

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 362**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2008 E 08839097 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2201138**

54 Título: **Clasificación, estadificación y pronóstico del cáncer mediante el uso de osteopontina-C**

30 Prioridad:

16.10.2007 US 980379 P

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

19.06.2015

73 Titular/es:

VENTANA MEDICAL SYSTEMS, INC. (50.0%)

1910 E. Innovation Park Drive

Tucson, Arizona 85755, US y

UNIVERSITY OF CINCINNATI (50.0%)

72 Inventor/es:

MIRZA, MANA;

SHAUGHNESSY, ELIZABETH;

HURLEY, JOHN K.;

VANPATTEN, KRISTIE A.;

PESTANO, GARY y

WEBER, GEORG F.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 538 362 T3

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

DESCRIPCIÓN

Clasificación, estadificación y pronóstico del cáncer mediante el uso de osteopontina-C

5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

Esta solicitud de patente se refiere a métodos para clasificar, estadificar y pronosticar cánceres como el de mama, por ejemplo el carcinoma ductal in situ (DCIS) o el carcinoma lobular in situ (LCIS), y a kits utilizables para tales métodos.

10

ANTECEDENTES

Aproximadamente el 20% de las mujeres sometidas a procedimientos de biopsias mamarias son diagnosticadas de cáncer de mama en base a una evaluación histológica convencional. La mayor parte de biopsias se obtiene con una aguja gruesa de punción y aspiración, y en caso de error de muestreo o de interpretación se puede infravalorar la enfermedad detectada. Además las fases iniciales de cáncer de mama (carcinoma ductal in situ (DCIS) o carcinoma lobular in situ (LCIS)) son difícilmente diferenciables, por una parte, de los crecimientos benignos y; por otra, de los cánceres invasivos. Hay un 30-50% de riesgo de que el DCIS, si no se trata, progrese hasta un carcinoma mamario. Actualmente no se dispone de marcadores moleculares para identificar esta fracción de DCIS de alto riesgo. Esto dificulta la decisión de si el paciente debe tratado con lumpectomía, lumpectomía más radiación o terapia hormonal, o resección total de la mama. Aunque la investigación ha identificado un gran número de biomoléculas que están desreguladas o son defectuosas en el cáncer de mama, relativamente pocas de ellas se usan de manera general en el diagnóstico histológico. En concreto no se han establecido firmemente marcadores que predigan la invasividad. Se necesitan mejores predictores moleculares de la progresión, a fin de facilitar las decisiones racionales sobre los tratamientos.

25

Para el diagnóstico del cáncer de mama se utilizan generalmente varios marcadores. Los marcadores tumorales CA15.3, CA27.29 y CEA aprobados por la U.S. Food and Drug Administration y recomendados por la ASCO son útiles para controlar la terapia del cáncer de mama avanzado o su recurrencia. Estos marcadores séricos todavía carecen de la adecuada sensibilidad (inferior al 25%) y especificidad (inferior al 70%) para ser aplicables a la detección del carcinoma mamario en fase temprana en una gran población [1,2]. El receptor de estrógeno (ER) y el receptor de progesterona (PR) facilitan las decisiones sobre la terapia, pero son medidas de pronóstico débil [2-4]. La sobreexpresión del HER2 se asocia a un mal pronóstico, pero este mecanismo solo existe aproximadamente en un tercio de los cánceres de mama.

35

Se están estudiando algunos marcadores tumorales como predictores de la progresión del cáncer de mama. El transcrito y la proteína del represor transcripcional EZH2 del grupo Polycomb son persistentemente elevados en el carcinoma mamario invasivo, en comparación con los epitelios mamarios normales. Los niveles de proteína EZH2 se relacionan considerablemente con la agresividad del cáncer de mama [5]. El VEGF está fuertemente relacionado con la uPA en la población nodo-positiva. Los pacientes con altos niveles de VEGF presentan malos resultados, con mayor riesgo de subcategoría nodo-positiva. Además los carcinomas ductales infiltrantes expresan mayores niveles de uPA y VEGF que los carcinomas intralobulares [6]. Hay múltiples líneas celulares malignas de cáncer de mama que sobreexpresan el gen metastásico de osteopontina y la transfección de este gen en líneas celulares benignas de epitelio tumorígeno de mama trasmite un comportamiento invasivo [7]. Por tanto la osteopontina se ha identificado como un marcador de pronóstico relacionado con la supervivencia del paciente. No obstante la osteopontina también puede encontrarse en tejido no tumoral y en el plasma de individuos sanos [8, 9].

40

45

La osteopontina puede servir como una citocina y como una molécula de matriz extracelular. Puede favorecer la migración y proteger de la muerte celular programada después de unirse a ciertos receptores de integrina o a una variante de CD44 en la superficie celular. Las funciones biológicas de los productos genéticos relacionados con la metástasis son reguladas ampliamente a los niveles postranscripcionales y postranslacionales [10]. Por consiguiente la osteopontina secretada por varias células tiene diferentes características estructurales [11, 12] y las formas de osteopontina derivadas de tumores son más pequeñas que la osteopontina secretada por células no transformadas [13]. Los transcritos de tres variantes de empalme de osteopontina se expresan en líneas celulares de tumores de mama invasivos, pero no en líneas celulares de tumores de mama no invasivos [14].

50

55

El empalme alternativo de osteopontina tiene lugar en la secuencia anterior al dominio central de fijación de integrina y al dominio C-terminal de fijación de CD44. La osteopontina-b carece del exón 5 y la osteopontina-c del exón 4.

60 RESUMEN

A pesar de que la adquisición de invasividad es una etapa crítica en los carcinomas mamarios en fase temprana (tales como CIS) ninguno de los marcadores moleculares establecidos identifican de manera fiable la progresión del tumor. El gen metastásico de osteopontina (OPN) está sujeto a empalmes alternativos que producen tres mensajes, osteopontina-a (OPN-a), osteopontina-b (OPN-b) y osteopontina-c (OPN-c). Aquí se demuestra que la OPN-c es un biomarcador del cáncer de mama. El mensaje de ARN para OPN-c estuvo presente en 16 de 20 cánceres (80%),

65

pero fue indetectable en 22 muestras normales obtenidas de mamoplastia reductora. En cambio el ARN de OPN-a se expresó a varios niveles en 20 cánceres mamarios, once tejidos circundantes de tumor y 21 muestras normales. La variante de empalme OPN-b estuvo presente a niveles apenas detectables en 18 de 20 cánceres y en seis de 22 mamas normales. Por inmunohistoquímica resultaron negativas 66 de 69 mamas normales y tres mostraron un bajo nivel de tinción. Entre los cánceres de mama, 43 de 56 biopsias con aguja gruesa (77%) dieron tinción positiva de OPN-c. Correlacionada con el grado tumoral, la tinción de OPN-c aumentó de grado 1 a grado 3. La OPN-c detecta una mayor proporción de cánceres mamarios que el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) o el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En 178 muestras de mama analizadas la OPN-c estuvo presente en el 78% de los cánceres, el 36% de tejidos circundantes y el 0% de tejidos normales. Por tanto la OPN-c puede servir como marcador selectivo para diagnosticar y pronosticar el cáncer de mama. También se puede usar en un panel diagnóstico junto con marcadores convencionales de cánceres mamarios como ER, PR y HER2.

En base a estas observaciones se ofrecen métodos para clasificar el cáncer de mama (como el CIS) de un paciente. El método incluye la detección o la medición de OPN-c en una muestra de mama, donde la presencia de niveles relativamente altos de OPN-c indica que el paciente tiene un mayor grado (p.ej. una forma más agresiva) de cáncer de mama, tal como uno de grado 3. En cambio, cuando en la mama o en otra muestra de cáncer se detectan niveles relativamente bajos de OPN-c, esto indica que el paciente tiene un menor grado (p.ej. una forma menos agresiva) de cáncer de mama, como por ejemplo de grado 1. En algunos ejemplos de esta exposición la referencia a los grados de tumoración (es decir, según la escala 1-3) está basada en el sistema Scarff-Bloom-Richardson [15]. Sin embargo un experto en la materia apreciará que se pueden emplear otros métodos y que la calificación puede variar entre muestras o con el uso de diferentes reactivos de detección. La detección de una cantidad mayor de OPN-c (p.ej. 3 en una escala de 0 a 3) indica que el paciente tiene un mayor grado (p.ej. una forma más agresiva) de cáncer de mama, tal como uno de grado 3, mientras que si la cantidad de OPN-c detectada es menor (p.ej. 1 en una escala de 0 a 3), indica que el paciente tiene un menor grado (p.ej. una forma menos agresiva) de cáncer de mama, como por ejemplo de grado 1. Se puede emplear cualquier método de detección que permita detectar proteínas OPN-c (p.ej. utilizando anticuerpos de OPN-c) o moléculas de ácido nucleico de OPN-c (p.ej. utilizando sondas o cebadores de ácido nucleico de OPN-c).

El método también puede incluir la detección o la medición de otros marcadores de cáncer en la muestra, tales como los marcadores de cáncer de mama ER, PR y/o HER2. Por ejemplo, niveles bajos de ER o niveles altos de HER2 y significativamente elevados de OPN-c (en algunas muestras también un PR bajo) en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer mamario de grado 2 o 3, mientras que menores niveles de OPN-c y en algunos casos también menores niveles de HER2 (y en algunos ejemplos, si la muestra es además ER⁺ y/o PR⁺) en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer mamario de grado 1.

Basándose en los resultados del método se puede elegir un protocolo de tratamiento para el paciente. Actualmente no hay ningún régimen de tratamiento particular para un paciente que dé positivo de OPN-c. No obstante, en base a los datos aquí aportados, los pacientes que presentan una forma más agresiva de cáncer de mama o de otro tipo de cáncer (aunque den negativos de ER, PR o HER2, por ejemplo) pueden recibir una terapia más agresiva (una o más entre mastectomía, quimioterapia, radiación) que los pacientes que presentan una forma menos agresiva del cáncer.

En ejemplos concretos el método tiene una sensibilidad de al menos un 80% y una especificidad de al menos un 80%, por ejemplo una sensibilidad de al menos el 90% y una especificidad de al menos el 90%.

Aquí también se revelan kits que pueden usarse para diagnosis, estadificación, clasificación (o sus combinaciones) del cáncer de mama o de otro tipo de cáncer. Por ejemplo, estos kits se pueden utilizar para identificar un paciente que tenga formas más o menos agresivas de cáncer de mama. Los kits pueden incluir o consistir en agentes de fijación específicos (tales como anticuerpos) que se unen a ER, PR, HER2 y OPN-c o a más de ellos.

Los kits pueden incluir o consistir en sondas o cebadores de ácidos nucleicos específicos de OPN-c, ER, PR y HER2. Los kits también pueden incluir una o más muestras de control (tales como muestras de control positivas y negativas) cuyos niveles detectables de ER, PR, HER2 y/o OPN-c y/o el grado de cáncer mamario sean conocidos.

Lo expuesto anteriormente y otros objetos y características de esta revelación resultan más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, haciendo referencia a las figuras adjuntas.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

FIGS. 1A-C: expresión de variantes de empalme de OPN en tejido mamario. A) Se analizó ARN por RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de tejido congelado rápidamente. Los datos mostrados son valores medios \pm ESM. El número total de muestras y el número de muestras con niveles indetectables de osteopontina a lo largo de 40 ciclos está indicado por encima de la gráfica. B) Gel de agarosa representativo con los productos de RT-PCR en tiempo real de una muestra de tumor. C) Reproducibilidad de la amplificación por RT-PCR en tiempo real. Se usaron células MDA-MB-435 - conocidas por expresar OPN-a y las variantes de empalme -b y -c [14] - como control para calcular la expresión de las formas de osteopontina en el tejido. La β -actina sirvió de gen de referencia y las tasas de expresión relativa del gen diana se calcularon a partir del ciclo umbral y de las mediciones de eficiencia (Pfaffl,

Nucleic Acids Res 29:e45, 2001). La descongelación repetida del ADNc degrada los mensajes para las variantes de empalme de la osteopontina con mayor rapidez que el mensaje para β -actina. Las muestras de mama se obtuvieron y analizaron durante dos periodos de tiempo interrumpidos por una pausa de varios meses. Las dispersiones de los valores de referencia en cada periodo de tiempo fueron más apretadas que en los intervalos combinados, lo cual refleja probablemente una pequeña influencia de las variaciones entre los lotes de los reactivos empleados para la extracción, transcripción inversa y ampliación del ARN.

FIGS. 2A-C: caracterización de anticuerpos. A) Especificidad de IgY anti-hOPNc. Se inmunizaron gallinas con un péptido que reproduce el empalme de OPN-c humana. Para imitar una secuencia interna se acetiló el N-terminal. Al final del periodo de inmunización se purificó la inmunoglobulina total (IgY) de los huevos y se usó para un análisis Western blot. Panel izquierdo: sobrenadantes de células MCF-7 transfectadas, sondadas con anticuerpo anti-hOPNc (un Western blot anterior de los mismos sobrenadantes había demostrado unos niveles de expresión comparables de OPN-a y -c). Panel derecho: se cargaron 400 ng de GST-OPN por calle, sondada con el anticuerpo anti-hOPNc. La banda adicional en torno a 120 kD suele observarse para la osteopontina y probablemente refleja una forma agregada de la molécula. La pureza de las proteínas de fusión GST-OPN se muestra en el gel de Coomassie. Las osteopontinas-a y -c se amplificaron por PCR, excluyendo el péptido señal (aminoácidos 1-17). Los fragmentos amplificados se subclonaron en vector pGEX-5T y se transformaron en bacterias BL21 para la síntesis proteica. Los marcos de lectura y la fidelidad de la secuencia se confirmaron por análisis de secuenciación. Las proteínas se purificaron de los lisados bacterianos por extracción "pull-down" con GSH-sefarosa. B) Inmunocitoquímica de líneas celulares con niveles de expresión de OPN conocidos. Las células MCF-7 y las células ZR-75 no son invasivas y no expresan osteopontina, las células MDA-MB-435 son metastásicas *in vivo* y expresan las tres variantes de empalme de la osteopontina [14]. C) Tinción de tejido canceroso de mama con el anticuerpo IgY de osteopontina-c (arriba a la izquierda) o con un anticuerpo de conejo para una región común a todas las variantes de empalme (O-17, Assay Designs Inc.) (abajo a la izquierda). Los controles negativos (arriba y abajo a la derecha) reflejan la elaboración sin el anticuerpo primario.

FIGS. 3A-C: expresión de la proteína osteopontina-c en tejido mamario. Las matrices de tejido se tiñeron por inmunohistoquímica y fueron valoradas por un patólogo certificado por el consejo médico oficial. A) Valoraciones patológicas combinadas (intensidad media multiplicada por el porcentaje medio de tejido teñido) de cada muestra de la matriz de mama normal (arriba) y de la matriz de carcinoma mamario (abajo). Obsérvese que la biopsia con la valoración positiva más alta - la número 7 - de la matriz de mama normal se consideró probablemente cancerosa. B) Imágenes representativas (tomadas a 40 aumentos) de la tinción inmunohistoquímica para OPN-c. Se muestran los grados crecientes de carcinoma intraductal, carcinoma lobular infiltrante y adenocarcinoma papilar. El inserto es de una muestra de tejido mamario normal como referencia. Los portaobjetos están contrateñidos con hematoxilina II y Bluing Reagent [*reactivo blanqueador*] (Ventana Medical Systems Inc.). (Ventana Medical Systems Inc.). C) Valoraciones patológicas de tumores de grado creciente (panel izquierdo) o de tumores frente a mamas normales (panel derecho). Se representa la valoración citoplasmática media combinada (fila superior), el porcentaje medio de células positivas (fila intermedia) y la intensidad citoplasmática media (fila inferior). Las barras de error representan el ESM.

FIGS. 4A-C: la OPN-c es un marcador del cáncer mamario más sensible que ER, PR o HER2. A) Valoraciones patológicas de tumores de grado creciente. Se representan las valoraciones medias combinadas para ER (arriba), PR (centro) y HER2 (abajo). Las barras de error representan el ESM. B) Coeficientes de correlación de rango de Spearman (SRCC) y parámetros de confianza asociados, a fin de relacionar la tinción del carcinoma mamario para OPN-c con la tinción observada para ER, PR y HER2 por inmunohistoquímica. Los gráficos de dispersión muestran las valoraciones medias combinadas para la osteopontina-c frente a ER, PR o HER2. C) Probabilidades umbral del mejor modelo de regresión logística para predecir los grados de cáncer mamario 2 o 3 con una combinación de OPN-c, ER y HER2.

LISTA DE SECUENCIAS

Las secuencias de los ácidos nucleicos y aminoácidos de la lista adjunta se indican abreviadamente por las letras estándar empleadas para las bases nucleótidas, tal como se define en 37 C.F.R. 1.822. Solo se muestra una hebra de cada secuencia de ácido nucleico, pero la hebra complementaria se supone incluida por cualquier referencia a la hebra expuesta. En lista adjunta de secuencias:

SEQ ID N°: 1 y 2 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar OPN-a.

SEQ ID N°: 3 y 4 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar OPN-b.

SEQ ID N°: 5 y 6 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar OPN-c.

SEQ ID N°: 7 y 8 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar β -actina.

SEQ ID N°: 9 y 10 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar Ck-19.

SEQ ID N°: 11 y 12 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar aP2.

SEQ ID N°: 13 y 14 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar GAPDH.

5 SEQ ID N°: 15 y 16 son respectivamente ejemplos de cebadores directos e inversos que se pueden usar para amplificar la secuencia codificadora de osteopontina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 Abreviaturas y términos

Las siguientes explicaciones de los términos y métodos sirven para describir mejor la presente revelación y guiar a los expertos en la materia en su práctica. Las formas en singular “un” y “el” se refieren a uno o más de uno, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Por ejemplo, el término “que comprende un anticuerpo” incluye un solo o varios anticuerpos y se considera equivalente a la frase “que comprende al menos un anticuerpo”. El término “o” se refiere a un solo elemento de una enumeración de elementos alternativos o a una combinación de dos o más elementos, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Tal como se emplea aquí, “comprende” significa “incluye”. Por tanto “que comprende A o B” significa “incluyendo A, B, o A y B”, sin excluir elementos adicionales. Los números de acceso a los datos del banco de genes aquí citados son las secuencias disponibles como mínimo desde el 15 de octubre de 2007.

Si no se dice lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados aquí tienen el mismo significado comúnmente entendido por un especialista en la materia a la cual pertenece esta revelación. Aunque en la práctica o en el estudio de la presente revelación se pueden utilizar métodos y materiales similares a los aquí descritos, más abajo se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

CIS: carcinoma in situ

DCIS: carcinoma ductal in situ

30 ER: receptor de estrógeno

HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano

LCIS: carcinoma lobular in situ

OPN: osteopontina

35 PR: receptor de progesterona

Anticuerpo: moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de ellas, es decir moléculas que contienen un sitio de fijación de antígenos que se une específicamente (reacciona inmunológicamente) con un antígeno (tal como OPNc, ER, PR o HER2). Como ejemplos cabe citar los anticuerpos monoclonales, policlonales y humanizados.

40 Un anticuerpo natural (tal como IgG, IgM, IgD) incluye cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Tal como se usa aquí el término anticuerpo también incluye los anticuerpos recombinantes producidos por la expresión de un ácido nucleico que codifica una o más cadenas de anticuerpo en una célula (véanse por ejemplo las patentes U.S. N° 4,745,055; U.S. N° 4,444,487; WO 88/03565; EP 256,654; EP 120,694; EP 125,023; Faoukner y otros, Nature 298:286, 1982; Morrison, J. Immunol. 123:793, 1979; Morrison y otros, Ann Rev. Immunol 2:239, 1984).

