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación  
25 completa de la lesión comprende la realización de una mastectomía parcial o total, por ejemplo, incluye desde cirugía conservadora de la mama hasta la Mastectomía Radical Modificada de Mérola-Patey, según el caso. El especialista en la materia puede aplicar el tratamiento farmacológico preventivo que considere más adecuado al caso para evitar la recidiva. Asimismo, el especialista procederá a realizar un seguimiento exhaustivo de la  
30 progresión de la lesión con el fin de detectar precozmente la posible recidiva, para lo cual establecerás pautas que considere más oportunas según el caso.

Una vez analizada la presencia y/o la cantidad de proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio, es posible evaluar  
35 la posibilidad de seleccionar a dicho sujeto para que reciba un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método

que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva. El establecimiento de la posibilidad de seleccionar a un sujeto para que reciba dicho tratamiento se lleva a cabo en base a la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 o al nivel de expresión de dicha proteína en una muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, de manera que si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control, entonces dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento. En caso contrario, el sujeto no será seleccionado para ese tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

El segundo método de la invención permite, por tanto, seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama en necesidad de tratamiento, para recibir un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva. Así, si en la muestra del sujeto analizada se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1, o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control, entonces dicho sujeto es un candidato adecuado *a priori* para recibir un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva.

Este segundo método de la invención constituye una valiosa herramienta para el tratamiento de lesiones papilares de mama ya que, a la vista de los resultados proporcionados evaluando el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama mediante

un método como el proporcionado por esta invención, el especialista podrá seleccionar (o descartar) al sujeto que está siendo evaluado para que reciba un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva en función de la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1, o del nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en la muestra procedente de dicho sujeto. Por tanto, los métodos y medios proporcionados por la presente invención pueden ayudar a los especialistas a seleccionar el tratamiento más apropiado a administrar a un sujeto que padece una lesión papilar de mama y evitar los efectos adversos asociados con la administración de un tratamiento innecesario en el caso de sujetos sin riesgo de recidiva o progresión de una lesión papilar a carcinoma de mama.

Alternativamente, en otro aspecto, la invención proporciona un método para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama para un tratamiento seleccionado entre un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora y un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama, en adelante "tercer método de la invención", que comprende

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o
- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento:

- si no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o
- si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

De acuerdo con el tercer método de la invención, se detecta la proteína proCOL11A1 y/o se determina el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama que está siendo evaluado y se correlaciona el resultado obtenido con la posibilidad de seleccionar a dicho sujeto para recibir un tratamiento seleccionado entre (i) un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora, y (ii) un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama.

En una realización particular, el tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de la lesión papilar de mama mediante cirugía conservadora se lleva a cabo mediante mamotomo o cilindros.

Las características de la muestra, el sujeto a tratar y la proteína proCOL11A1 ya han sido mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención, al igual que los métodos para detectar y/o cuantificar dicha proteína, y se incorporan aquí por referencia.

Una vez analizada la presencia y/o la cantidad de proteína proCOL11A1 en la muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio, es posible evaluar la posibilidad de seleccionar a dicho sujeto para que reciba un tratamiento seleccionado entre (i) un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora, y (ii) un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama. El establecimiento de la posibilidad de seleccionar a un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama para que reciba dicho tratamiento se lleva a cabo en base a la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 o al nivel de expresión de dicha proteína en una muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, de manera que si no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control, entonces dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento. En caso contrario, el sujeto no será seleccionado para ese tratamiento seleccionado entre (i) un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora, y (ii) un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

En una realización particular, el especialista selecciona el sujeto bajo estudio para un tratamiento que comprende la extirpación de la lesión papilar de mama por cirugía conservadora. En una realización concreta, el tratamiento que comprende la extirpación de la lesión papilar de mama por cirugía conservadora comprende la resección por mamotomo, la resección por cilindros de dicha lesión papilar de mama, o la resección en bloque que comprende el conducto afectado.

En otra realización particular, el especialista selecciona el sujeto bajo estudio para un tratamiento que no comprende la extirpación de la lesión papilar de mama por cirugía conservadora.

El tercer método de la invención permite, por tanto, seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama en necesidad de tratamiento, para recibir un tratamiento seleccionado entre (i) un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora, y (ii) un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama. Así, si en la muestra del sujeto analizada no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1, o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra es igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control, entonces dicho sujeto es un candidato adecuado *a priori* para recibir dicho tratamiento previamente mencionado.