El término anticuerpo también incluye un fragmento de un anticuerpo natural o recombinante fijador de un antígeno. Como ejemplos concretos no limitativos de fragmentos fijadores incluidos en el término anticuerpo cabe citar Fab, (Fab')₂, Fv y Fv de cadena sencilla (scFv). Fab es el fragmento que lleva una porción monovalente de una molécula de anticuerpo, fijadora de antígeno, producido por digestión de todo el anticuerpo con el enzima papaína para dar una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada, o de manera equivalente por ingeniería genética. Fab' es el fragmento de una molécula de anticuerpo obtenido por tratamiento de todo el anticuerpo con pepsina, seguido de reducción, para dar una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo. (Fab')₂ es el fragmento del anticuerpo obtenido por tratamiento de todo el anticuerpo con el enzima pepsina sin la subsiguiente reducción, o de manera equivalente por ingeniería genética. (Fab')₂ es un dímero de dos fragmentos FAB' unidos por enlaces disulfuro. Fv es un fragmento producido mediante ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, expresadas como dos cadenas. El anticuerpo de cadena sencilla (“SCA”) es una molécula producida por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada unidas por un polipéptido conector adecuado, y que tiene la forma de una cadena sencilla fusionada genéticamente. Los métodos de producción de estos fragmentos son rutinas del estado técnico.

65 Afinidad de fijación: afinidad de un anticuerpo por un antígeno, por ejemplo la afinidad de un anticuerpo por un péptido OPN-c. En un ejemplo la afinidad se calcula mediante una modificación del método de Scatchard descrita por Frankel y otros, Mol. Immunol., 16:101-106, 1979. En otro ejemplo la afinidad de la fijación se mide mediante una

relación de disociación antígeno/anticuerpo. En otro ejemplo más, una afinidad de fijación alta se mide mediante un radioinmunoensayo competitivo. En varios ejemplos, una afinidad de fijación alta es como mínimo de 1×10^{-8} M aproximadamente. En otro ejemplo una afinidad de fijación alta es al menos $1,5 \times 10^{-8}$, al menos 2×10^{-8} , al menos $2,5 \times 10^{-8}$, al menos 3×10^{-8} , al menos $3,5 \times 10^{-8}$, al menos 4×10^{-8} , al menos $4,5 \times 10^{-8}$ o al menos 5×10^{-8} , aproximadamente.

Cáncer mamario: incluye cualquier tumor de la mama, por ejemplo tumores del tejido mamario epitelial (carcinoma) o estromal (sarcoma). Como ejemplos de cánceres mamarios epiteliales in situ cabe mencionar el DCIS y el LCIS. El carcinoma lobular in situ (LCIS) es un tumor formado por células anormales en el revestimiento de un lóbulo. Los pacientes con LCIS tienen un riesgo elevado de desarrollar cáncer mamario en cada pecho. El carcinoma ductal in situ (DCIS) está formado por células anormales en el revestimiento de un conducto. Se trata de un tumor maligno preinvasivo y también se llama carcinoma intraductal. Las células anormales todavía no se han propagado más allá del conducto y aún no han invadido el tejido mamario circundante. El DCIS se denomina a veces cáncer de mama en fase 0 porque no es invasivo. Como ejemplos de carcinomas mamarios invasivos cabe citar el carcinoma NOS (no especificado de otra manera), el carcinoma lobular, el carcinoma tubular/cribriforme, el carcinoma mucinoso (coloideo), el carcinoma medular, el carcinoma papilar y el carcinoma metaplástico. Como ejemplo de sarcoma de mama cabe citar el tumor filodes.

Contacto: poner un agente muy próximo a otro agente, permitiendo así que ambos interactúen. Por ejemplo, un anticuerpo se puede aplicar sobre un portaobjetos de un microscopio u otra superficie que contenga una muestra biológica, permitiendo así la detección de una o más proteínas de la muestra que sean específicas del anticuerpo.

Detectar: determinar sin un agente está presente o ausente. En algunos ejemplos puede incluir la cuantificación. Por ejemplo, el uso de un anticuerpo específico para una proteína particular (p.ej. OPN-c, ER, PR o HER2) permite detectarla en una muestra que contenga por ejemplo tejido canceroso de mama. En ejemplos concretos se detecta una emisión de señal procedente de un fluoróforo (por ejemplo un incremento de la señal).

La detección puede tener lugar en grandes cantidades, observando simultáneamente un número macroscópico de moléculas (al menos por ejemplo 1023 moléculas). La detección también puede incluir la identificación de señales procedentes de moléculas individuales mediante el uso de microscopia y técnicas tales como la reflexión interna total para reducir el ruido de fondo.

Receptor de estrógeno (ER): un miembro de la familia de hormonas nucleares de receptores intracelulares que es activado por el 17β -estradiol. Los receptores de estrógeno, tales como ER α , están sobreexpresados en alrededor del 70% de los casos de cáncer de mama, lo cual se designa como "ER positivo" (ER+). Hay dos formas diferentes del receptor de estrógeno, denominadas usualmente α y β , cada una codificada por un gen separado (ESR1 y ESR2 respectivamente). El ER α (OMIM 133430), expresado por el gen ESR1, se encuentra en el endometrio, en células de cáncer de mama, en células del estroma ovárico y en el hipotálamo. Así, en ejemplos concretos, el ER se refiere a la forma ER α encontrada en las células de cáncer de mama.

Las secuencias del receptor de estrógeno están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números BC128574.1 (ácido nucleico) y P03372.2 (proteína) revelan secuencias de ER α humano y los números NM_007956.4 (ácido nucleico) y P19785.1 (proteína) revelan secuencias de ER α murino. En un ejemplo, una secuencia de ER incluye una secuencia completa de tipo natural (o nativa) y variantes (p.ej. polimorfismos) encontradas en células de cáncer de mama. En algunos ejemplos el ER tiene una secuencia al menos 80% idéntica, por ejemplo al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a un ER α nativo (tal como la secuencia de los números de acceso P03372.2, BC128574.1, NM_007956.4 y P19785.1 al banco de genes) y retiene la actividad del ER α nativo (expresado p.ej. en células de cáncer de mama). En otros ejemplos, una secuencia de ácido nucleico de ER tiene una secuencia que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia publicada en el número de acceso BC 128574.1 o NM_007956.4 del banco de genes y se expresa en células de cáncer de mama.

Clasificación del cáncer: un cáncer se puede clasificar según su nivel de diferenciación. A menor número, menor grado y velocidad de crecimiento del cáncer. Los cánceres suelen clasificarse en una escala de 1 a 3. El grado 1 indica que las células cancerosas son parecidas a las normales y que el cáncer es probablemente menos agresivo. El grado 2 indica que las células tienen una apariencia displásica y mayor probabilidad de ser agresivas y crecer con rapidez. Las células cancerosas de grado 3 son altamente displásicas y tienen mayor probabilidad de crecimiento muy agresivo.

Factor de crecimiento epidérmico humano (HER2): es un miembro de la familia proteica ErbB, que es un proto-oncogén. En humanos el gen HER2 está localizado en el brazo largo del cromosoma humano 17(17q11.2-q12). Aproximadamente el 25-30% de cánceres de mama tienen una amplificación del gen HER2/neu o la sobreexpresión de su producto proteico, designado como "HER2 positivo" (HER2+). Los pacientes con HER2+ pueden recibir el anticuerpo monoclonal trastuzumab (Herceptin) como terapia para el cáncer de mama. La sobreexpresión del HER2 en el cáncer de mama se ha relacionado con una mayor recurrencia de la enfermedad y un peor pronóstico.

Las secuencias del HER2 están disponibles públicamente. Así, por ejemplo, los números de acceso al banco de genes NM_001005862.1 y NM_004448.2 (ácido nucleico) y NP_001005862.1 y NP_004439.2 (proteína) revelan secuencias de HER2 humanas. En un ejemplo, una secuencia de HER2 incluye una secuencia completa de tipo natural (o nativa) y variantes (p.ej. polimorfismos) encontradas en células de cáncer de mama. En algunos ejemplos el HER2 tiene una secuencia al menos 80% idéntica, por ejemplo al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a un HER2 nativo (tal como la secuencia de los números de acceso NM_001005862.1, NM_004448.2, NP_001005862.1 y NP_004439.2 al banco de genes) y retiene la actividad del HER2 nativo. En otros ejemplos una secuencia de ácido nucleico de HER2 tiene una secuencia que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia publicada en el número de acceso NM_001005862.1 o NM_004448.2 del banco de genes y retiene la actividad del HER2.

Marcador: un agente capaz de detectar, por ejemplo por espectrofotometría, citometría de flujo o microscopia. Por ejemplo, uno o más marcadores pueden estar unidos a un anticuerpo, permitiendo la detección de la proteína diana. En otro ejemplo uno o más marcadores pueden ir unidos a una sonda de ácido nucleico, permitiendo la detección de la molécula de ácido nucleico diana. Como ejemplos de marcadores cabe citar los isótopos radiactivos, fluoróforos, ligandos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y combinaciones de los mismos.

Células o tejido normales: células y tejido no tumoral, no malignos.

Moléculas de ácido nucleico: un desoxirribonucleótido o ribonucleótido polímero, incluyendo sin limitación ADNc, ARNm, ADN genómico y ADN sintético (por ejemplo sintetizado químicamente). La molécula de ácido nucleico puede ser de hebra doble o sencilla. Si es de hebra sencilla, la molécula de ácido nucleico puede ser de cadena homsentido o antisentido. Además la molécula de ácido nucleico puede ser circular o lineal. La revelación incluye métodos que detectan moléculas de ácido nucleico de OPN-c, ER, PR y HER2.

Osteopontina-c (OPN-c): la osteopontina es una glicoproteína fosforilada multifuncional que está expresada a niveles elevados en los tumores, incluyendo los de mama. Se han identificado varias variantes de empalme de OPN, incluyendo OPN-a (secuencia nativa), OPN-b (secuencia truncada) y OPN-c (secuencia truncada). La OPN-c carece del exón 4 (27 aminoácidos) en la región NH₂-terminal de la secuencia madura. La OPN-c carece del dominio reactivo de transglutaminasa (Gly-XGly) que puede mediar en la reticulación covalente homodímera, así como en la formación de heterodímeros con otros componentes de la matriz (como la fibronectina).

Las secuencias de OPN-c están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso al banco de genes D28761 (ácido nucleico) y BAA05951 (proteína) revelan secuencias de OPN-c humanas. En un ejemplo, una secuencia de OPN-c incluye una secuencia de tipo natural (o nativa) y variantes (p.ej. polimorfismos) de OPN-c expresadas en células de cáncer de mama. En algunos ejemplos la OPN-c tiene una secuencia al menos 80% idéntica, por ejemplo al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a una OPN-c nativa (tal como la secuencia de los números de acceso D28761 y BAA05951 al banco de genes). En otros ejemplos una secuencia de ácido nucleico de OPN-c tiene una secuencia que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia publicada en el número de acceso D28761 del banco de genes y retiene la actividad de la OPN-c.

Cebador: moléculas cortas de ácido nucleico, por ejemplo oligonucleótidos de ADN con una longitud de 10 - 100 nucleótidos, por ejemplo de 15, 20, 25, 30 o 50 o más nucleótidos de longitud aproximadamente, como el número de nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico de OPNc, ER, PR o HER2 (p.ej. una secuencia de gen, ADNc o ARNm). Los cebadores se pueden aparear con una hebra complementaria de ADN diana por hibridación de ácidos nucleicos, a fin de formar un híbrido entre el cebador y la hebra de ADN diana. Se pueden emplear pares de cebadores para amplificar una secuencia de ácido nucleico por PCR u otros métodos de amplificación de ácidos nucleicos conocidos en el estado técnico.

Hay métodos para preparar y usar cebadores de ácido nucleico descritos por ejemplo en Sambrook y otros (In Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSHL, Nueva York, 1989), Ausubel y otros (ed.) (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1998), e Innis y otros (PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1990). Los pares de cebadores de PCR se pueden derivar de una secuencia conocida, utilizando por ejemplo programas de ordenador ideados para este fin, tales como Primer (Versión 0.5, © 1991, Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). El especialista en la materia ya sabe que la especificidad de un cebador particular aumenta con su longitud.

Según un ejemplo, un cebador incluye al menos 15 nucleótidos consecutivos de una molécula de ácido nucleico de OPNc, ER, PR o HER2, por ejemplo al menos 18 nucleótidos consecutivos, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia nucleótida de OPNc, ER, PR o HER2. Estos cebadores se pueden usar para amplificar OPNc, ER, PR o HER2, por ejemplo mediante PCR.

Sonda: secuencia corta de nucleótidos, por ejemplo con una longitud de al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 21, al menos 25 o al menos 30 nucleótidos (p.ej. de 8 a 40 o de 10 a 30 nucleótidos), utilizada para detectar la presencia de una secuencia complementaria (tal como una secuencia de ácido nucleico de OPNc,

ER, PR o HER2), por ejemplo mediante hibridación molecular. Idealmente una sonda específica de una secuencia particular de ácido nucleico (p.ej. una secuencia de OPNc) no se hibrida significativamente con otras secuencias de ácido nucleico (p.ej. con secuencias que no sean de OPNc) en condiciones muy estrictas. En ejemplos concretos las sondas oligonucleótidas incluyen un marcador que permite detectar complejos de hibridación sonda oligonucleótida: secuencia diana. Por ejemplo, una sonda oligonucleótida puede incluir estas cantidades de nucleótidos contiguos de una molécula de ácido nucleico de OPNc, ER, PR o HER2 (p.ej. una secuencia de gen, ADNc o ARNm) junto con un marcador detectable. Este tipo de sonda oligonucleótida se puede usar para detectar la presencia de la molécula de ácido nucleico de OPNc, ER, PR o HER2 en una muestra.

Receptor de progesterona (PR): un receptor esteroide intracelular que fija específicamente progesterona. Los receptores de progesterona están sobreexpresados en algunos cánceres de mama, lo cual se designa como "PR positivo" (PR+).

El término receptor de progesterona (OMIM: 607311) incluye los genes receptores de progesterona (PGR) que se encuentran en los mamíferos y retienen la actividad biológica de recepción de progesterona. Las secuencias del receptor de progesterona están disponibles públicamente. Por ejemplo, los números de acceso al banco de genes AF016381.1 (ácido nucleico) y AAD01587.1 (proteína) revelan secuencias de PR humano y los números M68915.1 (ácido nucleico) y AAA39971.1 (proteína) revelan secuencias de PR murino. Según un ejemplo, una secuencia de PR incluye una secuencia completa natural (o nativa), así como variantes de PR (p.ej. polimorfismos) que retienen la función biológica del PR (p.ej. la capacidad de fijar progesterona). En algunos ejemplos el PR tiene una secuencia al menos 80% idéntica, por ejemplo al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 98% idéntica a un PR nativo (tal como la secuencia de los números de acceso AF016381.1, AAD01587.1, M68915.1 y AAA39971.1 al banco de genes) y retiene la actividad del PR. En otros ejemplos una secuencia de ácido nucleico de PR tiene una secuencia que se hibrida en condiciones muy rigurosas con una secuencia publicada en el número de acceso AF016381.1 o M68915.1 al banco de genes y retiene la actividad del PR.

Cuantificar: expresar como cantidad numérica, ya sea absoluta o relativa.

Muestra: espécimen biológico que contiene ADN genómico, ARN (incluyendo ARNm), proteína o combinaciones de ellos, obtenido de un sujeto. Como ejemplo cabe citar, sin limitaciones, sangre periférica, orina, saliva, tejido de una biopsia, muestra quirúrgica y material de autopsia. En algunos ejemplos la muestra proviene de tejido obtenido de un sujeto afectado de cáncer o sospechoso de tenerlo. Según un ejemplo, una muestra incluye tejido mamario como el obtenido mediante una biopsia con aguja, una lumpectomía o una mastectomía. Las muestras de tejido se pueden poner en portaobjetos de microscopio. En determinados ejemplos las muestras se utilizan directamente o se pueden manipular antes de usarlas, por ejemplo fijándolas (p.ej. con formalina) o embebiéndolas (p.ej. en plástico o en parafina).

Agente de fijación específico: un agente que solo se une esencialmente a una diana definida. Así, un agente de fijación específico de OPN-c es el que se une esencialmente a un péptido o a una molécula de ácido nucleico de OPN-c. En un ejemplo, el agente de fijación específico es un anticuerpo que se une selectivamente a un péptido de OPN-c.

El término "se une específicamente", respecto a un antígeno como la OPN-c, se refiere a la asociación preferente, total o parcial, de un anticuerpo o de otro agente de fijación específico al antígeno y no a otros antígenos. Entre un agente de fijación específico y un antígeno no diana puede haber cierto grado de interacción no específica. Sin embargo la unión específica se puede distinguir como mediada por el reconocimiento específico del antígeno. El resultado de la fijación específica es una asociación más importante entre el anticuerpo (u otro agente de fijación específico) y el antígeno que entre el anticuerpo y un no antígeno. En la fijación específica la cantidad de anticuerpo o de otro agente de fijación específico unido al antígeno es normalmente mayor del doble, por ejemplo superior a 5 veces, superior a 10 veces o superior a 100 veces, en comparación con la unión a un antígeno no específico.

Para determinar si un agente concreto se une esencialmente solo a OPN-c o a otra proteína (p.ej. ER, PR o HER2) pueden utilizarse o adaptarse procedimientos rutinarios. Por ejemplo, se puede realizar un análisis Western blot para determinar si un agente de fijación específico, tal como un anticuerpo, se une esencialmente solo a la proteína (solo esencialmente a OPN-c, pero no a otras proteínas en una célula de cáncer de mama) (véase por ejemplo Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*. 1988). Hay varios formatos de inmunoensayo apropiados para seleccionar anticuerpos u otro agente de fijación específico que den una reacción inmunológica específica con una proteína concreta (tal como la OPN-c). Por ejemplo, los inmunoensayos de fase sólida ELISA se usan rutinariamente para seleccionar anticuerpos monoclonales específicamente inmunorreactivos con una proteína.

Estadificación del cáncer: un cáncer como el mamario se puede estadificar para describir su extensión o gravedad en base a la extensión del tumor original (primario) y la propagación alcanzada en el cuerpo. La estadificación tiene en cuenta el tumor primario (T), los ganglios linfáticos regionales (N) y las metástasis distantes (M). El tamaño del tumor primario y la extensión de la metástasis a los ganglios linfáticos regionales se valoran usualmente en una escala de 0 a 4. Las metástasis se estadifican como 0 (ausencia de metástasis) o 1 (presencia de metástasis). Los números bajos indican tumores que se han diseminado poco, mientras que los números altos se refieren a tumores

que se han diseminado extensamente. La clasificación TNM es la utilizada con mayor frecuencia (véase el AJCC Staging Manual) y en ella T describe el tamaño del tumor y si ha invadido tejido cercano, N describe cualquier ganglio linfático involucrado y M describe la metástasis (propagación del cáncer de una a otra parte del cuerpo). No obstante hay otros sistemas de clasificación para estadificar el cáncer que caen dentro del alcance de esta revelación.

En ejemplos concretos las fases del cáncer de mama son los siguientes: fase 0 - carcinoma in situ; fase I – el tumor (T) no involucra a ganglios linfáticos axilares (N); fase IIA - T 2-5 cm, N negativo, o T < 2 cm y N positivo; fase IIB -T > 5 cm, N negativo, o T 2-5 cm y N positivo (< 4 ganglios axilares); fase IIIA - T > 5 cm, N positivo o T 2-5 cm con 4 o más ganglios axilares; fase IIIB - T ha penetrado la pared o la piel torácica y se puede haber diseminado a < 10 N axilares; fase IIIC - T tiene > 10 N axilares o más N supraclaviculares o infraclaviculares, o N mamaros internos; y fase IV – metástasis distante (M).

Sujeto: organismos vivos multicelulares vertebrados, una categoría que incluye mamíferos humanos y no humanos tales como los pacientes veterinarios. Según un ejemplo concreto, un paciente es un sujeto afectado de cáncer de mama tal como el DCIS o sospechoso de tenerlo.

Molécula diana: una biomolécula objeto de detección o medición, tal como un marcador de cáncer de mama. Como ejemplos de moléculas diana cabe citar OPN-c, ER, PR y HER-2.

Tumor: un neoplasma. En un ejemplo un tumor es uno que expresa una OPN tal como la OPN-c. Como ejemplos de tumores que expresan OPN cabe mencionar, sin limitarse a ellos, los siguientes tipos de cáncer: adrenocortical, ameloblastoma, ampular, vesicular, óseo, mamario, cervical, colangioma, colorrectal, endometrial, esofágico, gástrico, glioma, tumor de células granulares, cáncer de cabeza y cuello, hepatocelular, mola hidatiforme, pulmonar, linfoma, melanoma, mesotelioma, mieloma, neuroblastoma, cáncer oral, osteocondroma, osteosarcoma, ovárico, pancreático, pilomatricoma, prostático, de células renales, tumor de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos, nevus de Spitz, cáncer de células escamosas, cáncer teratoide y cáncer tiroideo.

En condiciones suficientes para: una frase que se usa para describir cualquier entorno que permite la actividad deseada (p.ej. tiempo, temperatura, condiciones de reacción apropiadas). Un ejemplo incluye la puesta en contacto de un anticuerpo o sonda de ácido nucleico con una muestra de cáncer mamario suficiente para permitir la detección de una o más moléculas diana (p.ej. ER, PR, HER2, OPN-c) en la muestra y puede incluir la cuantificación de una o más moléculas diana en la muestra.

Métodos de clasificación y estadificación del cáncer

Los métodos de la presente invención están definidos en las reivindicaciones adjuntas.

Aquí se demuestra que la variante de empalme OPN-c se expresa en el 75-80% de los carcinomas de mama, pero no en tejidos mamaros normales. Los niveles de OPN-c están relacionados con el grado tumoral. Esto hace de la OPN-c un marcador del potencial invasivo de los tumores mamaros, que permite a los médicos clínicos seleccionar regímenes apropiados de tratamiento para un paciente con cáncer de mama o de otro tipo. La OPN-c es un mejor marcador del cáncer de mama que la OPN-a, porque está ausente del tejido mamaro normal. De hecho el análisis cuantitativo de los niveles de ARN mediante la OPN-a no discierne estadísticamente diferencias importantes entre mamas normales y tumorosas. En base a estos resultados la detección de OPN-c en una muestra de tumor puede utilizarse para clasificar o estadificar cualquier tumor que exprese OPN, como por ejemplo cáncer adrenocortical, ameloblastoma, cáncer ampular, cáncer de vesícula, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer cervical, colangioma, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, glioma, tumor de células granulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mola hidatiforme, cáncer pulmonar, linfoma, melanoma, mesotelioma, mieloma, neuroblastoma, cáncer oral, osteocondroma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, pilomatricoma, cáncer prostático, cáncer de células renales, tumor de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos, nevus de Spitz, cáncer de células escamosas, cáncer teratoide y cáncer tiroideo.

La falta de indicadores moleculares fiables de la progresión del cáncer de mama ha llevado a esfuerzos para usar crecientemente lecturas complejas. Para el pronóstico del cáncer de mama y la toma de decisiones terapéuticas en un sistema de clasificación de utilidad de marcadores tumorales (Hayes y otros, Breast Cancer Res. Treat. 52:305-19, 1998) se han tenido en cuenta marcadores tumorales múltiples, incluyendo la amplificación/sobreexpresión de HER2, catepsina D y uPAR. Un perfil pronóstico genético de 70 genes - desarrollado en el Netherlands Cancer Institute – se ha distinguido como un buen predictor de resultados (van de Vijver y otros, N. Engl. J Med. 347:1999-2009, 2002). La probabilidad de recurrencia distante en pacientes de cáncer de mama que tienen tumores positivos en receptor de estrógeno y ningún ganglio involucrado se puede definir con un panel de 21 productos genéticos amplificados por RT-PCR a partir de bloques de parafina y se relaciona con la probabilidad de recurrencia distante (Paik y otros, N. Engl. J. Med. 351:2817-2826, 2004). La expresión selectiva de OPN-c en cánceres de mama, pero no en mamas sanas, puede proporcionar un diagnóstico más sencillo y comparativamente fiable y un marcador del pronóstico.

Los métodos revelados y los kits pueden proporcionar opciones adicionales de tratamiento. Por ejemplo, si un sujeto es positivo en ER, PR o HER2, hay regímenes de tratamiento estándar (p.ej. Herceptin para HER2+ o tamoxifeno para ER+ o PR+). Sin embargo para los sujetos negativos en todos los tres marcadores ER, PR y HER2 no hay ningún método actual capaz de determinar cómo evolucionarán estos pacientes. Aquí se demuestra que al menos el 38% de sujetos negativos para ER, PR y HER2 son altamente positivos para OPN-c y los sujetos altamente positivos en OPN-c incluyen aquellos pacientes que tienen cánceres más agresivos (p.ej. de grado 2 y 3). Por consiguiente la revelación proporciona métodos de selección de pacientes que tienen cáncer de mama u otros cánceres altamente positivos en OPN-c para recibir terapias adicionales más agresivas (tales como mastectomía en vez de lumpectomía o una lumpectomía combinada con quimioterapia (por ejemplo terapia con Herceptin® si el tumor sobreexpresa HER2 y tamoxifeno u otra terapia antiestrógena si el tumor sobreexpresa ER) en lugar de solo una lumpectomía).

Aquí se aportan métodos de clasificación de un cáncer de mama que exprese OPN, por ejemplo DCIS o LCIS. En algunos ejemplos se trata de un cáncer de mama negativo en ER, PR y HER2. El método puede incluir la detección o medición del nivel de expresión de OPN-c en una muestra de cáncer de mama obtenida del paciente, en la cual la presencia de cantidades importantes de OPN-c detectable (p.ej. de intensidad 1/3 máxima o 2/3 máxima) indica que el paciente tiene un cáncer más agresivo (de grado superior, como un cáncer mamario de grado 2 o 3), la presencia de cantidades moderadas de OPN-c detectable (p.ej. de intensidad 1/3 media) en la muestra mamaria indica que el paciente tiene un cáncer moderadamente agresivo (por ejemplo un cáncer mamario de grado 2), mientras que la presencia de menores cantidades de OPN-c detectable (p.ej. de intensidad 1/3 inferior) en la muestra mamaria indica que el paciente tiene un cáncer menos agresivo (de grado inferior, como un cáncer mamario de grado 1). En algunos ejemplos el método incluye además la selección de un sujeto afectado de cáncer de mama u otro tipo de cáncer que exprese OPN (tal como OPN-c) o sospechoso de tenerlo.

En algunos ejemplos el nivel de expresión de OPN-c está cuantificado o escalado y opcionalmente se compara con un control o valor de referencia (o rango de valores) de expresión de OPN-c (tal como un control de cáncer positivo o negativo, o un grado de tumor concreto). La cuantificación no requiere la determinación de una cantidad absoluta, pero puede incluir la determinación de una cantidad relativa. Por ejemplo, se puede determinar la cantidad relativa o absoluta de OPN-c en una muestra. En algunos ejemplos se determina la cantidad relativa de OPN-c presente, por ejemplo cuantificando la cantidad de OPN-c presente. En algunos ejemplos los niveles de OPN-c se normalizan, por ejemplo comparando la expresión de OPN-c con un control (p.ej. el nivel de expresión de un gen de mantenimiento tal como β -actina o GAPDH) en la muestra de tumor. En algunos ejemplos la OPN-c (y en algunos de ellos otros marcadores de cáncer o genes de mantenimiento conocidos en el estado técnico) también se detecta o se mide en tejido normal o en tejido no canceroso adyacente al canceroso. Por ejemplo, el tejido mamario normal puede servir de control negativo o de fondo para la OPN-c, ya que la OPN-c no se expresa en tejido mamario normal (véase la FIG. 1A).

En un ejemplo se usa inmunohistoquímica (IHC) para detectar OPN-c (y otros marcadores de cáncer). En algunos ejemplos, cuando se usa IHC la tinción detectable se registra en una escala típica de 1+ hasta 3+ para representar la intensidad, asignando 0 a la tinción negativa, 3 a las muestras con una tinción muy intensa y 1 a las muestras con una tinción débil (véase tabla 1). En algunos ejemplos se reexamina un valor de 2. Por tanto, cuando en ejemplos concretos se detecta un nivel de "1" para OPN-c, esto indica que el paciente tiene un cáncer menos agresivo (por ejemplo un cáncer mamario de grado 1 o en fase 0-1), mientras que la detección de un nivel "3" OPN-c indica que el paciente tiene un cáncer agresivo (por ejemplo un cáncer mamario de grado 2 o 3 o en fase II o superior). Así por ejemplo, tal como muestra la tabla 1, los tumores pueden clasificarse según su nivel de expresión relativo de OPN-c. Un especialista en la materia apreciará que estos valores no son absolutos y pueden variar según las muestras y reactivos utilizados.

Tabla 1: ejemplo de relación de la intensidad de tinción de la OPN-c con el grado tumoral

Informe de resultado	Intensidad de la tinción	Observación al microscopio	Grado tumoral
<u>Positivo:</u> cualquier tinción IHC de membranas de células tumorales por encima del nivel de fondo, aunque la tinción circunferencial sea completa o incompleta, en más del 0% de células tumorales.	3+	<u>Reactividad fuerte:</u> la tinción suele ser marrón oscura hasta negra, pero no siempre, en un patrón de membrana completo, y produce un contorno grueso de la célula. Puede faltar reactividad citoplasmática o ser de intensidad moderada cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede haber acentuación citoplasmática submembranosa.	3
	2,5	<u>Reactividad intensa:</u> sombras de tinción marrón de oscuridad media (intensidad). La reactividad membranosa es usual pero no siempre completa y produce un contorno circular de la célula neoplásica. La reactividad membranosa incompleta de intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática es de intensidad más débil que la reactividad membranosa.	2
	2+	<u>Reactividad moderada:</u> sombras de tinción marrón de oscuridad intermedia (intensidad). La reactividad membranosa es usual pero no siempre completa y produce un contorno circular de la célula neoplásica. La reactividad membranosa incompleta de intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática es de intensidad más débil que la reactividad membranosa.	2
	1,5	<u>Reactividad ligera:</u> tinción membranosa de intensidad intermedia. Puede haber reactividad citoplasmática uniforme que implique todo el citoplasma, pero no debe evaluarse positivamente.	1
	1+	<u>Reactividad débil:</u> tinción membranosa tenue o marrón clara. Puede haber reactividad citoplasmática uniforme que implique todo el citoplasma, pero no debe evaluarse positivamente.	1
<u>Negativo:</u> ausencia de tinción de membrana por encima del fondo en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de membrana.	0,5	<u>Trazas de reactividad:</u> indicios de tinción marrón con localización membranosa y citoplasmática indeterminada.	1
	0	<u>Ninguna reactividad</u>	

5 Los métodos de la presente revelación no se limitan a procedimientos concretos de representación de los niveles de expresión de OPN-c en la muestra del paciente. Aunque puede usarse la típica escala de 1+ a 3+ para representar la intensidad de la señal (por ejemplo cuando se utiliza IHC para detectar una molécula diana), también se pueden emplear otras escalas. En un ejemplo se usa la puntuación media combinada para representar los niveles de OPN-c existentes en la muestra de un paciente. Los métodos de puntuación media combinada pueden proporcionar una

10 escala de 0 hasta 300. Los tejidos se valoran puntuando el citoplasma mediante una típica escala de 1+ a 3+ para representar la intensidad y asignando 3 a las muestras con tinción muy intensa, 1 a las muestras débilmente teñidas y 0 a las muestras de tinción negativa. Las puntuaciones patológicas combinadas se calculan multiplicando la intensidad media (que va de 1 hasta 3) por el porcentaje medio de tejido teñido (que va de 0 hasta 100). La mayor puntuación posible es 300. Para asignar un grado tumoral se puede usar el sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado, que tiene en cuenta el grado nuclear, la formación de túbulos y la velocidad mitótica. Para asignar

15 un grado 1, 2 o 3 (o una fase tumoral concreta) se aplica la puntuación combinada de estos factores. En algunos ejemplos, la señal (o el valor comprendido en el intervalo de 0 hasta 300) obtenido a partir de la muestra de tejido se compara con una señal de control (o con el valor o intervalo de valores esperado a partir de una muestra de control). Por ejemplo, el valor resultante de la muestra experimental en el intervalo de 0 hasta 300 se puede comparar con

muestras de control que tengan grados tumorales conocidos (o con tejido normal) y sus valores resultantes en la escala de 0 a 300, o se puede comparar con valores esperados en la escala de 0 a 300 para cada grado (o fase) tumoral. Por ejemplo, si un tumor de control de grado 3 tiene un intervalo de 250 a 300, el tumor de control de grado 2 tiene un intervalo de 150 a 249, el tumor de control de grado 1 un intervalo de 50 a 149 y la muestra normal un intervalo de 0 a 49, cuando se obtiene un valor experimental de 275 se deduce que la muestra experimental es un tumor de grado 3, mientras que si el valor obtenido es 74 se deduce que la muestra experimental es un tumor de grado 1. Un especialista en la materia entenderá que los valores arriba señalados sirven para fines demostrativos y que los valores absolutos o los intervalos de valores pueden variar, por ejemplo, dependiendo del método utilizado para detectar la expresión.

No obstante, otros métodos útiles para representar los niveles de OPN-c presentes en una muestra de un paciente incluyen una serie de números cuyo valor absoluto puede variar dependiendo de la muestra experimental concreta y/o del control concreto (p.ej. un gen particular de mantenimiento) empleados. En el estado técnico se conocen ejemplos de tales métodos (véanse por ejemplo las patentes US nº 7,056,674 y 7,081,340; incorporadas aquí como referencia). Por ejemplo, si se usan métodos de detección de ácido nucleico, por ejemplo RT-PCR en tiempo real, en la muestra experimental se detecta OPN-c y un control (p.ej. un gen de mantenimiento). Utilizando esta información se puede normalizar la expresión de OPN-c contra el nivel de expresión de un transcrito de mantenimiento, por ejemplo mediante una relación de expresión de OPN-c a expresión de control. La normalización se puede usar para corregir diferencias en la cantidad de ARN ensayado y en la variabilidad cualitativa del ARN utilizado. En algunos ejemplos el método incluye asimismo la detección de la expresión de un gen normalizador, tal como un gen de mantenimiento. Alternativamente la normalización se puede basar en la media o en la mediana de la señal de todos los genes ensayados o de un gran subconjunto de ellos (procedimiento de normalización global). La cantidad normalizada de ARNm en un tumor de un paciente, medida sobre la base de gen por gen, se puede comparar con la cantidad hallada en una serie de referencia de tejido canceroso de mama. El número de tejidos de cáncer de mama en esta serie de referencia debería ser suficiente para asegurar que diferentes series de referencia (en conjunto) se comporten básicamente del mismo modo. La serie de referencia de tejido canceroso de mama suele constar, como mínimo, de 30 muestras distintas de tejido de cáncer de mama, aproximadamente. El nivel medido en una muestra concreta de tumor sometida a análisis cae en algún percentil dentro de este intervalo, el cual se puede determinar por métodos bien conocidos del estado técnico.

Cuanto mayor sea la relación de nivel de expresión OPN-c : gen de mantenimiento para un gen de mantenimiento particular, mayor será el grado de cáncer en la muestra experimental (p.ej. grado 3), mientras que una relación más baja de nivel de expresión OPN-c : gen de mantenimiento para un gen de mantenimiento particular indica un menor grado de cáncer. Un especialista en la materia entenderá que la relación absoluta entre una proporción concreta de OPN-c : gen de mantenimiento y el correspondiente grado (o fase) tumoral puede variar. Por ejemplo, si un tumor de control de grado 3 tiene una relación OPN-c : β -actina superior a 3.000, el tumor de control de grado 2 tiene una relación OPN-c: β -actina entre 500 y 2.999, el tumor de control de grado 1 tiene una relación OPN-c : β -actina entre 50 y 499 y la muestra normal tiene una relación OPN-c : β -actina inferior a 50; si se obtiene una relación OPN-c experimental : β -actina de 9.000 se deduce que la muestra experimental es un tumor de grado 3, mientras que si la relación OPN-c experimental : β -actina resultante es de 1.000 se deduce que la muestra experimental es un tumor de grado 1. Por otra parte, si se usa un gen de mantenimiento diferente, tal como GAPDH, puede variar el intervalo de valores. Por ejemplo, si un tumor de control de grado 3 tiene una relación OPN-c : GAPDH superior a 10.000, el tumor de control de grado 2 tiene una relación OPN-c : GAPDH entre 1000 y 9.999, el tumor de control de grado 1 tiene una relación OPN-c : GAPDH entre 999 y 100 y la muestra normal tiene una relación OPN-c : inferior a 100; si se obtiene una relación OPN-c experimental : GAPDH de 60.000 se deduce que la muestra experimental es un tumor de grado 3, mientras que si la relación OPN-c experimental : GAPDH resultante es de 500 se deduce que la muestra experimental es un tumor de grado 1. Un especialista en la materia entenderá que los valores aportados solo tienen una finalidad demostrativa y que los valores absolutos o los intervalos de valores pueden variar, por ejemplo dependiendo del método usado para detectar la expresión y del gen particular de mantenimiento detectado.

Además el método puede incluir la detección o medición de otros marcadores de cáncer en la muestra cancerosa. Por ejemplo, si la muestra es un marcador de cáncer de mama, el método puede incluir la detección o medición de uno o más marcadores entre el receptor de estrógeno (ER), el receptor de progesterona (PR) o el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). En algunos ejemplos se detecta ER, PR y HER2. En algunos ejemplos la lectura de ER y PR es sencillamente positiva o negativa y el HER2 se lee en una escala, tal como se ha descrito arriba para la OPN-c (véase p.ej. la tabla 1). En algunos ejemplos la ausencia de ER (ER-) y PR (PR-) y la presencia de OPN-c y HER2 en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer mamario más agresivo (p.ej. un cáncer de mama de grado 2 o 3), mientras que la presencia de ER (ER+), PR (PR+) y de poco HER2 (p.ej. 0 o 1) y OPN-c (p.ej. 1) en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene una forma menos agresiva de cáncer mamario (p.ej. un cáncer de mama de grado 1). En algunos ejemplos la presencia importante de HER2 (p.ej. 3 en una escala de 0 a 3) y de OPN-c (p.ej. 3 en una escala de 0 a 3) en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer mamario más agresivo (p.ej. un cáncer de mama de grado 2 o 3). Para juzgar el valor predictivo de varios biomarcadores combinados (p.ej. 3 OPN-c, ER, PR y HER2) se puede usar un método de modelos de regresión logística, que valora entre varios modelos el que da mejor resultado. Para el modelo que mejor funcione se puede crear una curva característica receptor-operador (CRO) como representación gráfica de sensibilidad/especificidad al variar el umbral de discriminación.