Este tercer método de la invención constituye una valiosa herramienta para el tratamiento de lesiones papilares de mama ya que, a la vista de los resultados proporcionados evaluando el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama mediante un método como el proporcionado por esta invención, el especialista podrá seleccionar (o descartar) al sujeto que está siendo evaluado para que reciba un tratamiento seleccionado entre (i) un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora, y (ii) un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama, en función de la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1, o del nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en la muestra procedente de dicho sujeto. Por tanto, los métodos y medios proporcionados por la presente invención pueden ayudar a los especialistas a seleccionar el tratamiento más apropiado a administrar a un sujeto que padece una lesión papilar de mama y evitar los efectos adversos asociados con la administración de un tratamiento ineficaz.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, en adelante "cuarto método de la invención", que comprende

- 5
- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o
  - comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una
- 10 muestra control;

en donde dicho tratamiento se selecciona entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos,

15

en donde se selecciona dicho tratamiento:

- si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o
  - si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.
- 20

25 De acuerdo con el cuarto método de la invención, se detecta la proteína proCOL11A1 y/o se determina el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama que está siendo evaluado y se correlaciona el resultado obtenido con la posibilidad de seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, en donde dicho tratamiento se

30 selecciona entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos.

Las características de la muestra, el sujeto a tratar y la proteína proCOL11A1 ya han sido

35 mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención, al igual que

los métodos para detectar y/o cuantificar dicha proteína, y se incorporan aquí por referencia.

Una vez analizada la presencia y/o la cantidad de proteína proCOL11A1 en la muestra  
5 del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama bajo estudio, es posible evaluar la posibilidad de seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, en donde dicho tratamiento se selecciona entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos. El establecimiento de la posibilidad  
10 de seleccionar dicho tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama se lleva a cabo en base a la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 o al nivel de expresión de dicha proteína en una muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, de manera que si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o  
15 si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control, entonces se selecciona un tratamiento seleccionado entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los  
20 mismos, para aplicar a dicho sujeto. En caso contrario, ese tratamiento no será seleccionado para ese sujeto que padece una lesión papilar de mama. En una realización particular, dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

En una realización particular, el especialista selecciona un tratamiento farmacológico para  
25 aplicar a un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama. El especialista en la materia elegirá el tratamiento farmacológico que considere más adecuado según el caso a tratar; ejemplos ilustrativos, no limitativos, de fármacos que pueden ser utilizados en dicho tratamiento farmacológico incluyen docetaxel, doxorrubicina, 5-fluorouracilo, metotrexato, ciclofosfamida, etc. Por tanto, en una realización particular, el tratamiento  
30 farmacológico comprende la administración de un fármaco adecuado para el tratamiento de una lesión papilar de mama, tal como, por ejemplo, docetaxel, doxorrubicina, 5-fluorouracilo, metotrexato, ciclofosfamida, o, en general, cualquier fármaco que el especialista considere adecuado.

35 En otra realización particular, el especialista selecciona un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama para aplicar a un sujeto

diagnosticado de una lesión papilar de mama. La extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama puede realizarse mediante cualquiera de las técnicas previamente mencionadas en esta descripción o cualquier otra técnica que el especialista en la materia considere adecuada.

5

En otra realización particular, el especialista selecciona un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama para aplicar a un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama y un tratamiento farmacológico.

10

En otra realización particular, el cuarto método de la invención comprende, además, si se desea, un tratamiento radioterápico posterior que puede incluir, pero no limitarse a radioterapia externa, radioterapia locorregional o radioterapia interna/braquiterapia, y/o el seguimiento de la evolución de la enfermedad o del tratamiento aplicado durante un periodo de tiempo apropiado según el especialista.

15

El cuarto método de la invención permite, por tanto, seleccionar un tratamiento seleccionado entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos, para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama. Así, si en la muestra del sujeto analizada se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1, o si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control, entonces dicho sujeto es un candidato adecuado *a priori* para recibir dicho tratamiento seleccionado entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos.