Las moléculas de OPN-c, ER, PR y HER2 (así como los genes de mantenimiento y otros marcadores de cáncer) se pueden revelar por detección de proteínas o moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos para detectar proteínas de OPN-c, ER, PR y HER2 y sondas o cebadores de ácido nucleico para detectar moléculas de ácido nucleico de OPN-c, ER, PR y HER2. Estos métodos de detección son rutinarios e incluyen procedimientos inmunohistológicos, análisis por Western blot y citometría de flujo, así como PCR y matrices de ácido nucleico. En algunos ejemplos el anticuerpo o la sonda/cebador de ácido nucleico lleva un marcador detectable, por ejemplo un fluoróforo, que permite la detección del anticuerpo. En algunos ejemplos el anticuerpo se detecta con un anticuerpo secundario debidamente marcado.

En algunos ejemplos, la detección tanto de la proteína de OPN-c como del ácido nucleico de OPN-c en una o más muestras biológicas obtenidas del paciente (por ejemplo una muestra de tejido canceroso de mama) se usa para clasificar o estadiar un tumor que sobreexpresa OPN-c (como el DCIS). En algunos ejemplos el método también incluye la elección de un protocolo de tratamiento del paciente basado en la detección de OPN-c. Por ejemplo, si la muestra de cáncer es altamente positiva en OPN-c (y en algunos ejemplos negativa en ER, PR y HER2) se puede elegir un protocolo terapéutico más agresivo, pues esto indica que el paciente tiene una forma más agresiva de cáncer (p.ej. de grado 3). Como ejemplos de terapias más agresivas cabe citar una mastectomía en vez de una lumpectomía, una lumpectomía combinada con radioterapia y/o quimioterapia (p.ej. terapias anti-HER2, anti-ER y/o anti-PR como Trastuzumab (Herceptin®), bevacizumab (Avastin®), pertuzumab (OmniTarg®), ZM105180 (Zemab®), ertumaxomab (Rexonum), Arimidex® y tamoxifeno) en vez de solo una lumpectomía, o un incremento de la dosis y/o del número de tratamientos de quimioterapia. Los métodos de administración de dichas terapias son rutinas del estado técnico y pueden ser planificadas por médicos clínicos experimentados. En cambio, si la muestra de cáncer tiene bajas cantidades de OPN-c (y en algunos ejemplos es negativa en ER, PR y HER2) se puede elegir un protocolo terapéutico menos agresivo, pues esto indica que el paciente tiene una forma menos agresiva de cáncer (p.ej. de grado 1). Como ejemplos de terapias más agresivas cabe mencionar una lumpectomía en vez de una mastectomía, solo una lumpectomía en vez de una lumpectomía combinada con radioterapia y/o quimioterapia o una disminución de la dosis y/o del número de tratamientos de quimioterapia. Los métodos de administración de dichas terapias son rutinas del estado técnico y pueden ser planificadas por médicos clínicos experimentados.

En algunos ejemplos los anticuerpos diagnósticos de ER, PR, HER-2 se han adquirido de Ventana Medical Systems (Tuscon, AZ). No obstante un especialista en la materia comprenderá que en los métodos que aquí se ofrecen se pueden emplear otros anticuerpos disponibles comercialmente de otras fuentes, como por ejemplo de Novus Biologicals (Littleton, CO), Santa Cruz biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) e Invitrogen (Carlsbad, CA). En algunos ejemplos el anticuerpo de OPN-c es uno descrito en el ejemplo 1. No obstante un experto en la materia entenderá que en los métodos y kits aquí propuestos se pueden usar otros anticuerpos de OPN-c disponibles comercialmente de otras fuentes, como por ejemplo de Gallus Immunotech, Inc. (Ontario, Canada).

Muestras biológicas

Como ejemplos de muestras cabe mencionar, sin limitación, frotis de sangre, preparaciones citocentrífugas, frotis citológicos, biopsias con aguja gruesa, aspirados con aguja fina y/o secciones de tejido (p.ej. secciones de tejido criostato y/o secciones de tejido embebido en parafina). Los métodos de obtención de una muestra biológica de un paciente son conocidos del estado técnico. Por ejemplo, los métodos de obtención de tejido o células de mama son rutinarios. Por ejemplo, las muestras biológicas pueden aislarse de células o tejidos normales o de células o tejidos neoplásicos. La neoplasia es un estado biológico en que una o más células han sufrido una anaplasia característica con pérdida de diferenciación, mayor velocidad de crecimiento, invasión de tejido circundante y cuyas células pueden metastatizar. Las células o tejidos neoplásicos pueden aislarse por ejemplo de tumores sólidos, incluyendo carcinomas de mama (como p.ej. carcinomas lobulares y ductales), cáncer adrenocortical, ameloblastoma, cáncer ampular, cáncer de vesícula, cáncer óseo, cáncer cervical, colangioma, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, glioma, tumor de células granulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mola hidatiforme, cáncer pulmonar, linfoma, melanoma, mesotelioma, mieloma, neuroblastoma, cáncer oral, osteocondroma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, pilomatricoma, cáncer prostático, cáncer de células renales, tumor de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos, nevus de Spitz, cáncer de células escamosas, cáncer teratoide y cáncer tiroideo.

Por ejemplo, una muestra de un tumor que contenga material celular se puede obtener por excisión quirúrgica de todo el tumor o parte del mismo, recogiendo aspirado del tumor con una aguja fina, y también por otros métodos conocidos del estado técnico. Si se desea, la muestra se puede concentrar o purificar antes del uso. Por ejemplo, se pueden aislar proteínas o ácidos nucleicos de la muestra. Estos métodos son rutinas conocidas del estado técnico. Como alternativa la muestra se puede usar directamente. En ejemplos concretos se aplica una muestra de tejido o de células sobre un substrato y se analiza para determinar si contiene niveles detectables de OPN-c (y en algunos ejemplos también de ER, PR y HER2). Un soporte sólido útil en un método revelado solo necesita ser la base de la muestra biológica y opcional, aunque ventajosamente, permitir la detección conveniente de componentes (p.ej. de proteínas y/o de secuencias de ácido nucleico) en la muestra. Como ejemplos de soportes cabe citar: portaobjetos (p.ej. portaobjetos de vidrio o plástico de microscopio), cubreobjetos (p.ej. de vidrio o de plástico), placas de cultivo de tejidos, placas multipocillo, membranas (p.ej. de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF)) o chips de

BIACORE®. En ejemplos concretos se analiza una muestra de cáncer de mama obtenida del paciente para ver si contiene niveles detectables de OPN-c, ARNm o proteína.

5 Los fijadores para montar preparaciones celulares y tisulares son bien conocidos del estado técnico e incluyen, sin limitación, fijador de Bouin alcohólico del 95%, fijador de alcohol del 95%, fijador B5, fijador de Bouin, fijador de formalina, fijador de Karnovsky (aldehído glutárico), fijador de Hartman, fijador de Hollande, fijador de Orth (fijador de dicromato) y fijador de Zenker (véase p.ej. Carson, *Histotechnology: A Self-Instructional Text*, Chicago:ASCP Press, 1997).

10 *Detección de péptidos*

En ejemplos concretos se analiza una muestra obtenida del paciente para determinar si contiene niveles detectables de proteína de OPN-c. En algunos ejemplos la muestra es de cáncer mamario. La muestra, por ejemplo una muestra de cáncer de mama, también se puede analizar para detectar la presencia de proteínas de ER, PR y HER2.

15 Los métodos de detección de proteínas son rutinarios. En algunos ejemplos se usan inmunoensayos para detectar la presencia de proteína de OPN-c en la muestra (y además en algunos ejemplos una o más entre las proteínas de ER, PR y HER2). En general los inmunoensayos incluyen el uso de uno o más agentes de fijación específicos (tales como anticuerpos) que básicamente solo pueden unirse al péptido diana, por ejemplo a OPN-c, ER, PR y HER2. Estos agentes de fijación pueden incluir un marcador detectable (por ejemplo un marcador radiactivo, un fluoróforo o un enzima) que permita detectar la unión a la proteína. Como ejemplos de inmunoensayos utilizables cabe citar, sin limitarse a ellos: Western blot, ELISA, microscopia de fluorescencia y citometría de flujo. Un inmunoensayo particular es la inmunohistoquímica.

25 En un ejemplo, el agente de fijación específico es un anticuerpo, tal como uno de tipo policlonal or monoclonal, o un fragmento del mismo. En algunos ejemplos el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En algunos ejemplos el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Si se desea, el anticuerpo puede incluir un marcador detectable para permitir la detección y en algunos casos la cuantificación del complejo proteína/anticuerpo.

30 La presencia de señal detectable por encima del fondo o de los niveles de control indica la presencia en la muestra de un péptido diana (p.ej. de proteína de OPN-c y además en algunos ejemplos una o más entre las proteínas de ER, PR y HER2). Por ejemplo, el nivel de OPN-c detectado se pueden comparar con un control o valor de referencia (o intervalo de valores) tal como un valor correspondiente a un nivel esperado de proteína de OPN-c si el cáncer de mama es de grado 3, un valor correspondiente a un nivel esperado de proteína de OPN-c si el cáncer de mama es de grado 2, un valor correspondiente a un nivel esperado de proteína de OPN-c si el cáncer de mama es de grado 1, un valor correspondiente a un nivel esperado de proteína de OPN-c si no hay cáncer de mama (tejido normal) o combinaciones de ellos. Para las proteínas de ER, PR y HER2 se pueden usar valores de referencia similares. En algunos ejemplos el control es una muestra normal (es decir, no tumoral) (o un valor esperado para una muestra normal).

40 En algunos ejemplos la detección de mayores niveles de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor de grado 3, la detección de niveles intermedios de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor de grado 2, mientras que la detección de menores niveles de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor de grado 1. En algunos ejemplos la detección de mayores niveles de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor más agresivo (de fase III o superior), la detección de niveles intermedios de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor moderadamente agresivo (como de fase II), mientras que la detección de menores niveles de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor menos agresivo (de fase I o inferior). La cantidad de OPN-c detectada puede depender del tipo de medición efectuada (véase p.ej. FIG. 3C). La detección de OPN-c o de otro marcador de cáncer (p.ej. PR, ER, HER2) se puede indicar como puntuación citoplasmática combinada media, porcentaje medio de positivos o intensidad porcentual media u otro valor conocido del estado técnico. El valor obtenido para la muestra de cáncer analizada se puede comparar con un valor de referencia (o intervalo de valores) que corresponda, por ejemplo, a un valor o intervalo de valores esperados para un cáncer mamario de grado 1, 2 o 3 (o para una fase concreta del mismo). En algunos ejemplos la referencia es una muestra que tenga una cantidad conocida o esperada de proteína de OPN-c. Por ejemplo, las líneas celulares MCF-7 y ZR-75 son negativas en OPN-c, mientras que las líneas MDA-MB-435 y MDA-MB-231 son positivas en OPN-c (todas estas líneas celulares pueden adquirirse de la American Type Culture Collection [Colección americana de cultivos tipo]). En algunos ejemplos se trata de una muestra de cáncer de mama que tiene un grado 1, 2 o 3 conocido y un valor o intervalo de valores particulares de OPN-c (y en algunos ejemplos también valores de ER, PR y HER2). El valor de OPN-c resultante del análisis (y en algunos ejemplos también los valores analizados de ER, PR y HER2) se puede comparar con el valor de referencia para relacionar el valor de análisis con un grado de cáncer. Por ejemplo, si el nivel de OPN-c detectado en la muestra del paciente es similar o superior al nivel de OPN-c en una muestra de cáncer mamario conocido de grado 3 o cae dentro del intervalo esperado para un cáncer mamario de grado 3, ello indica que el paciente tiene un cáncer de mama de grado 3.

65 *Detección de moléculas de ácido nucleico*

En ejemplos concretos se analiza una muestra obtenida del paciente para determinar si contiene niveles detectables de moléculas de ácido nucleico de OPN-c (y en algunos ejemplos también de ER, PR y HER2), por ejemplo una muestra de cáncer de mama, una muestra adyacente al tumor, tejido mamario normal o combinaciones de ellas. En ejemplos particulares se miden moléculas de ácido nucleico (tales como ARNm o ADNc) de OPN-c (y en algunos ejemplos también de ER, PR y HER2).

Los métodos de detección de moléculas de ácido nucleico son rutinarios. En ejemplos particulares se analiza una muestra de cáncer de mama obtenida del paciente con el fin de detectar moléculas de ácido nucleico de OPN-c (y en algunos ejemplos también de moléculas de ácido nucleico de ER, PR y HER2) tales como ADNc o ARNm. Por ejemplo, se pueden realizar ensayos que permitan detectar ácidos nucleicos. Como ejemplos de ensayos útiles cabe citar, sin limitación: Northern blot, Southern blot, PCR (tal como RT-PCR o RT-PCR en tiempo real) y matrices de ADN. Por ejemplo, a partir de una muestra se puede amplificar la OPN-c por PCR y después detectar, y en algunos ejemplos también cuantificar, los amplicones de OPN-c.

En algunos ejemplos la detección de mayores niveles de ADNc o ARNm de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor de grado 3, la detección de niveles intermedios de ADNc o ARNm de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor de grado 2, mientras que la detección de menores niveles de ADNc o ARNm de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor de grado 1. En algunos ejemplos la detección de mayores niveles de ADNc o ARNm de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor más agresivo (de fase III o superior), la detección de niveles intermedios de ADNc o ARNm de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor moderadamente agresivo (como de fase II), mientras que la detección de menores niveles de ADNc o ARNm de OPN-c indica que el paciente tiene un tumor menos agresivo (de fase I o inferior). La cantidad detectada de ADNc o ARNm de OPN-c depende del tipo de medición efectuada.

En un ejemplo, una sonda de ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico de OPN-c se pone en contacto con la muestra de cáncer mamario o de otro tipo de cáncer. Por ejemplo, la sonda se puede incubar con la muestra en condiciones muy estrictas (como cuando la hibridación se efectúa a unos 42°C en una solución de hibridación que contiene KPO₄ 25 mM (pH 4,7), solución SSC 5X, solución de Denhart 5X, 50 µg/ml de DN de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado, 50% de formamida, 10% de sulfato de dextrano y 1-15 ng/ml de sonda (5 x 10⁷ cpm/µg aproximadamente), realizando los lavados a unos 65°C con una solución que contiene 0,2X SSC y 0,1% de dodecil sulfato sódico), de manera que la presencia de mayores cantidades de señal indica que el cáncer de mama es de grado 3 y la presencia de menores cantidades de señal indica que el cáncer de mama es de grado 1.

Las reacciones de RT-PCR en tiempo real se pueden llevar a cabo empleando los métodos rutinarios del estado técnico. Por ejemplo, se puede utilizar un formato de detección SYBR Green con concentraciones optimizadas de molde, cebadores y MgCl₂. Para cada muestra de análisis se puede incluir una reacción sin molde como control negativo. Las condiciones de reacción pueden constar de 35-40 ciclos de fusión, temperatura de hibridación específica de un juego de cebadores, extensión y programa de curva de fusión, y al final una etapa de enfriamiento. La pureza y el tamaño del producto y la ausencia de cebadores dimerizados se puede confirmar analizando la curva de fusión de ADN y llevando a cabo una electroforesis en gel de agarosa. El valor umbral de amplificación se puede comparar con un gen de mantenimiento y con una muestra de referencia. La abundancia relativa del mensaje de ARN se calcula luego por métodos conocidos del especialista (véase p.ej. Pfaffl Nucleic Acids Res. 2001 ;29:e45, que se incorpora aquí como método de referencia).

El valor obtenido (o la señal detectada) en la muestra de cáncer de mama analizada se puede comparar con un valor de referencia como el que corresponde a un valor o intervalo de valores esperados para el grado 1, 2 o 3 de cáncer de mama (o una fase concreta del cáncer). En algunos ejemplos la referencia es una muestra que tiene una cantidad conocida o esperada de molécula de ácido nucleico de OPN-c. Por ejemplo, las líneas celulares MCF-7 y ZR-75 son negativas en OPN-c, mientras que las líneas MDA-MB-435 y MDA-MB-231 son positivas en OPN-c (todas estas líneas celulares pueden adquirirse de la American Type Culture Collection [Colección americana de cultivos tipo]). En algunos ejemplos se trata de una muestra de cáncer de mama que tiene un grado 1, 2 o 3 conocido y un valor o intervalo de valores particulares de OPN-c (y en algunos ejemplos también valores de ER, PR y HER2). El valor de OPN-c resultante del análisis (y en algunos ejemplos también los valores analizados de ER, PR y HER2) se puede comparar con el valor de referencia para relacionar el valor de análisis con un grado de cáncer. Por ejemplo, si el nivel de molécula de ácido nucleico de OPN-c detectado en la muestra del paciente es similar o superior al nivel de molécula de ácido nucleico de OPN-c en una muestra de cáncer mamario conocido de grado 3 o cae dentro del intervalo esperado para un cáncer mamario de grado 3, ello indica que el paciente tiene un cáncer de mama de grado 3.

Métodos de pronóstico de cáncer

Aquí se revelan métodos para pronosticar un cáncer, examinando los niveles de OPN-c en una muestra de tumor obtenida de un paciente. La OPN-c se puede detectar tal como se ha descrito arriba, de modo que la presencia de cantidades importantes de OPN-c detectable en la muestra de cáncer (p.ej. de intensidad 1/3 máxima o 2/3 máxima) indica que el paciente tiene un peor pronóstico, mientras que la presencia de menores cantidades de OPN-c detectable en la muestra de cáncer (p.ej. de intensidad 1/3 inferior) en la muestra mamaria indica que el paciente tiene mejor pronóstico. La detección de OPN-c en una muestra tumoral se puede usar para pronosticar cualquier tipo

de tumor que exprese OPN-c, como por ejemplo cáncer adrenocortical, ameloblastoma, cáncer ampular, cáncer de vesícula, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer cervical, colangioma, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, glioma, tumor de células granulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mola hidatiforme, cáncer pulmonar, linfoma, melanoma, mesotelioma, mieloma, neuroblastoma, cáncer oral, osteocondroma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, pilomatricoma, cáncer prostático, cáncer de células renales, tumor de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos, nevus de Spitz, cáncer de células escamosas, cáncer teratoide y cáncer tiroideo.