20

25

Este cuarto método de la invención constituye una valiosa herramienta para el tratamiento de lesiones papilares de mama ya que, a la vista de los resultados proporcionados evaluando el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama mediante un método como el proporcionado por esta invención, el especialista podrá seleccionar (o descartar) el tratamiento (farmacológico y/o quirúrgico) a aplicar al sujeto que está siendo evaluado, en función de la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1, o del nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en la muestra procedente de dicho sujeto. Por tanto, los métodos y medios proporcionados por la presente invención pueden ayudar a los especialistas a seleccionar el tratamiento más apropiado a administrar a un sujeto

30

35

que padece una lesión papilar de mama y evitar los efectos adversos asociados con la administración de un tratamiento ineficaz.

Usos

5

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de la proteína proCOL11A1 como marcador para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una  
10 lesión papilar de mama.

En una realización particular, la lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

15

En otra realización particular, la recidiva de la lesión papilar de mama es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama. En otra realización particular, dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma  
20 papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

20

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que reconoce la proteína  
25 proCOL11A1, como marcador para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

25

30

Las características del anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que reconoce la proteína proCOL11A1, han sido mencionadas en relación con el primer método de la invención, en particular, en relación con el Método (A) y se incorporan aquí por referencia. Ventajosamente, el anticuerpo que reconoce la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce específicamente el subdominio  
35 VAR, en el propéptido N-terminal de proCOL11A1. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos que detectan específicamente proCOL11A1 se mencionan en la solicitud de patente

35

internacional PCT/ES2012/070616 [WO .....]. En una realización particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54), un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína proCOL11A1, sin detectar otras proteínas con alta homología de secuencia, tal como la proteína  
5 COL5A1.

En una realización particular, la lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

10 En otra realización particular, la recidiva de la lesión papilar de mama es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama. En otra realización particular, dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma  
15 papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit que comprende un reactivo que reconoce la proteína proCOL11A1, o un reactivo para la detección y/o cuantificación  
20 de la expresión del gen col11a1, para pronosticar la evolución clínica y/o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

25 En una realización particular, dicho reactivo que reconoce la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que reconoce la proteína proCOL11A1. Las características de dicho anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que reconoce la proteína proCOL11A1, han sido mencionadas en relación con el primer método de la  
30 invención, en particular, en relación con el Método (A) y se incorporan aquí por referencia. Ventajosamente, el anticuerpo que reconoce la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce específicamente el subdominio VAR, en el propéptido N-terminal de proCOL11A1. Ejemplos ilustrativos de anticuerpos que detectan específicamente proCOL11A1 se mencionan en la solicitud de patente internacional  
35 PCT/ES2012/070616 [WO .....]. En una realización particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (García-Ocaña, et al., Int J Oncol. 2012; 40(5):1447-54),

un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína proCOL11A1, sin detectar otras proteínas con alta homología de secuencia, tal como la proteína COL5A1.

5 En otra realización particular, dicho reactivo para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen col11a1 comprende una pareja de oligonucleótidos cebadores que amplifican específicamente una región del gen col11a1 y/o una sonda nucleotídica que reconoce una región del gen col11a1; en una realización particular, dicha pareja de oligonucleótidos cebadores comprende los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

10

En una realización particular, la recidiva de la lesión papilar de mama es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama. En otra realización particular, dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, 15 carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

20 En otra realización particular, la lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

A la vista de lo anterior, el experto en la materia entenderá que la invención, además, permite clasificar las lesiones papilares de mama, en particular, los papilomas intraductales de mama, según su tendencia o riesgo a recidivar y/o progresar a 25 carcinomas (malignización), lo que resulta útil para decidir el tratamiento y pauta de seguimiento más adecuados para cada sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, mediante la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1, o la cuantificación del nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1, en una muestra de dicho sujeto. Así, la invención proporciona unos métodos y unos productos para detectar 30 *in vitro*, con alta sensibilidad y especificidad, aquellas lesiones papilares de mama, en particular, aquellos papilomas intraductales de mama, con riesgo a progresar hacia lesiones agresivas, y, por tanto, susceptibles de ser resecados (es decir, extirpados quirúrgicamente) en el momento del diagnóstico y sometidos a un seguimiento posterior más exhaustivo, y distinguirla de aquellas lesiones papilares de mama, en particular, 35 aquellos papilomas intraductales de mama, benignas que no precisan una conducta terapéutica agresiva.

El siguiente ejemplo ilustra la invención y no debe ser considerado en sentido limitativo de la misma.