Los métodos de pronóstico se pueden emplear para predecir la probable progresión del tumor, el tiempo de supervivencia, el probable empeoramiento del estado, etc., por ejemplo el pronóstico en ausencia de terapia (p.ej. de radiación o quimioterapia). Por ejemplo, los métodos se pueden usar para determinar si un tumor puede ser menos agresivo (es decir, de crecimiento menos rápido y/o con menor probabilidad de metastatizar) o más agresivo (es decir, de crecimiento rápido y/o con mayor probabilidad de metastatizar), por ejemplo independientemente de la terapia. Un tumor menos agresivo se puede caracterizar mediante cualquiera de los parámetros conocidos en el estado técnico, incluyendo por ejemplo disminución de la velocidad de crecimiento (p.ej. mayor tasa de apoptosis y/o menor tasa de división celular), menor tasa de metástasis y/o mayor sensibilidad a la quimioterapia. Un tumor más agresivo se puede caracterizar mediante cualquiera de los parámetros conocidos en el estado técnico, incluyendo por ejemplo incremento de la velocidad de crecimiento (p.ej. menor tasa de apoptosis y/o mayor tasa de división celular), mayor tasa de metástasis y/o menor sensibilidad a la quimioterapia. En algunos ejemplos el pronóstico para un paciente se puede caracterizar por la supervivencia real a partir del diagnóstico inicial (por ejemplo 6 meses de supervivencia, 1 año de supervivencia, 2 años de supervivencia o 5 años de supervivencia) y/o por la supervivencia real respecto a la supervivencia media de pacientes en situación análoga. Un mejor pronóstico supone p.ej. una supervivencia del paciente superior a 1 año tras el diagnóstico inicial (por ejemplo superior a 2 o 5 años) o una supervivencia del paciente superior a 6 meses (p.ej. superior a 2, 5 años) respecto a la supervivencia media de pacientes en situación análoga. Un peor pronóstico supone p.ej. una supervivencia del paciente inferior a 5 años tras el diagnóstico inicial (por ejemplo inferior a 2 o 1 año) o una supervivencia del paciente inferior a la supervivencia media de pacientes en situación análoga (por ejemplo, aproximadamente inferior a 3 meses, 6 meses o 1 año en comparación con la supervivencia media).

Tal como se ha descrito arriba, en algunos ejemplos se cuantifica o escala la cantidad de OPN-c, de modo que mayores niveles de OPN-c indican un cáncer más agresivo y un peor pronóstico, mientras que menores niveles de OPN-c indican un cáncer menos agresivo y un mejor pronóstico. Por ejemplo, si se usa la típica escala de 1+ a 3+ para representar la intensidad arriba descrita, la detección de un nivel "1" de OPN-c indica que el paciente tiene un cáncer menos agresivo (p.ej. menor probabilidad de muerte a los 5 años del diagnóstico o menor probabilidad de metástasis), mientras que la detección de un nivel "3" de OPN-c indica que el paciente tiene un cáncer agresivo (p.ej. mayor probabilidad de muerte a los 5 años del diagnóstico o mayor probabilidad de metástasis). En otros ejemplos se usa el método de la puntuación media combinada anteriormente descrito (con valores que van de 0 hasta 300). Por ejemplo, el valor resultante de la muestra experimental en el intervalo de 0 hasta 300 se puede comparar con muestras de control de pronóstico conocido y valores comprendidos en la escala de 0 a 300 o se puede comparar con valores esperados en la escala de 0 a 300 para cada pronóstico. Por ejemplo, si un control de pronóstico malo (p.ej. con una tasa de supervivencia de 5 años menor del 5%) tiene un intervalo de 250 hasta 300 y un control de pronóstico bueno (p.ej. con una tasa de supervivencia de 5 años mayor del 95%) tiene un intervalo de 0 hasta 49, cuando el valor de la muestra experimental obtenido es de 275 se deduce que el pronóstico es malo, mientras que si el valor de la muestra experimental obtenido es de 20 se deduce que el pronóstico es bueno. Un especialista en la materia apreciará que dichos valores solo tienen fines demostrativos y que los valores o intervalos absolutos pueden variar, por ejemplo en función del método utilizado para detectar la expresión.

En otros ejemplos los niveles de ácido nucleico de OPN-c presentes en una muestra de un paciente se normalizan de la manera anteriormente descrita (véanse por ejemplo las patentes US nº 7,056,674 y 7,081,340). En ejemplos concretos, cuanto mayor es la proporción de un gen de mantenimiento particular peor es el pronóstico, mientras que una menor proporción de un gen de mantenimiento particular indica un mejor pronóstico.

Kits

Aquí se revelan kits que pueden usarse para clasificar, estadificar y pronosticar un cáncer de mama u otro tipo de cáncer que exprese OPN, por ejemplo para determinar si un cáncer es más o menos agresivo, para determinar la probabilidad de un cáncer metastatice y predecir el tiempo de supervivencia de un paciente con cáncer. En general el cáncer se clasifica en una escala de 1 a 3, siendo 1 el menos agresivo y 3 el más agresivo.

En ejemplos concretos el kit incluye o consta de un anticuerpo que se une específicamente al receptor de estrógeno (ER), un anticuerpo que se une específicamente al receptor de progesterona (PR), un anticuerpo que se une específicamente al HER2 y un anticuerpo que se une específicamente a OPN-c. En algunos ejemplos el kit no lleva un anticuerpo de PR. En algunos ejemplos el kit incluye o consta de una sonda de ácido nucleico o de un cebador específico para una secuencia de ácido nucleico de ER, una sonda de ácido nucleico o de un cebador específico para una secuencia de ácido nucleico de PR, una sonda de ácido nucleico o de un cebador específico para una secuencia de ácido nucleico de HER2 y una sonda de ácido nucleico o de un cebador específico para una secuencia

de ácido nucleico de OPN-c. En ejemplos concretos el kit no lleva una sonda o cebador de ácido nucleico de PR. En algunos ejemplos el anticuerpo o la sonda o cebador de ácido nucleico va marcado (por ejemplo con un marcador fluorescente, radiactivo o enzimático).

5 En algunas formas de ejecución los anticuerpos, sondas o cebadores se suministran suspendidos en una solución acuosa o en forma de polvo secado por congelación o liofilizado, por ejemplo. El o los recipientes en los cuales se suministran los anticuerpos, sondas o cebadores pueden ser de tipo convencional, capaz de mantener la forma suministrada, por ejemplo tubos de microcentrifuga, ampollas o botellas. La cantidad suministrada de anticuerpos, sondas o cebadores puede ser de cualquier proporción adecuada, por ejemplo de 1 a 5 µg/ml aproximadamente.

10 En otras formas de ejecución se pueden suministrar en un recipiente apropiado y separado portaobjetos con una o más preparaciones de tejidos o de células (p.ej. de xenoinjertos, precipitados celulares o células coaguladas), que pueden servir de controles positivos y/o negativos de la expresión de OPN-c, ER, PR y/o HER2.

15 Los kits pueden comprender anticuerpos o moléculas de ácido nucleico específicas para una o más moléculas de mantenimiento, por ejemplo una o más entre GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa), SDHA (succinato deshidrogenasa), HPRT1 (hipoxantina fosforribosil transferasa 1), HBS 1 L (proteína análoga a HBS1), β-actina y AHSP (proteína estabilizadora de alfa hemoglobina).

20 El kit también puede incluir una o más muestras de control, por ejemplo positivas o negativas. Una muestra de control puede ser por ejemplo de mama normal o cancerosa, con proporciones relativas de ER, PR, HER2 y OPN-c conocidas. En un ejemplo concreto la muestra de control es de un xenoinjerto.

25 Un especialista en la materia apreciará que los kits pueden incluir otros agentes para facilitar la aplicación concreta para la cual se han diseñado. Por ejemplo, el kit puede llevar adicionalmente medios de detección de un marcador (tales como substratos de enzima para marcadores enzimáticos, conjuntos de filtros para detectar los marcadores fluorescentes, marcadores secundarios adecuados tales como un anticuerpo secundario o similares), así como tampones y otros reactivos utilizados rutinariamente en la práctica de un método concreto de diagnóstico.

30 Ejemplo 1

Materiales y métodos

35 Este ejemplo describe los materiales y métodos utilizados para obtener los resultados descritos en los ejemplos 2-5. Aunque se describen métodos y materiales concretos un experto en la materia entenderá que pueden hacerse variaciones. Por ejemplo se pueden usar anticuerpos diferentes.

40 ARN de cáncer de mama humano: el servicio de suministro de tejidos de la University of Cincinnati Medical Center/Children's Hospital facilitó muestras de tumores mamarios humanos y de tejido circundante no transformado, así como de tejido de mama sano (obtenido de mamoplastias de reducción). Se obtuvieron muestras de 20 carcinomas ductales de grado II-III. La edad media de los pacientes era de 55 años, oscilando entre 35 y 84 años. Las fases del tumor oscilaron de T1 a T4 y de N0 a N4, el estado de metástasis se desconocía en todos los casos. Once muestras de tejido circundante del tumor procedían de pacientes cuya edad media era de 61 años, oscilando entre 46 y 84 años. Los tejidos normales se obtuvieron de 22 mamoplastias de reducción. La edad de los pacientes oscilaba entre 45 21 y 57, con una media de 36,5 años. Se extrajo ARN total de las muestras con el reactivo TRIZOL^R (Invitrogen). Se usó ARN total para sintetizar ADNc por transcripción inversa, utilizando Superscript II (Invitrogen) según el protocolo del fabricante en un volumen total de 20 µl.

50 Amplificación por PCR: todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un aparato Cepheid (Sunnyvale, CA) Smart Cycler, utilizando el formato de detección SYBR Green. Se añadieron 0,5 µl de ADNc a cada reacción de PCR en un volumen total de 25 µl, empleando el sistema de tampón de PCR estándar de Invitrogen con concentraciones optimizadas de MgCl₂. En cada ensayo se incluyó una reacción sin molde como control negativo. Las condiciones de PCR fueron de desnaturalización a 94°C durante 120 s, seguida de 35-40 ciclos de: fusión a 94°C durante 15 s, temperatura de hibridación específica para un juego de cebadores (tabla 2), extensión a 72°C y programa de curva de fusión (60-95°C a una velocidad de calentamiento de 0,2°C por segundo y medición continua de fluorescencia) y al final una etapa de enfriamiento a 4°C. La pureza y el tamaño del producto y la ausencia de cebadores dimerizados se confirmó analizando la curva de fusión de ADN y realizando una electroforesis en gel de agarosa. Las curvas de fusión dieron un solo pico máximo para todas las reacciones con molde y un pico de fusión mínimo (resultante de los cebadores dimerizados) o ningún pico de fusión para las reacciones de control sin molde.

60

Tabla 2: pares de cebadores para la RT-PCR en tiempo real

Secuencia diana	Cebador	Secuencia (SEQ ID N°:)	Tamaño del producto (bp)	[Mg ²⁺] (mM)	Hibridación (°C)
OPN-a	directo	5'-ATCTCCTAGCCCCACAGAAT-3' (1)	208	2,5	58
	inverso	5'-CATCAGACTGGTGAGAATCATC-3' (2)			
OPN-b	directo	5'-ATCTCCTAGCCCCAGAGAC-3' (3)	209	2,5	62
	inverso	5'-AAAATCAGTGACCAGTTCATCAG-3' (4)			
OPN-c	directo	5'-TGAGGAAAAGCAGAATGCTG-3' (5)	155	3,0	62
	inverso	5'-GTCAATGGAGTCCTGGCTGT-3' (6)			
β-Actina	directo	5'-GGCGGCACCACCATGTACCCT-3' (7)	200	2,0	65
	inverso	5'-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3' (8)			
Ck-19	directo	5'-CCCGCGACTACAGCCACTA-3' (9)	163	2,0	60
	inverso	5'-CTCATGCGCAGAGCCTGTT-3' (10)			
aP2	directo	5'-TCAGTGTGAATGGGGATGTG-3' (11)	249	1,6	58
	inverso	5'-GTGGAAGTGACGCCTTCAT-3' (12)			

Se indican las secuencias de los cebadores y los tamaños de los productos de PCR resultantes. Las concentraciones de magnesio y las temperaturas de hibridación están optimizadas en ensayos preliminares. Los juegos de cebadores para la osteopontina (OPN) se diseñaron para distinguir las variantes de empalme. Los juegos de cebadores para CK-19 (Benoy y otros, Brit. J. Canc. 91:1813-20, 2004), β-actina y aP-2 cubrieron dos exones diferentes para evitar la amplificación de cualquier ADN genómico contaminante. Para cada juego de cebadores se determinaron las eficiencias de amplificación analizando las curvas dosis-respuesta de ADNc.

- 5 Para la RT-PCR convencional las variantes de empalme de la osteopontina se amplificaron con pares de cebadores específicos [14]. La amplificación de GAPDH con los cebadores 5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT-3' (directo; SEQ ID N°: 13) y 5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3' (inverso; SEQ ID N°: 14) sirvió de control de la carga uniforme e integridad del ADNc. Todos los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa con tampón de Tris-acetato EDTA (2,5% p/v).
- 10 Inmunohistoquímica: una multimatriz de mama normal (Cybrdi, Fredrick, MD) que contenía 69 biopsias normales (más tres carcinomas ductales infiltrantes como referencias) y una multimatriz de carcinoma de mama que contenía 56 biopsias cancerosas confirmadas por el patólogo examinador (7 biopsias fueron diagnosticadas sin contenido de carcinoma y por consiguiente fueron excluidas) se tiñeron para detectar OPN-c. La matriz de carcinoma incluía carcinomas intraductales, carcinomas ductales infiltrantes, carcinomas lobulares infiltrantes, adenocarcinomas papilares, adenocarcinomas mucinosos y enfermedad de Paget.
- 15 Los análisis inmunohistoquímicos se efectuaron en la plataforma automatizada de tinción Discovery® o Benchmark® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). No se necesitó la recuperación de antígeno para la osteopontina-c. Los portaobjetos se incubaron durante 32 minutos a temperatura ambiente con una IgY de pollo anti-OPN-c purificada por afinidad (producida por Gallus Immunotech), diluida a 1:160. El anticuerpo secundario, de cabra anti-IgY de pollo conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), diluido a 1:80 en diluyente Ventana de anticuerpo (desprovisto de caseína y azida) se aplicó durante 16 minutos a temperatura ambiente. La fijación del anticuerpo se detectó con el kit de detección ChromoMap® DAB (Ventana Medical Systems). Para teñir la matriz de carcinoma mamario también se usaron anticuerpos monoclonales de conejo contra el receptor de estrógeno humano (ER, clon SP1), el receptor de progesterona (PR, clon 1E2) y el HER2 (clon 4B5) de VMSI, realizando la detección mediante el kit UltraView® DAB (VMSI). El anticuerpo primario se aplicó durante 16 minutos a 37°C y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP se aplicó durante 8 minutos a 37°C. Todos los portaobjetos se tiñeron con hematoxilina II (VMSI) durante 8 minutos como contraste y luego con Bluing Reagent (VMSI) durante 4 minutos a temperatura ambiente.
- 20
- 25
- 30 Las matrices de tejido fueron valoradas por un patólogo certificado por el consejo médico oficial. El citoplasma se evaluó empleando una escala típica de 1+ to 3+ para representar la intensidad, asignando el 3 a las muestras muy intensamente teñidas, 1 a las muestras débilmente teñidas y 0 a las muestras negativamente teñidas. Se calcularon las puntuaciones patológicas combinadas de las muestras individuales de las matrices de tejido, multiplicando la intensidad media (que va de 1 hasta 3) por el porcentaje medio de tejido teñido (que va de 0 hasta 100). La mayor puntuación posible es 300. Para asignar un grado tumoral se usó el sistema de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificado [15], que tiene en cuenta el grado nuclear, la formación de túbulos y la velocidad mitótica. Para asignar un grado 1, 2 o 3 se aplicó la combinación de las puntuaciones de estos factores.
- 35
- 40 Constructos y transfección de ADN: los constructos para expresar las variantes de empalme de la osteopontina humana se obtuvieron por PCR de transcripción inversa a partir de la línea celular MDA-MB-435 de tumor maligno de mama. La secuencia codificadora de osteopontina se amplificó con los cebadores 5'-CAA ACG CCG ACC AAG GGA AAA C-3' (SEQ ID N°: 15) y 5'-CTT CTT TCT CAG TTT ATT GGT-3' (SEQ ID N°: 16). El producto amplificado se sometió a clonación TA, se escindió con XhoI y NheI y se subclonó en el vector pCR3.1 (Invitrogen Carlsbad, CA).
- 45 Los genes clonados en este vector se expresan bajo el control del promotor CMV. La fidelidad de la secuencia y el

marco exacto de lectura se verificaron por análisis de secuenciación de ADN. Las células MCF-7 se transfectaron por el método de Fugene y los clones estables se seleccionaron con G418.

5 Ensayo inmunoblot: para analizar la osteopontina secretada se recogió sobrenadante del cultivo celular libre de suero de cada transfectante. De cada muestra se tomaron 40 ml de sobrenadante para electroforesis en minigeles de poliacrilamida-SDS del 10% con tampón de muestra no reductor. Para el análisis de la osteopontina intracelular las células se lisaron en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de Na al 0,5%, dodecil sulfato sódico al 0,1%). Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en geles reductores de poliacrilamida-SDS del 10% a igual proporción de proteína (20 mg/calle). Las proteínas separadas se transfirieron a membranas de PVDF y se sondaron con anticuerpo O-17 (Assay Designs Inc.) de osteopontina.

Ejemplo 2

15 El ARN de osteopontina-c se expresa en cáncer de mama pero no en tejido mamario normal

Este ejemplo describe resultados de la medición por RT-PCR en tiempo real de la expresión del gen de osteopontina en muestras de cáncer de mama, tejidos circundantes y muestras normales, utilizando cebadores específicos de las variantes de empalme y la amplificación de β -actina como control de abundancia.

20 Como las mamas contienen diversas cantidades de grasa y la fuente de osteopontina son selectivamente las células epiteliales, se midieron los niveles de citoqueratina-19 (CK-19, marcador epitelial) y aP2 (marcador adipocítico) y los resultados se ajustaron para representar la fracción de células epiteliales. Tal como se indica en las figuras 1A y 1B se detectó OPN-c en 16 de 20 tumores y los niveles de ARN tuvieron una abundancia relativa comparable a la forma completa de osteopontina-a. En cambio no hubo OPN-c detectable en ninguno de los tejidos normales examinados.

25 Siete de once tejidos normales circundantes de tumores estaban libres de OPN-c. No se sabe si las cuatro muestras normales que presentaron expresión de OPN-c tenían infiltración críptica por células tumorales o una reacción al tumor, por ejemplo como inflamación. Los cuatro tumores eran de grado 3 sin enfermedad de Paget, pero sus fases tumorales variaban.

30 Los niveles de expresión de OPN-a variaron en 21 muestras de mamas normales y solo cuatro muestras carecían de niveles detectables (FIGS. 1A y 1B). Esto puede reflejar la producción de osteopontina no empalmada, la cual es secretada fisiológicamente en la leche por células mamarias durante las fases del ciclo estrogénico. La variante de empalme OPN-b se encontraba a bajos niveles en 18 de 20 cánceres, en ocho de once tejidos circundantes de tumores y en seis de 22 mamas normales (FIGS. 1A y 1B).

35 Las valoraciones estadísticas se realizaron con los datos obtenidos en las mediciones de RT-PCR en tiempo real. Según los análisis de varianza (ANOVA) por rangos, los niveles de osteopontina-c en los tumores difieren ($p < 0,05$) de los niveles de OPN-c en las muestras normales. Los tejidos circundantes de tumores tienen valores intermedios, que no son diferentes de los tumores o de las muestras normales. Para la OPN-b se obtuvieron resultados análogos.

40 Para la osteopontina-a no se detectó ninguna diferencia entre los tres grupos de muestras. Se comparó entre grupos la proporción de positivos en ARN de OPN-c mediante la prueba de ji-cuadrado ($\chi^2 = 13,33$, $p < 0,001$) y resultó diferente entre mamas normales y cancerosas ($p < 0,0007$ por el test exacto de Fisher), mientras que no difirió de manera significativa entre tumores y tejidos normales circundantes ($p = 0,16$ por el test exacto de Fisher).