5

## EJEMPLO 1

### **EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE proCOL11A1 EN PAPILOMAS INTRADUCTALES MAMARIOS Y CORRELACIÓN CON AGRESIVIDAD BIOLÓGICA**

#### **1.1 Materiales y Métodos**

10

##### **Inmunohistoquímica**

Se realizaron cortes con microtomo de las biopsias de cilindros obtenidos mediante punción de aguja gruesa (BAG) fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes de  
15 pacientes con al menos 5 años de seguimiento posterior a la extracción del corte histológico. Los cortes de 3-4  $\mu\text{m}$  se secaron toda la noche a 54-56°C en estufa. Se aplicó un pre-tratamiento con tampón CC2 ["Cell Conditioning 2"] [Ventana Medical Systems, Inc.; catalog no. 950-123] a 98°C durante 32 minutos. Tras una titulación para  
20 ajustar la concentración de anticuerpo adecuada, entre 65, 26 y 13  $\mu\text{g/ml}$ , se incubaron las preparaciones con el anticuerpo monoclonal 1E8.33 específico de proCOL11A1 a una concentración de 26  $\mu\text{g/ml}$  en "Antibody diluent" (Ventana-Roche, Tucson, Arizona) durante 32 minutos a temperatura ambiente. Se empleó el sistema de detección "Optiview" (Ventana) y se reveló con diaminobencidina (DAB) (Ventana).

25 Se analizaron 61 casos de papiloma intraductal con el anticuerpo monoclonal 1E8.33 específico de proCOL11A1. La inmunotinción se evaluó con un ensayo doble ciego por 2 observadores diferentes. Se consideró positivo cuando al menos una célula con morfología fibroblástica poseía inmunoprecipitado.

#### **30 1.2 Análisis de los datos estadísticos**

Se utilizó el test exacto de Fisher para calcular la distribución de frecuencias. Se asumió una  $p < 0,05$  como significativa.

#### **35 1.3 Resultados**

Se estudió la expresión de la proteína proCOL11A1 en cortes histológicos de cilindros de biopsias de papilomas intraductales, procedentes de pacientes con al menos 5 años de seguimiento posterior a la extracción del corte histológico analizado con anticuerpos específicos de la proteína proCOL11A1 (1E8.33). El objetivo de estos experimentos fue  
5 determinar si la presencia de inmunomarcaje proCOL11A1 podía asociarse a una recidiva de forma maligna. De los 61 casos analizados, 33 resultaron positivos al inmunomarcaje con el anticuerpo específico de la proteína proCOL11A1, es decir, presentaban expresión de la proteína proCOL11A1 y 28 resultaron negativos (Figura 1A).

10 De los 33 casos positivos, 9 pacientes presentaron recidiva maligna, en forma de carcinoma infiltrante de mama, tras al menos 5 años de seguimiento (Figura 1B), 2 pacientes presentaron recidiva en forma de papiloma o lesión benigna y 12 pacientes no presentaron recidiva hasta el momento del análisis inmunohistoquímico de los tejidos.

De los 28 casos negativos, sin expresión de proCOL11A1, sólo una paciente presentó  
15 recidiva en forma de carcinoma infiltrante y 4 pacientes presentaron recidiva benigna (Figura 2).

Según el test de Fischer, la frecuencia de la tinción positiva para proCOL11A1 presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,0017$ ) entre el grupo de pacientes con  
20 recidivas malignas y el grupo de pacientes con recidivas benignas, y entre el grupo de pacientes con recidivas malignas y el grupo de pacientes sin recidiva.

Además, se calculó la sensibilidad para predecir recidivas (69%), la sensibilidad para predecir recidivas malignas (90%), la especificidad para detectar recidivas (66%) y la  
25 especificidad para detectar recidivas malignas (66%) así como los valores predictivos positivos (VPP) y negativos (VPN) para detectar recidivas (VPP 33% y VPN 82%) y recidivas malignas (VPP 33% y VPN 96%). Estos resultados demuestran que este marcador (proCOL11A1) posee una alta sensibilidad para predecir recidivas, siendo aún mayor para predecir recidivas malignas.

30

#### **1.4 Conclusiones**

La inmunotinción con el anticuerpo monoclonal 1E8.33, específico de proCOL11A1, muestra elevadas sensibilidad y especificidad en la detección de pacientes con papiloma  
35 intraductal de la mama que van a desarrollar una recidiva o una recidiva maligna.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para pronosticar la evolución clínica y/o predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, seleccionado entre el Método (A) y el Método (B), en donde

A) el Método (A) comprende

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1;

en donde

- la detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o
- la no detección de la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo, y

B) el Método (B) comprende

- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

en donde

- un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es alto, o
- un nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama igual o

inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control es indicativa de que el riesgo de recidiva es bajo.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de tejido de mama o una muestra de un fluido biológico.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha muestra de tejido de mama se obtiene mediante biopsia, citología o resección quirúrgica.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, además, la obtención a partir de dicha muestra de un extracto de proteínas o de un extracto que comprende RNA total.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección de la proteína proCOL11A1 comprende poner en contacto el tejido de mama, o el extracto de proteínas de la muestra, con un anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo anticuerpo-proteína proCOL11A1.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la proteína proCOL11A1.
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que dicho anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 es el anticuerpo monoclonal 1E8.33.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que comprende, además, la detección y/o cuantificación del complejo anticuerpo-proteína proCOL11A1 formado.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la detección y/o cuantificación del complejo anticuerpo-proteína proCOL11A1 formado se lleva a cabo mediante una técnica seleccionada del grupo formado por Western-blot, ELISA, RIA, EIA competitivo, DAS-ELISA, técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas de detección multiplex basadas en el empleo de microsferas, biochips o microarrays de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, o ensayos basados en precipitación coloidal.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que la detección de la proteína proCOL11A1 se lleva a cabo mediante un análisis inmunohistoquímico.
- 5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha recidiva es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*,  
10 carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.
- 15 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.
14. Un método para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de  
20 mama para un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama mediante un método que permita asegurar la extirpación completa de la lesión y el tratamiento farmacológico preventivo para evitar la recidiva, así como el seguimiento exhaustivo de la progresión de la lesión, que permita detectar precozmente la posible recidiva, que comprende
- 25
- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, la presencia de la proteína proCOL11A1; o
  - comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha  
30 muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;
- en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento:
- 35
- si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o

- si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

5 15. Un método para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama para un tratamiento seleccionado entre un tratamiento que comprende la extirpación de dicha lesión papilar de mama por cirugía conservadora y un tratamiento que comprende la no extirpación de dicha lesión papilar de mama, que comprende

10

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o

15

- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

en donde dicho sujeto es seleccionado para dicho tratamiento:

20

- si no se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o

25

- si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama es igual o inferior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

16. Un método para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, que comprende

30

- detectar en una muestra de un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama la presencia de la proteína proCOL11A1; o

35

- comparar el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra con el nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en una muestra control;

en donde dicho tratamiento se selecciona entre un tratamiento farmacológico, un tratamiento que comprende la extirpación quirúrgica de dicha lesión papilar de mama, y una combinación de los mismos,

5 en donde se selecciona dicho tratamiento:

- si se detecta la presencia de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama; o

10 - si el nivel de expresión de la proteína proCOL11A1 en dicha muestra del sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, es superior al nivel de expresión de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control.

15 17. Uso de la proteína proCOL11A1 como marcador para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

20 18. Uso de la proteína proCOL11A1 según la reivindicación 17, como marcador para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en donde dicha recidiva es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama.

25 19. Uso de la proteína proCOL11A1 según la reivindicación 17 ó 18, como marcador para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en donde dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar, carcinoma inflamatorio,  
30 carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

20. Uso de la proteína proCOL11A1 según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, en el que dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

35 21. Uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1, en el que dicho anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la

proteína proCOL11A1, como marcador para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de

5

22. Uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1 según la reivindicación 21, como marcador para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en donde dicha recidiva es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama.

10

23. Uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1 según la reivindicación 21 ó 22, como marcador para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en donde dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.

15

20

24. Uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1 según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23, en el que dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.

25

25. Uso de un anticuerpo específico que reconoce la proteína proCOL11A1 según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que dicho anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 es el anticuerpo monoclonal 1E8.33.