45 Cada serie de PCR incluía un control negativo sin molde y una muestra de referencia de ADNc conocido como control positivo. Para las variantes de empalme de la osteopontina y la β -actina el control positivo fue la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-435, que produce grandes cantidades de ARN para las tres formas de osteopontina. el control positivo para CK-19 fue la línea celular de tumores de mama MCF-7, mientras que la referencia para aP2 fue una muestra de mama grasa. Los niveles de OPN-a y de β -actina fueron muy reproducibles en estas muestras. El intervalo encontrado para los otros amplicones también indicó una buena reproducibilidad, pero era más amplio. La cuantificación exacta de la poca abundancia de mensajes de ARN está inherentemente más sujeta a fluctuaciones que la mayor abundancia de mensajes (FIG. 1C). En suma, con la inclusión de controles adecuados la exactitud de estas mediciones permitirá tomar decisiones sobre el diagnóstico o pronóstico basados en ellos.

55 Ejemplo 3

Los niveles de OPN-c están relacionados con el grado tumoral en histología

60 Se dirigió un anticuerpo IgY al sitio de empalme de la OPN-c. El anticuerpo reconoció selectivamente la OPN-c pero no la OPN-a en los análisis Western blots (FIG. 2A). En un ensayo ELISA de fase sólida el anticuerpo reaccionó fuertemente con GST-OPNc, pero solo débilmente con GST-OPNa, mientras que el anticuerpo de pan-osteopontina O-17 (Assay Designs Inc.) mostró una reactividad muy fuerte con ambas formas de GST-OPN.

65 Se realizó inmunocitoquímica en las líneas celulares con distintos niveles de expresión de osteopontina confirmados previamente [14]. En consecuencia se vio una fuerte tinción citoplasmática en células MDA-MB-435, pero no en células MCF-7 o ZR-75 (FIG. 2B). La tinción de tejido canceroso de mama con anticuerpo anti-hOPNc se comparó

con la del anticuerpo anti-pan-osteopontina O-17. El cáncer dio fuertemente positivo en osteopontina total y OPN-c. En ausencia de los respectivos anticuerpos primarios no se observó ninguna tinción (FIG. 2C).

5 El anticuerpo de OPN-c generado se usó para analizar matrices de tejido mamario por inmunocitoquímica. Como se ve en la FIG. 3A, tres de 69 mamas normales dieron una tinción positiva débil, mientras que todas las demás fueron negativas. Entre los carcinomas de mama, 43 de 56 biopsias (77%) se tiñeron positivamente para OPN-c, mientras que 13 muestras de tejido fueron negativas. Al analizar su correlación con el grado tumoral la tinción para OPN-c subió de grado 1 a grado 3 (FIG. 3B), independientemente de si se había usado la intensidad media, el porcentaje medio de positivos o la puntuación citoplasmática media combinada como modo de valoración (FIG. 3C).

10 Ejemplo 4

La OPN-c es un marcador más sensible del cáncer de mama que ER, PR o HER2

15 La respuesta de los receptores de factores de crecimiento, receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) y HER2 se puede incrementar en el cáncer de mama y se puede aprovechar en el diagnóstico para facilitar las decisiones terapéuticas. Por tanto la expresión de OPN-c se comparó con estos marcadores.

20 De las 56 biopsias 28 fueron positivas y 28 negativas en ER, 19 fueron positivas y 37 negativas en PR y hubo 14 positivas en HER2 y 42 negativas en HER2. Los tumores con elevada expresión de HER2 fueron bajos o negativos en ER y PR. En cambio la tinción de ER y PR fue alta en las muestras de cáncer de mama y baja o nula en HER2. Así como el grado de tumor creciente se relacionó con un aumento de la tinción positiva con OPN-c conforme a la puntuación media combinada, el porcentaje medio de positivos y la intensidad media (compárense las FIGS. 3B y 3C), el ER y el PR fueron esencialmente bajos en los tumores de mayor grado. El HER2 fue ligeramente mayor en los grados 2 y 3 que en el grado 1 (FIG. 4A).

30 Para determinar si la tinción citoplasmática para OPN-c de los carcinomas de mama estaba relacionada con la tinción de membrana de HER2 o con la tinción nuclear de ER y PR, las puntuaciones medias combinadas se compararon usando el coeficiente de correlación de rango de Spearman (SRCC) [16]. No hubo ninguna correlación significativa entre la OPN-c y estos tres marcadores mamarios. Mediante el SRCC solo se encontró una correlación hipotética con HER2 (FIG. 4B). Como gen metastásico la OPN-c es un marcador de distintas características del cáncer de mama en comparación con estos receptores de factor de crecimiento.

35 Luego se determinó si la OPN-c tiene valor diagnóstico en combinación con ER, PR y HER2. Aplicando un modelo de regresión logística [17, 18] resultó que la OPN-c fue el mejor predictor individual de un cáncer de grado 3 (valor ROC 0,809; valor ROC para ER 0,575, para PR 0,570, para HER2 0,551). Además la combinación de OPN-c, ER y HER2 puede diagnosticar tumores de grado 2-3 con gran fiabilidad (valor ROC 0,979) (FIG. 4C). En este modelo los valores elevados de OPN-c y HER2 corresponden a una mayor probabilidad de grado 2-3 y un valor más alto de ER corresponde a una menor probabilidad de grado 2-3. El PR tuvo poco valor predictivo.

40 El cáncer de mama triple negativo (falta de ER, PR y HER2) carece de la ventaja de una terapia específica y se relaciona con una difícil valoración del riesgo [19]. Para todos los grados de cáncer de mama, el 14% de biopsias de tejido positivas en OPN-c no se tiñeron con ER, PR o HER2. En concreto, para el mayor grado de cáncer (grado 3) aproximadamente el 35% de los casos de tinción con anticuerpo anti-OPN-c resultaron negativos para los otros 3 marcadores de cáncer mamario ensayados (tabla 3). Por consiguiente la OPN-c detecta una mayor fracción de cánceres de mama que ER, PR o HER2; por tanto puede indicar la transformación en aquellos casos en que fallan los otros tres marcadores.

45

Tabla 3: tinción histoquímica para OPN-c, ER, PR y HER2

Grado tumoral	n	OPN-c +, 3 receptores negativo	OPN-c +, 1 receptor positivo	OPN-c +, 2 receptores positivo	OPN-c +, 3 receptores positivo	todos negativos	OPN-c -, 1 receptor positivo	OPN-c -, 2 receptores positivo	OPN-c -, 3 receptores positivo
1	16	0%	12,5%	43,8%	0%	6,3%	6,3%	25,0%	6,3%
2	23	8,7%	56,5%	8,7%	0%	13,0%	13,0%	0%	0%
3	17	35,3%	41,2%	23,5%	0%	0%	0%	0%	0%
todos los grados	56	14,3%	39,3%	23,2%	0%	7,1%	7,1%	7,1%	1,8%

La comparación de los porcentajes de muestras teñidas positivamente en presencia de osteopontina-c, frente a los tres receptores de factor de crecimiento en las biopsias de la matriz de tejidos de carcinoma mamario, indica que la OPN-c es un marcador más sensible. También detecta una fracción de cánceres de mama triple negativos. Nótese que las muestras teñidas positivamente en presencia de uno o dos de los receptores se han omitido para mayor claridad.

5

Ejemplo 5

10

Expresión de OPN-c en otros cánceres

5 Aparte del cáncer de mama, la osteopontina se ha relacionado con la progresión de otras malignidades, incluyendo el cáncer de colon, el cáncer ovárico, el carcinoma hepatocelular y el glioblastoma. Se adquirió un número limitado de tumores de colon (n = 6), de sus tejidos circundantes (n = 4) y de muestras de colitis (n = 3) y se analizaron los niveles de expresión de las variantes de empalme de la osteopontina, usando RT-PCR en tiempo real.

10 Aunque el número de muestras es pequeño se encuentra que una proporción de carcinomas colorrectales produce osteopontina empalmada (tabla 4). En efecto, así como la OPN-a fue muy baja en los tumores (m = 0,024, intervalo 0-0,088) y moderada en los tejidos adyacentes (m = 0,258, intervalo 0-0,543), el mensaje de ARN para OPN-c se expresó a niveles muy elevados en los tumores (m = 0,474, intervalo 0-1,5) y a niveles moderados en los tejidos adyacentes (m = 0,255, intervalo 0-1,020). En las muestras de colitis la expresión de OPN-a fue baja, mientras que la OPN-b y la OPN-c apenas se podían detectar.

15 Al contrario que los tejidos mamarios, en que las muestras normales son accesibles por medio de mamoplastias de reducción, para el colon no se dispone de este tipo de fuente. La comparación con las muestras de colitis es algo aventurada porque hay varios tipos de células del sistema inmunitario que pueden producir osteopontina, aunque el empalme fisiológico del mensaje de osteopontina aún no se ha descrito. Estos resultados indican que la OPN-c es un marcador de invasividad, no solo del cáncer de mama, sino también de otras malignidades. Por tanto los métodos y kits aquí proporcionados no solo se pueden emplear para los cánceres mamarios, sino también para otro tipo de cánceres (p.ej. los que expresan OPN, como el cáncer adrenocortical, ameloblastoma, cáncer ampular, cáncer de vesícula, cáncer óseo, cáncer de mama, cáncer cervical, colangioma, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, cáncer gástrico, glioma, tumor de células granulares, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, mola hidatiforme, cáncer pulmonar, linfoma, melanoma, mesotelioma, mieloma, neuroblastoma, cáncer oral, osteocondroma, osteosarcoma, cáncer ovárico, cáncer pancreático, pilomatricoma, cáncer prostático, cáncer de células renales, tumor de glándulas salivales, tumores de tejidos blandos, nevus de Spitz, cáncer de células escamosas, cáncer teratoide y cáncer tiroideo. En estos tejidos la OPN-c se puede evaluar utilizando los métodos aquí proporcionados.

30 Tabla 4: expresión de osteopontina en otras muestras

Diagnosis	OPN-a		OPN-b		OPN-c	
	tumor	normal adyacente	tumor	normal adyacente	tumor	normal adyacente
tumores colorrectales						
adenocarcinoma	n = 6	n = 4	n = 6	n = 4	n = 6	n = 4
	0 - 0,088	0 - 0,543	0 - 0,034	0 - 0,069	0 - 1,5	0 - 1,020
	m = 0,024	m = 0,258	m = 0,009	m = 0,018	m = 0,474	m = 0,255
colitis						
diverticulitis	n = 1	n.a.	n = 1	n.a.	n = 1	n.a.
	m = 0,039		m = 0		m = 0	
colitis ulcerosa	n = 3	n.a.	n = 3	n.a.	n = 3	n.a.
	0,059 - 0,166		0 ~ 0,006		0 - 0,045	
	m = 0,106		m = 0,002		m = 0,015	

Ejemplo 6

35 Análisis de pacientes con resultado clínico conocido

Para detectar la presencia de OPN-c se analizan del modo descrito en el ejemplo 1 muestras clínicas de pacientes con cáncer de mama (por ejemplo DCIS) que tienen un resultado clínico conocido (por ejemplo, sin limitarse a ellos, vida o muerte después de 1, 3 o 5 años; con o sin recidiva después de 1, 3 o 5 años; con o sin metástasis tras un margen de tiempo determinado). El profesional experimentado reconocerá que los resultados clínicos se pueden definir de múltiples maneras.

45 Las muestras clínicas se estadificarán y clasificarán del modo descrito en el ejemplo 1. La presencia de OPN-c se detectará utilizando anticuerpos, tal como se describe en el ejemplo 1 (p.ej. tinción valorada mediante una escala típica de 1+ a 3+ o de 0 a 300). En algunos ejemplos las muestras clínicas también se analizan para ver la expresión de ER, PR y HER2, tal como se describe en el ejemplo 1. Se determinará la capacidad de la OPN-c para teñir las muestras de cáncer de mama, con el fin de predecir el resultado del paciente. Se espera que los pacientes con mayor expresión de OPN-c (p.ej. 3 en una escala 1+ a 3+) tendrán mayor probabilidad de resultado adverso (p.ej. muerte después de 1, 3 o 5 años del diagnóstico) respecto a pacientes con menor o ninguna expresión de OPN-c (p.ej. 0 o 1 en una escala 1+ a 3+). Los pacientes con menor expresión de OPN-c (p.ej. 1 en una escala 1+ a 3+) tendrán mayor probabilidad de resultado favorable (p.ej. vida después de 1, 3 o 5 años del diagnóstico).

Ejemplo 7

Clasificación del cáncer de mama en humanos

Este ejemplo describe métodos particulares que pueden usarse para clasificar un cáncer de mama tal como el DCIS en un paciente humano. Sin embargo un especialista en la materia apreciará que también se pueden usar métodos similares y otras muestras de cáncer (p.ej. del colon o de otro tejido según la relación del ejemplo 5) en lugar de las muestras de cáncer de mama. En algunos ejemplos esta clasificación se realiza antes de tratar al paciente.

Se toman muestras de células o de tejido canceroso de mama del paciente. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de una biopsia de tejido o de una aspiración con aguja mediante métodos rutinarios. En algunos ejemplos, si se usa una muestra de biopsia de tejido pueden obtenerse 1-100 mg de tejido, utilizando por ejemplo un aspirado con aguja fina. En ejemplos concretos las muestras se pueden utilizar directamente o se pueden manipular antes del uso, por ejemplo fijándolas (p.ej. con formalina) o embebiéndolas (p.ej. en plástico o parafina). En algunos ejemplos se aísla ARN o proteínas del tejido, empleando métodos rutinarios (por ejemplo usando un kit comercial).

En un ejemplo los niveles de proteína de OPN-c se determinan en una muestra de cáncer de mama obtenida del paciente. La muestra de cáncer de mama, por ejemplo de tejido o de células existentes sobre un substrato (como el portaobjetos de un microscopio) se incuba con un anticuerpo de OPN-c en un tampón adecuado durante un tiempo suficiente para que el anticuerpo se una a la OPN-c presente en la muestra. Los complejos OPN-c/anticuerpo se detectan por ejemplo usando un microscopio. En algunos ejemplos la muestra de cáncer de mama (u otra muestra del mismo paciente) se analiza para ver los niveles de proteína de ER, PR o HER2 usando anticuerpos idóneos.

Los complejos anticuerpo/proteína se pueden detectar mediante un marcador en el anticuerpo o con un anticuerpo secundario marcado. Los portaobjetos de las matrices teñidas resultantes se pueden valorar mediante microscopia óptica por parte de un patólogo, según los siguientes criterios:

Informe de resultado	Intensidad de la tinción	Observación al microscopio
Positivo: cualquier tinción IHC de membranas de células tumorales por encima del nivel de fondo, aunque la tinción circunferencial sea completa o incompleta, en más del 0% de células tumorales.	3+	Reactividad fuerte: la tinción suele ser marrón oscura hasta negra, pero no siempre, en un patrón de membrana completo, y produce un contorno grueso de la célula. Puede faltar reactividad citoplasmática o ser de intensidad moderada cuando la tinción de la membrana es muy intensa. Puede haber acentuación citoplasmática submembranosa.
	2,5	Reactividad intensa: sombras de tinción marrón de oscuridad media (intensidad). La reactividad membranosa es usual pero no siempre completa y produce un contorno circular de la célula neoplásica. La reactividad membranosa incompleta de intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática es de intensidad más débil que la reactividad membranosa.
	2+	Reactividad moderada: sombras de tinción marrón de oscuridad intermedia (intensidad). La reactividad membranosa es usual pero no siempre completa y produce un contorno circular de la célula neoplásica. La reactividad membranosa incompleta de intensidad moderada también se considera 2+. La reactividad citoplasmática es de intensidad más débil que la reactividad membranosa.
	1,5	Reactividad ligera: tinción membranosa de intensidad intermedia. Puede haber reactividad citoplasmática uniforme que implique todo el citoplasma, pero no debe evaluarse positivamente.
	1+	Reactividad débil: tinción membranosa tenue o marrón clara. Puede haber reactividad citoplasmática uniforme que implique todo el citoplasma, pero no debe evaluarse positivamente.
Negativo: ausencia de tinción de membrana por encima del fondo en todas las células tumorales. Presencia de tinción citoplasmática en ausencia de tinción de membrana.	0,5	Trazas de reactividad: indicios de tinción marrón con localización membranosa y citoplasmática indeterminada.
	0	Ninguna reactividad

La puntuación resultante se puede usar para clasificar, estadificar o pronosticar el tumor (véase p.ej. la tabla 1).

En otros ejemplos, la cantidad relativa de complejos de OPN-c (o de ER, PR, HER2)/anticuerpo en la muestra de cáncer de mama del paciente se puede comparar con un valor de referencia tal como una cantidad relativa de complejos de OPN-c (o de ER, PR, HER2)/anticuerpo presente en una muestra de mama normal o en una muestra de cáncer mamario de un paciente cuyo grado tumoral se conozca (p.ej. de grado 1, 2 o 3). La presencia importante de una mayor cantidad de complejos de OPN-c/anticuerpo en la muestra de cáncer de mama respecto al control indica que el paciente tiene un cáncer de grado o fase superior (p.ej. de grado 3) y un peor pronóstico, mientras que la presencia de una menor cantidad de complejos de OPN-c/anticuerpo indica que el paciente tiene un cáncer de grado o fase inferior (p.ej. de grado 1) y un mejor pronóstico.

En un ejemplo los niveles de expresión del ARNm de OPN-c se determinan en una muestra de cáncer de mama obtenida del paciente. El ADNc se genera a partir del ARN aislado de la muestra de cáncer de mama del paciente (utilizando por ejemplo un kit comercial de transcripción inversa). El ADNc de OPN-c se amplifica con cebadores adecuados (utilizando por ejemplo un marcador detectable) y se detectan los amplicones de OPN-c resultantes. La cantidad relativa de amplicones de OPN-c en la muestra de cáncer de mama se puede normalizar (p.ej. respecto a un gene de mantenimiento) y comparar con un valor de referencia tal como una cantidad relativa de amplicones de OPN-c en una muestra de mama normal o en una muestra de cáncer mamario de un paciente cuyo grado tumoral se conozca (p.ej. de grado 1, 2 o 3). La presencia de mayores cantidades de amplicones de OPN-c en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer de grado o fase superior (p.ej. de grado 3) y un peor pronóstico, mientras que la presencia de menores cantidades de amplicones de OPN-c en la muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer de grado o fase inferior (p.ej. de grado 1) y un mejor pronóstico.