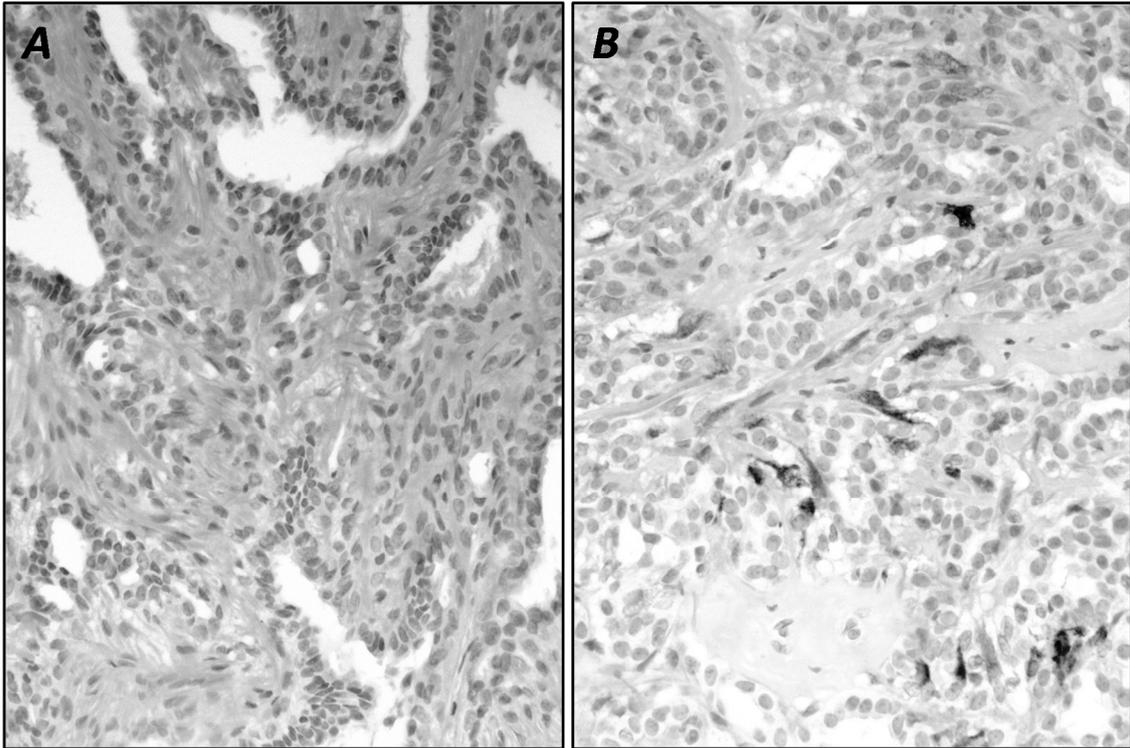
30

26. Uso de un kit que comprende un reactivo que reconoce la proteína proCOL11A1, en donde dicho reactivo que reconoce la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 que reconoce un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la proteína proCOL11A1, o de un reactivo para la detección y/o cuantificación de la expresión del gen col11a1, en el que dicho reactivo para la detección del gen col11a1 comprende una pareja de oligonucleótidos cebadores que amplifican específicamente una región del gen col11a1, en donde dicha pareja de oligonucleótidos cebadores comprende los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, para pronosticar la evolución clínica, o para predecir el

35

riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama, o para seleccionar un tratamiento para un sujeto diagnosticado de una lesión papilar de mama.

- 5 27. Uso de un kit según la reivindicación 26, para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en donde dicha recidiva es una recidiva en un tumor o carcinoma de mama.
- 10 28. Uso de un kit según la reivindicación 26 ó 27, para predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, en donde dicha recidiva es una recidiva en adenocarcinoma ductal, carcinoma ductal *in situ*, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular o lobulillar, carcinoma lobular *in situ*, carcinoma lobular invasivo, carcinoma tubular, carcinoma medular, carcinoma mucinoso o coloidal, carcinoma papilar, carcinoma inflamatorio, carcinoma cribiforme, cáncer de Paget, cáncer de mama invasivo o cáncer de mama metastásico.
- 15 29. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 28, en el que dicha lesión papilar de mama es un papiloma intraductal de mama.
- 20 30. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 26 a 29, en el que dicho anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 es el anticuerpo monoclonal 1E8.33.