REFERENCIAS

1. Chan y Sell. Tumor markers. In: Burtis CA Ashwood ER, editors. Tietz fundamental of clinical chemistry, 5ª ed. Philadelphia: WB Saunders; 2001. p. 390-413.
2. Henry NL, Hayes DF. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer [*Usos y abusos de los marcadores tumorales para el diagnóstico, el control y el tratamiento del cancer de mama primario y metastásico*]. Oncologist 2006; 11:541-552.
3. Clark GM. In: Harris JLM, Morrow M, Hellman S, editors. Diseases of the Breast [*Enfermedades de la mama*]. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. p. 461-485.
4. Andre F, Pusztai L. Molecular classification of breast cancer: implications for selection of adjuvant chemotherapy [*Clasificación molecular del cáncer de mama: implicaciones en la selección de quimioterapia adyuvante*]. Nat Clin Pract Oncol 2006;3:621-632.
5. Kleer y otros, EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells [*EZH2 es un marcador del cáncer de mama agresivo y promueve la transformación neoplásica de las células epiteliales del pecho*]. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:11606-11611.
6. Desruisseau y otros, Clinical relevance of amphiregulin and VEGF in primary breast cancers [*Importancia clínica de la anfirregulina y del VEGF en cánceres de mama primarios*]. Int J Cancer 2004; 111:733-740.
7. Zhang y otros, Growth factor signaling induces metastasis genes in transformed cells: molecular connection between Akt kinase and osteopontin in breast cancer [*La señalización del factor de crecimiento induce los genes metastásicos en células transformadas: conexión molecular entre la Akt cinasa y la osteopontina*]. Mol Cell Biol 2003;23:6507-6519.
8. Rudland y otros, Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer [*Importancia pronóstica de la proteína osteopontina relacionada con la metástasis en el cáncer de mama humano*]. Cancer Res 2002;62:3417-3427.
9. Singhal y otros, Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival [*Osteopontina elevada en el plasma en el cáncer de mama metastásico, asociada a mayor carga tumoral y menor supervivencia*]. Clin Cancer Res 1997; 3:605-611.
10. Weber GF, Ashkar S. Stress response genes - the genes that make cancer metastasize [*Genes de respuesta al estrés - los genes que causan metástasis del cáncer*]. J Mol Med 2000; 78:404-408.
11. Kon y otros, Antibodies to different peptides in osteopontin reveal complexities in the various secreted forms [*Anticuerpos de diferentes péptidos en la osteopontina revelan complejidades en las diversas formas secretadas*]. J Cell Biochem 2000; 77:487-498.
12. Crawford y otros, Distinct roles of osteopontin in host defense activity and tumor survival during squamous cell carcinoma progression in vivo [*Distintos papeles de la osteopontina en la actividad defensiva del huésped y supervivencia al tumor durante la progresión del carcinoma de células escamosas in vivo*]. Cancer Res 1998; 58:5206-5215.
13. Kasugai y otros, Differential regulation of the 55 and 44 kDa forms of secreted phosphoprotein 1 (SPP-1, osteopontin) in normal and transformed rat bone cells by osteotropic hormones, growth factors and a tumor promoter [*Regulación diferencial de las formas 55 y 44 kDa de fosfoproteína 1 (SPP-1, osteopontina) secretada en células óseas de rata normales y transformadas por hormonas osteotrópicas, factores de crecimiento y un promotor tumoral*]. Bone Miner 1991; 13:235-250.
14. He B, Mirza M, Weber GF. An osteopontin splice variant induces anchorage independence in human breast cancer [*Una variante de empalme de la osteopontina induce independencia de anclaje en el cáncer de mama humano*]. Oncogene 2006; 25:2192-2202.

15. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up [*Factores de pronóstico patológico en el cáncer de mama. I. El valor del grado histológico en el cáncer de mama: experiencia de un estudio amplio con seguimiento a largo plazo*]. *Histopathol* 1991; 19:403-410.
- 5 16. Lehmann EL, D'Abbrera HJM. Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks [*Métodos estadísticos no paramétricos basados en rangos*]. Prentice-Hall: Englewood Cliffs; 1998.
17. Bartfay y otros, Comparing the predictive value of neural network models to logistic regression models on the risk of death for small-cell lung cancer patients [*Comparación del valor predictivo de modelos de redes neurales con modelos de regresión logística sobre el riesgo de muerte para los pacientes de cáncer pulmonar de células pequeñas*]. *Eur J Cancer Care* 2006; 15:115-124.
- 10 18. Bassi y otros, Prognostic accuracy of an artificial neural network in patients undergoing radical cystectomy for bladder cancer: a comparison with logistic regression analysis [*Exactitud del pronóstico de una red neural artificial en pacientes sometidos a cistectomía radical en el cáncer de vesícula: comparación con el modelo de regresión logística*]. *BJU Int* 2007; 99:1007-1012.
- 15 19. Rakha y otros, Prognostic markers in triple-negative breast cancer [*Marcadores de pronóstico en el cáncer de mama triple-negativo*]. *Cancer* 2007; 109:25-32.

En vista de las muchas formas de ejecución posibles a las cuales pueden aplicarse los principios de la presente invención, debe reconocerse que las formas de ejecución expuestas son solo ejemplos de la presente invención que no deben tomarse como limitativos de su alcance, el cual está más bien definido por las reivindicaciones siguientes.

20

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Ventana Medical Systems, Inc.
 25 Universidad de Cincinnati
 Mirza, Mana
 Shaughnessy, Elizabeth
 Hurley, John K.
 Vanpatten, Kristie A.
- 30 Pestano, Gary
 Weber, Georg F.
- <120> CLASIFICACIÓN, ESTADIFICACIÓN Y PRONÓSTICO DEL CÁNCER MEDIANTE OSTEOPONTINA-C
 <130> 7668-79777-02
 <150> 60/980,379 <151> 2007-10-16 <160> 16
 35 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para OPN-a
 <400> 1
 atctcctagc cccacagaat 20
 <210> 2
- 45 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para OPN-a
 50 <400> 2
 catcagactg gtgagaatca tc 22
 <210> 3
 <211> 19
 <212> ADN
- 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para OPN-b
 <400> 3
 atctcctagc cccagagac 19
- 60 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
- 65 <223> Cebador oligonucleótido sintético para OPN-b
 <400> 4

5 aaaatcagtg accagttcat cag 23
 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para OPN-c
 <400> 5
 10 tgaggaaaag cagaatgctg 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para OPN-c
 <400> 6
 15 gtcaatggag tcctggctgt 20
 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para beta-actina
 <400> 7
 20 ggcggcacca ccatgtaccc t 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para beta-actina
 <400> 8
 25 aggggccgga ctcgtacatac t 21
 <210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para Ck-19
 <400> 9
 30 cccgcgacta cagccacta 19
 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para Ck-19
 <400> 10
 35 ctcatgcgca ggcctgtt 19
 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para aP2
 <400> 11
 40 tcagtgtaa tgggatgtg 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para aP2
 <400> 12
 45 gtggaagtga cgccttcat 20
 <210> 13

<211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador oligonucleótido sintético para GAPDH
 <400> 13
 tgaaggtcgg agtcaacgga ttggt 26
 <210> 14
 <211> 24
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para GAPDH
 <400> 14
 15 catgtgggcc atgaggtcca ccac 24
 <210> 15
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para osteopontina
 <400> 15
 caaacgccga ccaagggaaa ac 22
 <210> 16
 25 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador oligonucleótido sintético para osteopontina
 30 <400> 16
 cttcttctc agttattgg t 21

REIVINDICACIONES

1. Método para clasificar el cáncer de mama en un paciente, que consiste en:
 5 determinar el nivel de expresión de osteopontina-c (OPN-c) en una muestra de cáncer de mama y
 comparar dicho nivel de expresión con un control o valor de referencia,
 de manera que la presencia de mayores niveles de OPN-c indica que el paciente tiene un mayor grado de cáncer de
 mama y la presencia de menores niveles de OPN-c indica que el paciente tiene un menor grado de cáncer de
 mama.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en que el cáncer de mama es un carcinoma ductal *in situ* (DCIS).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que además consiste en determinar uno o más entre:
 niveles de expresión del receptor de estrógeno (ER) en la muestra de cáncer de mama;
 15 niveles de expresión del receptor de progesterona (PR) en la muestra de cáncer de mama; y
 niveles de expresión del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en la muestra de cáncer de
 mama y comparar dichos niveles de expresión con un control o valor de referencia, de modo que
 la ausencia ER y PR detectable y la presencia de OPN-c y HER2 detectable en la muestra de cáncer de mama
 indica que el paciente tiene un cáncer de mama más agresivo,
 20 la presencia de ER, PR detectable y menores niveles de expresión de HER2 y OPN-c indica que el paciente tiene un
 cáncer de mama menos agresivo, y la presencia de niveles de expresión importantes de HER2 y OPN-c en la
 muestra de cáncer de mama indica que el paciente tiene un cáncer de mama más agresivo.
4. El método de la reivindicación 1, en que la determinación del nivel de expresión de OPN-c consiste en
 25 detectar proteína de OPN-c.
5. El método de la reivindicación 1, en que la determinación del nivel de expresión de OPN-c consiste en
 detectar moléculas de ácido nucleico de OPN-c.
6. El método de la reivindicación 1, que además comprende la determinación del nivel de expresión de OPN-c
 30 en tejido no canceroso adyacente al tejido canceroso, en tejido normal o en ambos.
7. El método de la reivindicación 1 o 2, en que la muestra de cáncer de mama es negativa para uno o más
 receptores entre PR, ER y HER2.
- 35 8. El método de la reivindicación 1 o 2, que además comprende la elección de un protocolo de tratamiento del
 paciente basado en la detección de la OPN-c.
9. El método de la reivindicación 8, que además comprende la elección de un protocolo agresivo cuando se
 detecta OPN-c en la muestra de cáncer.
- 40 10. El método de la reivindicación 1 o 5, en que el nivel de expresión de OPN-c se normaliza respecto al nivel de
 expresión de un gen de mantenimiento.

FIG. 1 A

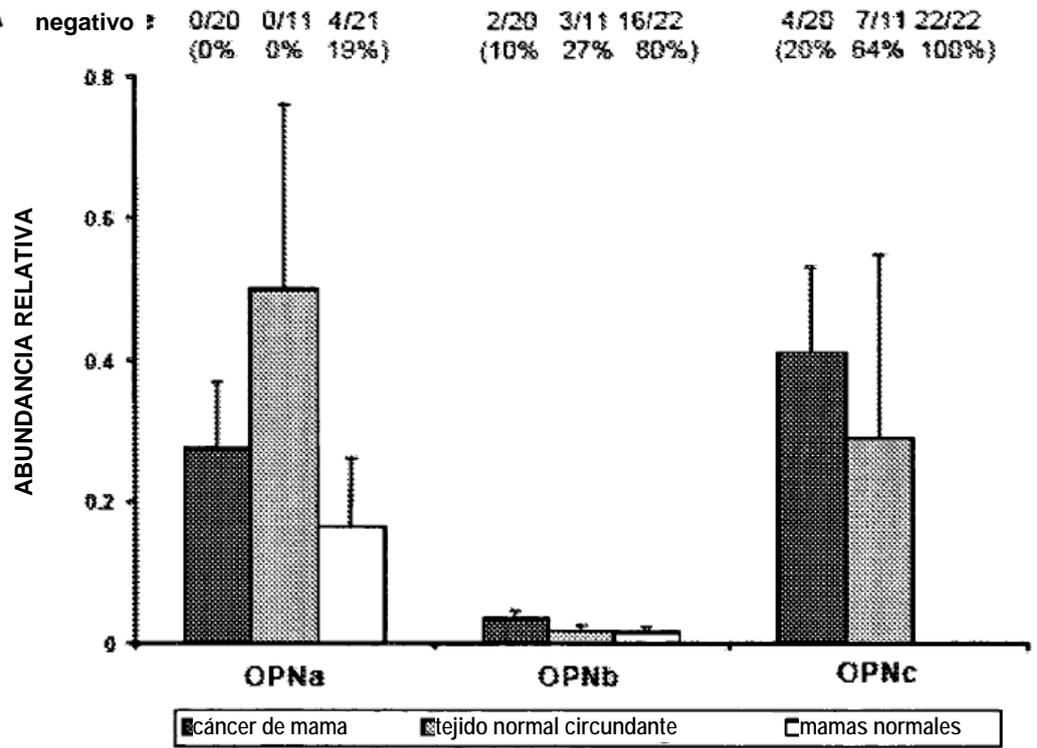


FIG. 1 B

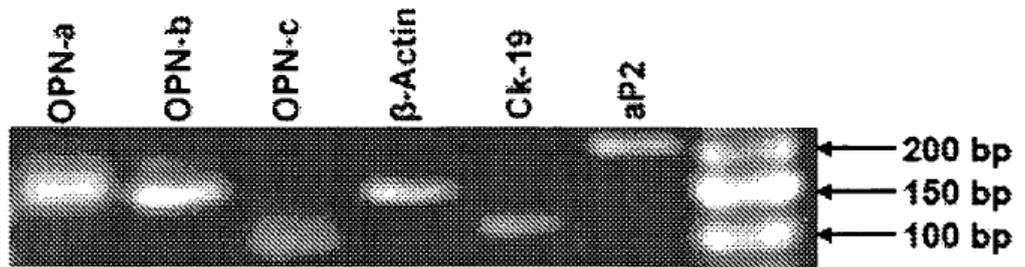


FIG. 1c

	MDA-MB-435			g-Actin	MCF-7	tumor graso
	OPN-a	OPN-b	OPN-c		CK-19	aP2
n	17	14	15	14	11	9
mean	17.27	21.58	30.02	16.35	23.91	24.27
std	0.77	1.71	2.53	0.83	2.68	3.11

FIG. 2A

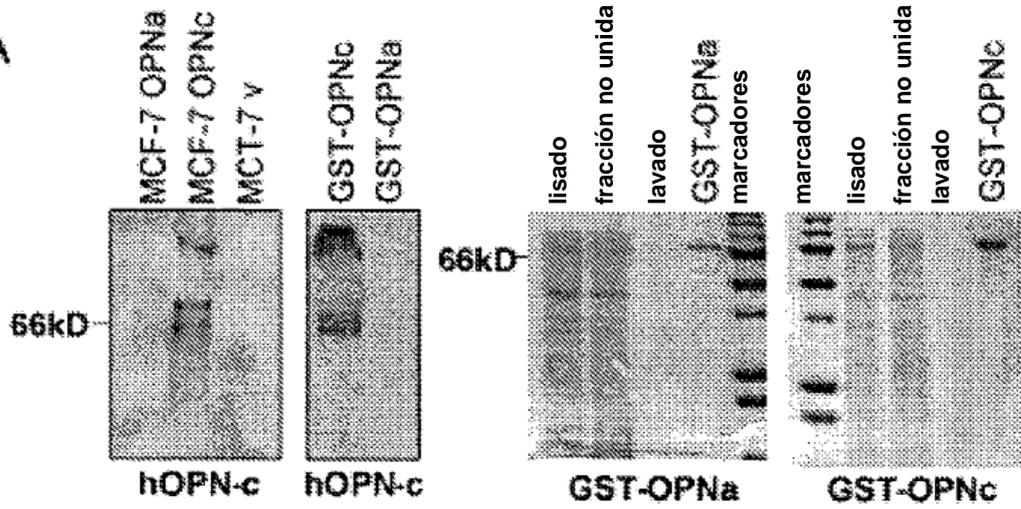


FIG. 2B

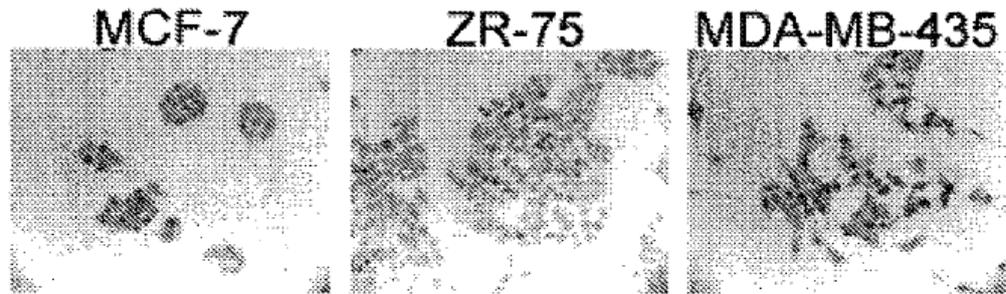


FIG. 2C

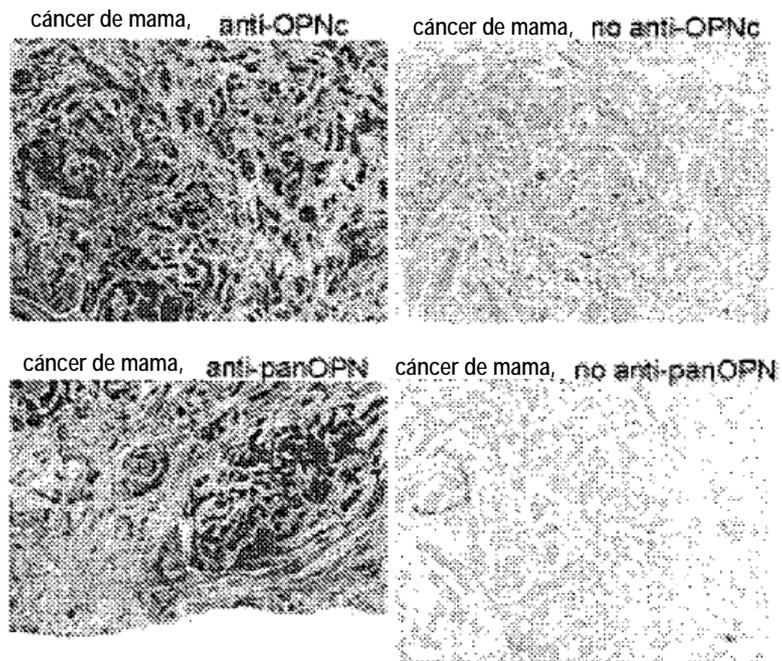


FIG. 3A

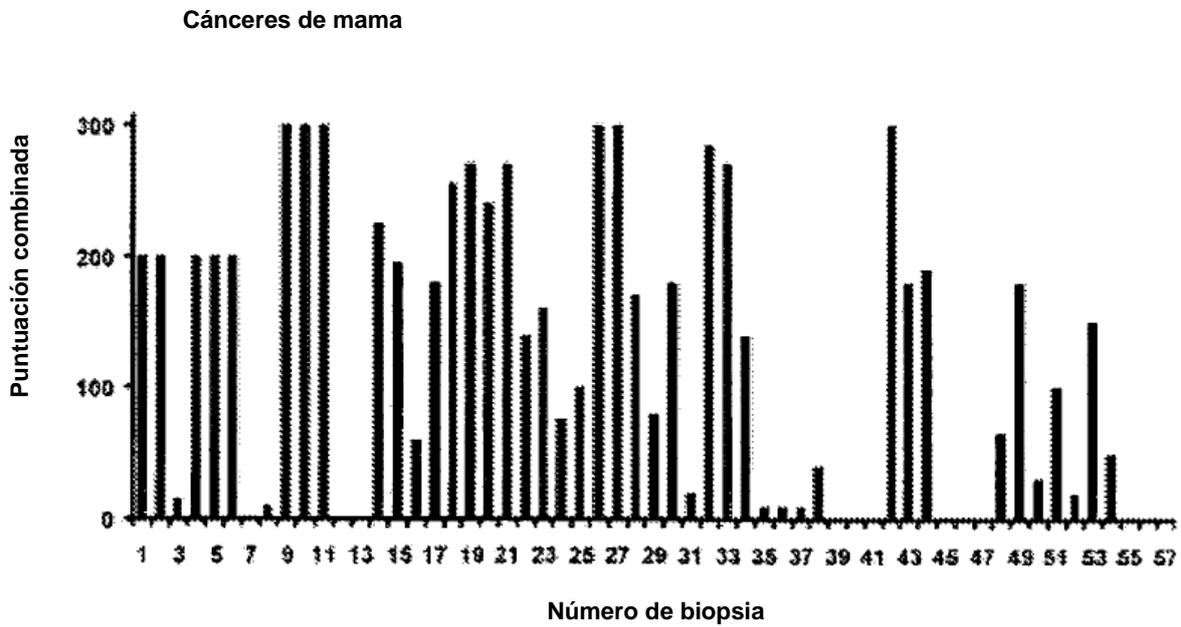
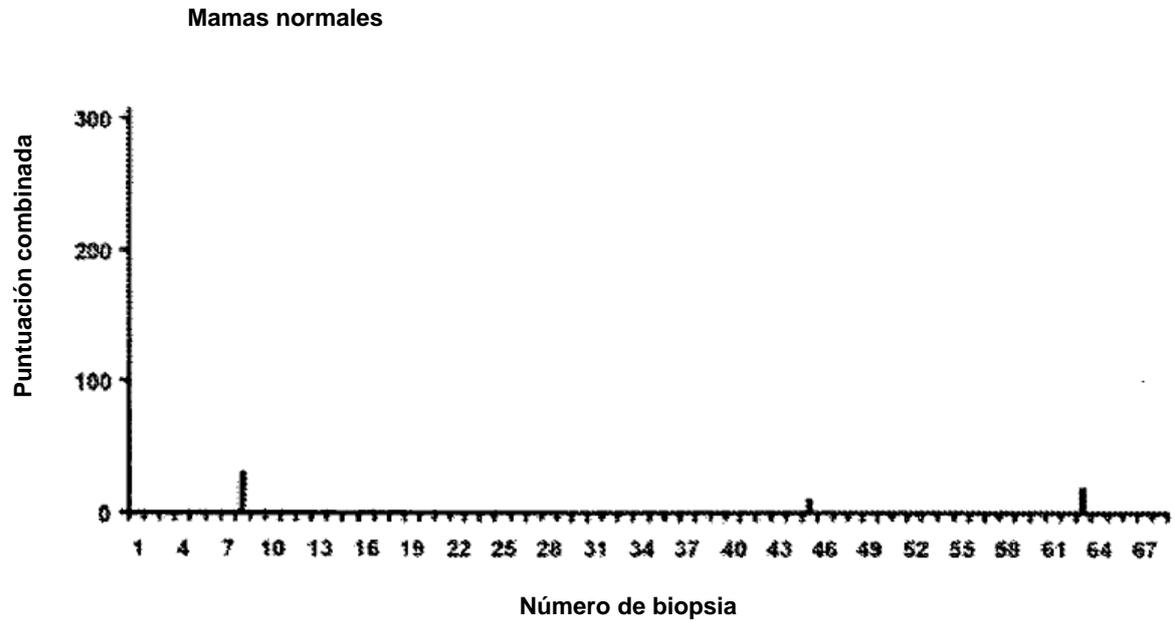


FIG. 3B

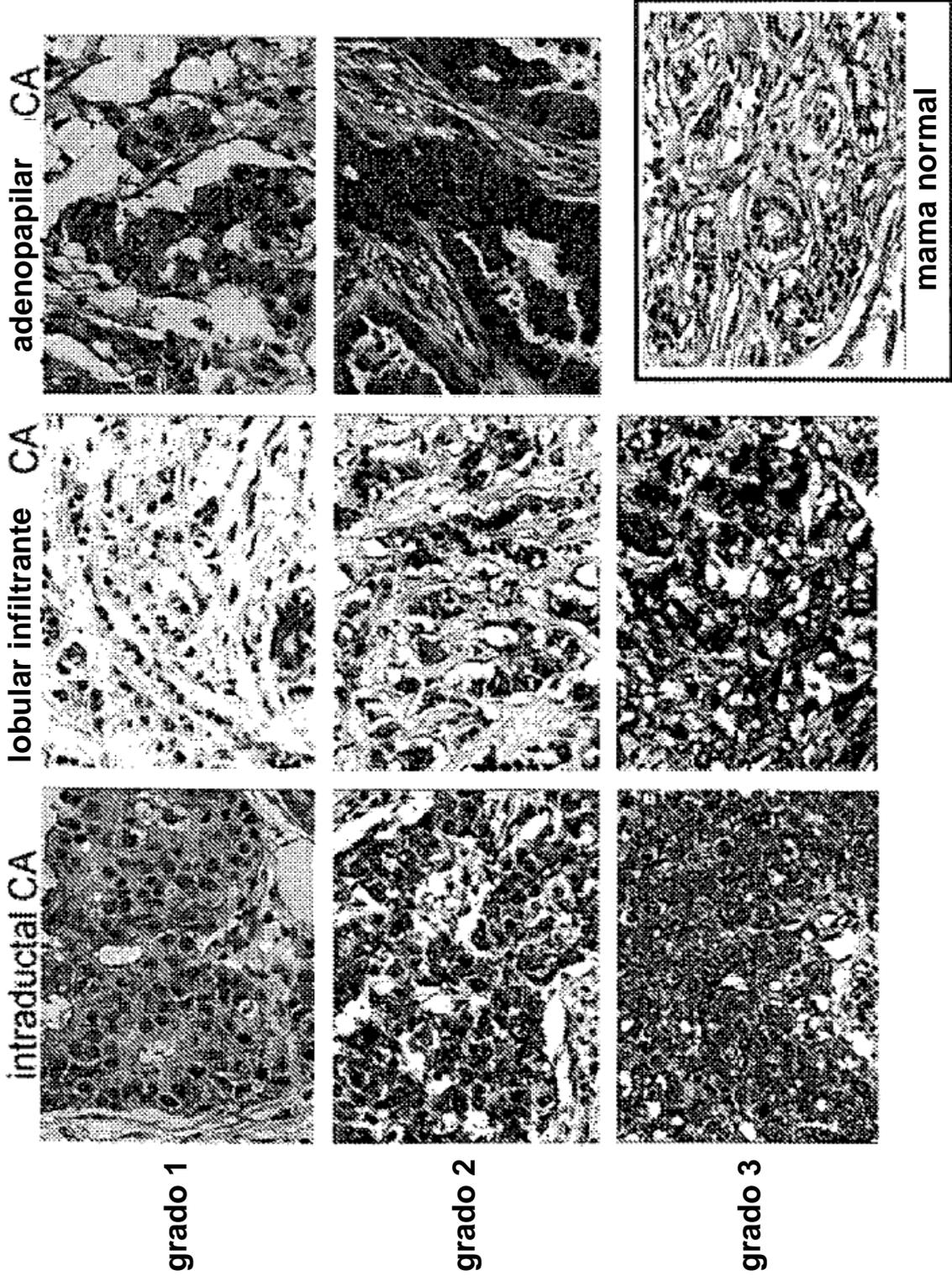


FIG. 3C

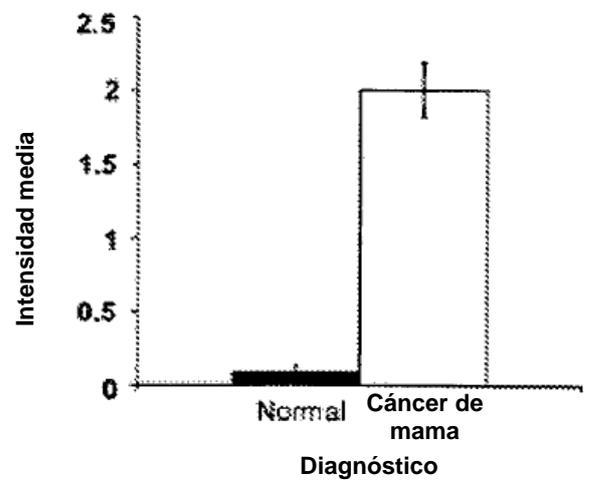
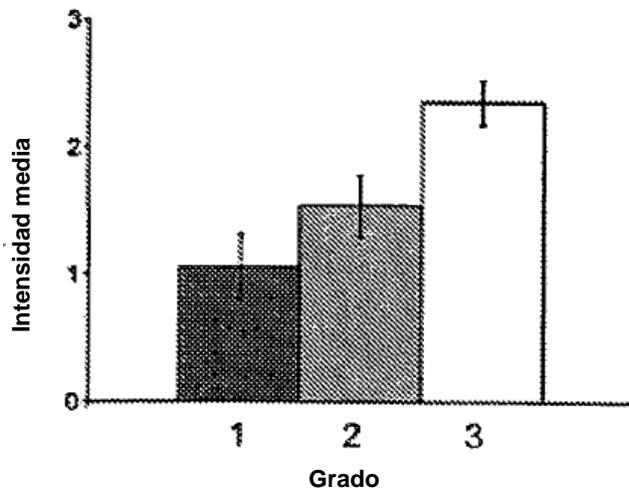
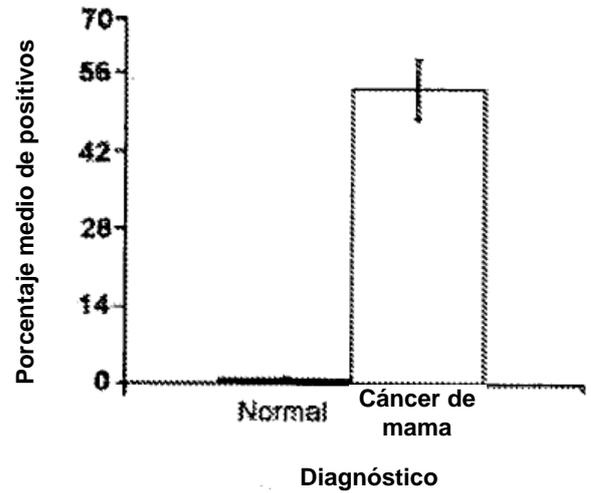
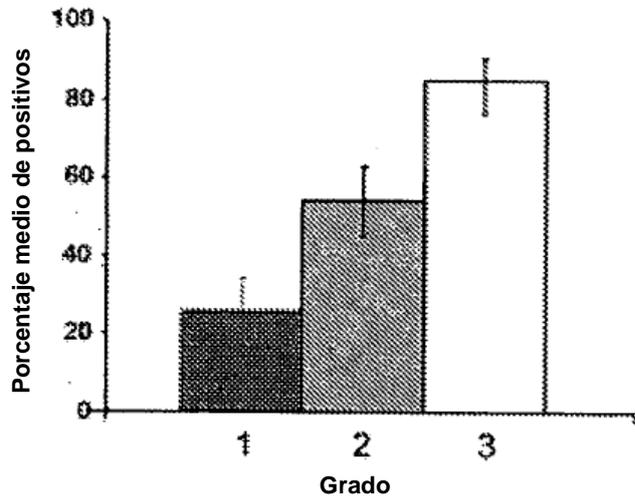
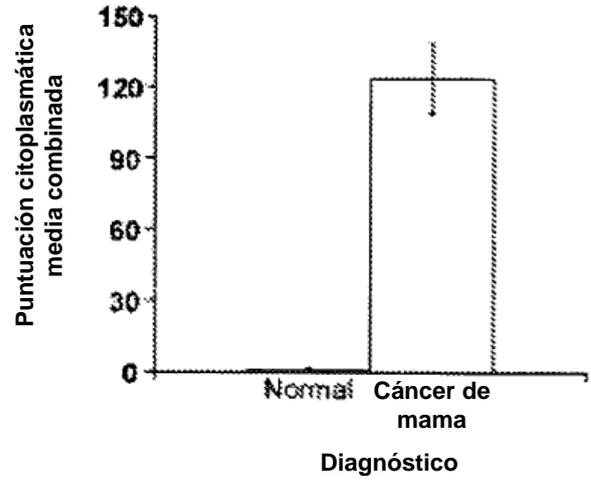
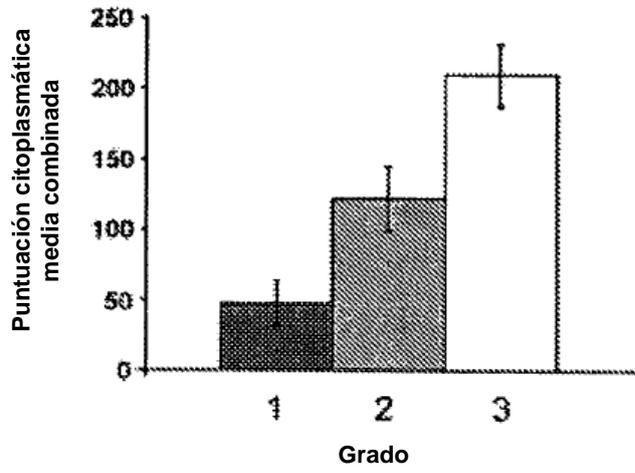


FIG. 4A

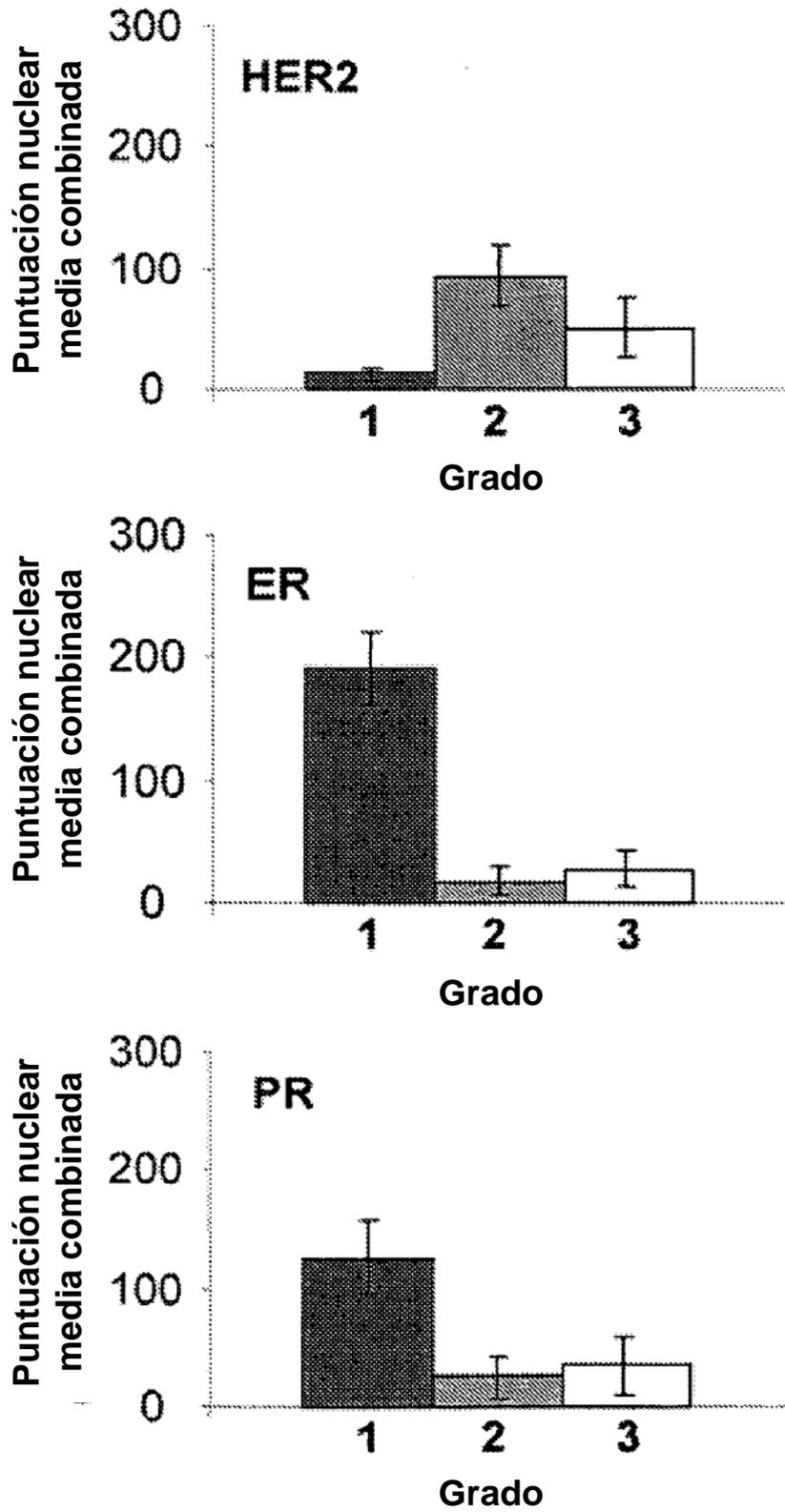


FIG. 4B

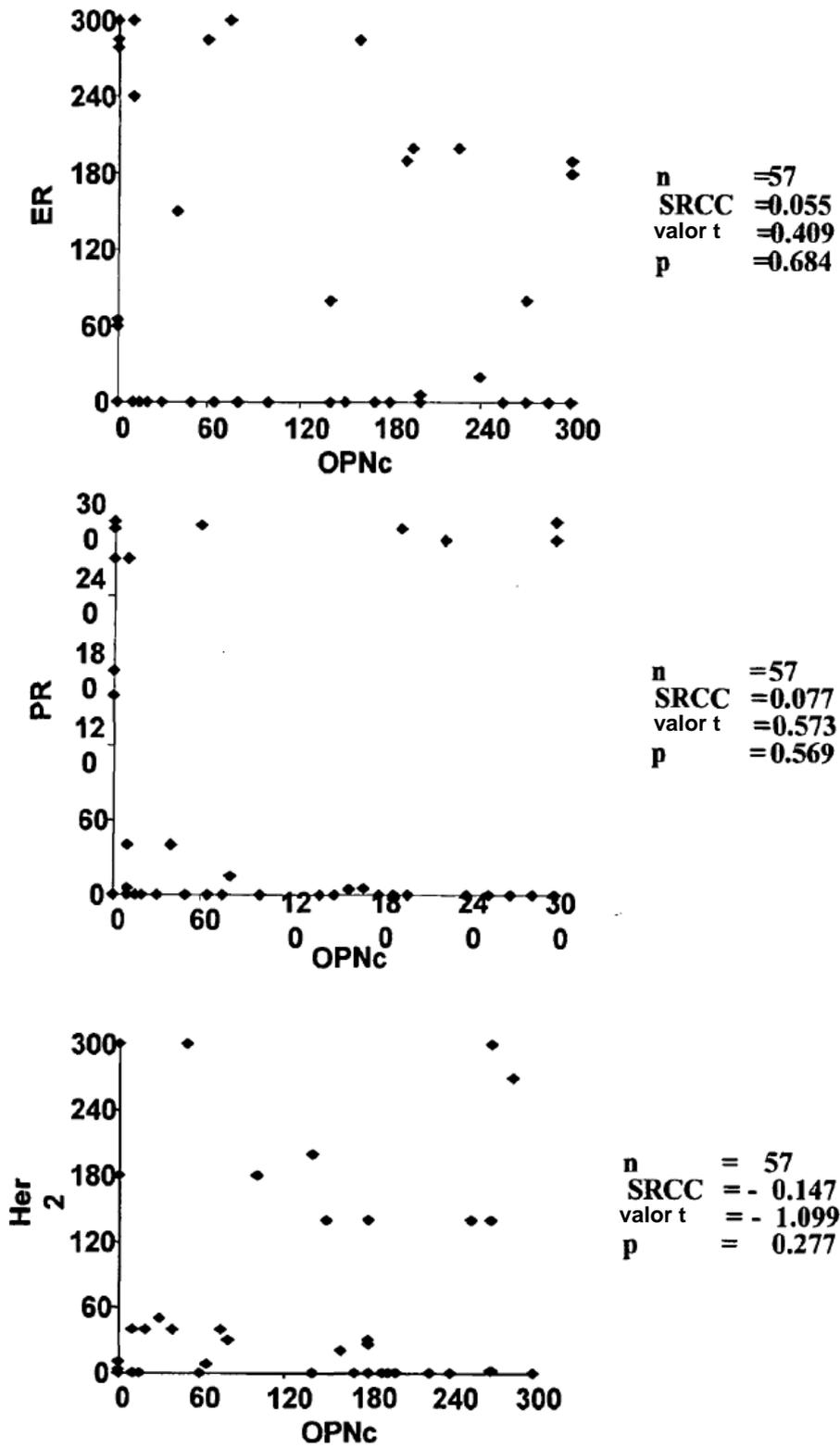


FIG. 4C