**Fig. 1**

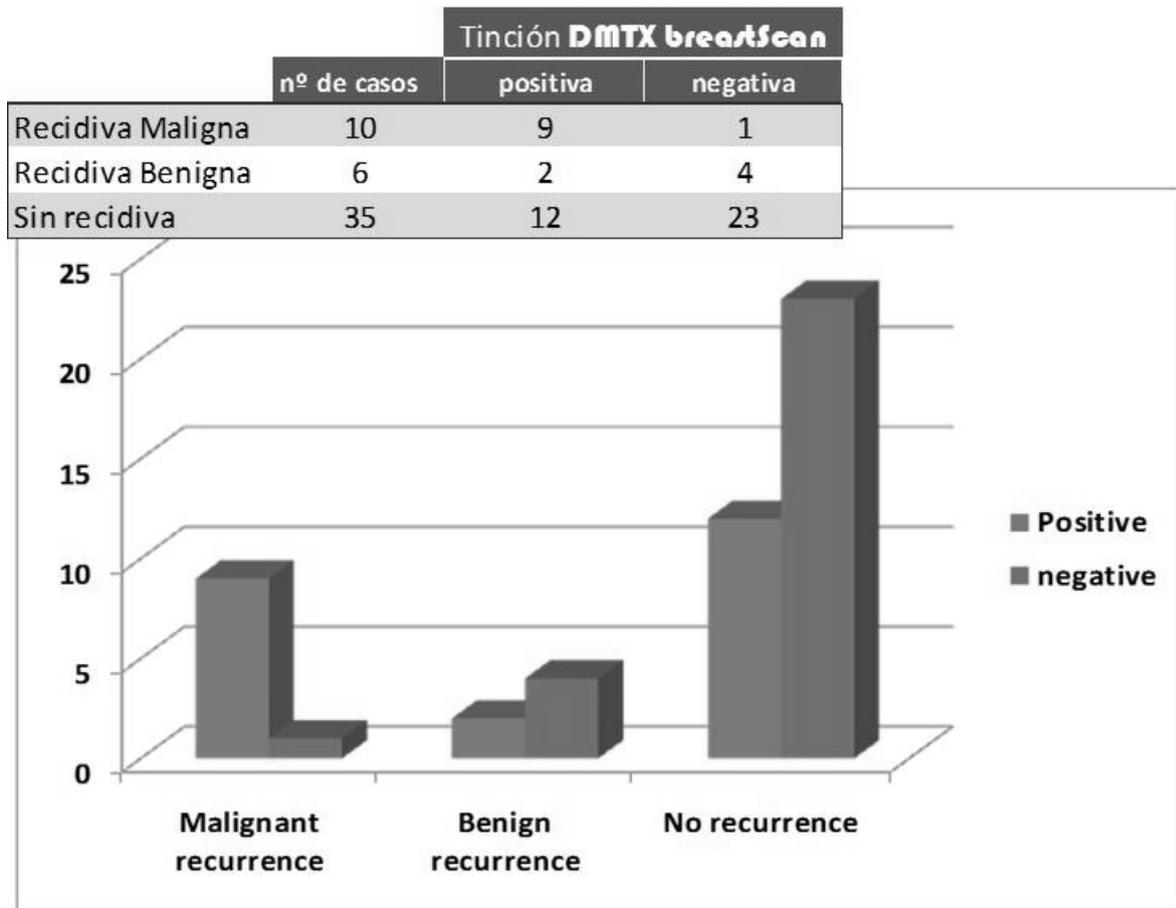


Fig. 2

Listado de Secuencias

<110> ONCOMATRIX, S.L.

<120> MÉTODOS Y PRODUCTOS PARA PRONOSTICAR LA EVOLUCIÓN CLÍNICA O PREDECIR EL RIESGO DE RECIDIVA DE UNA LESIÓN PAPILAR DE MAMA

<130> P9308ES00

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleótido cebador específico sentido del gen col11a1

<400> 1  
 tggatgatcag aatcagaagt tcg 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> oligonucleótido cebador específico antisentido del gen col11a1

<400> 2  
 aggagagttg agaattggga atc 23



②① N.º solicitud: 201330179

②② Fecha de presentación de la solicitud: 12.02.2013

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	GARCIA PRAVIA C. et al. Anti-pro COLL11A1, a new marker of infiltrating breast cancer. ESSR Abstract 2009. British Journal of Surgery. 2009. Vol. 96(S5), páginas: 1-72, página 11, abstract O-05-4.	1-30
X	GARCIA OCAÑA M. et al. Characterization of a novel mouse monoclonal antibody, clone 1E8.33, highly specific for human procollagen 11A1, a tumor-associated stromal component. International Journal of Oncology. 2012, Vol. 40, páginas:1447-1454, página 1447, columnas 1-2; página 1452, columna 1, Figura 5; página 1452, columna 1.	1-30
A	KLEIN A. et al. Comparison of gene expression data from human and mouse breast cancers: Identification of a conserved breast tumor gene set. International Journal of Cancer. 2007, Vol. 121, páginas: 683-688, página 683, abstract; página 684, Figura 1; página 685, columna 2.	1-30
A	ZHAO Y. et al. A Potential Role of Collagens Expression in Distinguishing Between Premalignant and Malignant Lesions in Stomach. The Anatomical Record. 2009. Vol. 292, páginas: 692-700, todo el documento.	1-30
A	FISCHER H. et al. Colorectal carcinogénesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. Carcinogénesis. 2001. Vol. 22(6), páginas: 875-878.	1-30

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
31.07.2014

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/5

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**G01N33/574** (2006.01)

**G01N33/50** (2006.01)

**G01N33/68** (2006.01)

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.07.2014

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-30	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-30	<b>NO</b>

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	GARCIA PRAVIA C. et al. ESSR Abstract 2009. British Journal of Surgery. 2009. Vol. 96(S5), páginas: 1-72.	2009
D02	GARCIA OCAÑA M. et al. International Journal of Oncology. 2012, Vol. 40, páginas: 1447-1454.	2012
D03	KLEIN A. et al. International Journal of Cancer. 2007, Vol. 121, páginas: 683-688.	2007
D04	ZHAO Y. et al. The Anatomical Record. 2009. Vol. 292, páginas: 692-700.	2009
D05	FISCHER H. et al. Carcinogénesis. 2001. Vol. 22(6), páginas: 875-878.	2001

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

La presente invención divulga un método *in vitro*, para pronosticar la evolución clínica y predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama, basado en la expresión de la proteína proCOL11A1 en una muestra biológica (reivindicaciones 1-20). Se refiere también al uso de un anticuerpo y de un kit para detección específica de la proteína proCOL11A1 (reivindicaciones 21-30).

El documento D01 divulga un anticuerpo policlonal anti-proCOL11A1 como nuevo marcador de diagnóstico de cáncer de mama (ver página 11, abstract O-05-4).

El documento D02 divulga un anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 como nuevo marcador para diagnóstico de diferentes tipos de cáncer (ver página 1447, columnas 1-2; página 1452, columna 1, Figure 5; página 1452, columna 1).

El documento D03 divulga un estudio comparativo del perfil de expresión génica de tumores de mama de origen humano y murino, identificando genes homólogos y determinando su perfil de expresión, frente a sus respectivos controles, en 24 tumores de mama humanos y 6 tumores de mama de ratón (ver página 683, abstract; página 684, Figura 1; página 685, columna 2).

El documento D04 divulga los genes *col11a1* y *col1a1* como marcadores del cáncer de estómago en fases premaligna y maligna. Este documento se refiere a un estudio realizado con muestras de lesiones de estómago y muestras de tejido sano, utilizando el mRNA extraído de las muestras en ensayos de *arrays* de oligonucleótidos (ver todo el documento).

El documento D05 divulga la asociación entre la carcinogénesis colorrectal y la expresión de los genes *col11a1* y *col5a2* en el estroma gastrointestinal. Este documento se refiere a un estudio realizado con muestras procedentes de pacientes con carcinoma colorrectal empleando como control muestras de epitelio de colon de individuos adultos que no padecen la enfermedad (ver todo el documento).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)****1.1. REIVINDICACIONES 1-30**

El objeto técnico de la presente invención es un método *in vitro* para pronosticar la evolución clínica y predecir el riesgo de recidiva de una lesión papilar de mama basado en la expresión de la proteína proCOL11A1, en una muestra biológica.

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un anticuerpo policlonal anti-proCOL11A1 como nuevo marcador de diagnóstico de cáncer de mama. Por otra parte, el documento D02 anticipa un anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 como marcador para diagnóstico de diferentes tipos de cáncer entre los que también cita cáncer de mama. La diferencia entre los documentos citados y el objeto técnico de la invención radica en que la invención se refiere explícitamente a la evolución clínica de una lesión papilar de mama, lo que no ha sido encontrado en el estado de la técnica.

En consecuencia, según lo divulgado en D01 y D02, la reivindicaciones 1-30 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

Sin embargo, siendo conocido el uso de esta proteína como marcador de diferentes tipos de cáncer de mama, se considera que sería obvio para un experto en la materia el uso de este marcador para diagnóstico de otros tipos de lesiones de mama relacionadas con una evolución cancerígena; así como también sería obvio el uso de un anticuerpo y de un kit para detección específica de la proteína proCOL11A1, empleando técnicas y aplicaciones de análisis de datos de uso corriente en microbiología.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-30 no cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D03-D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.