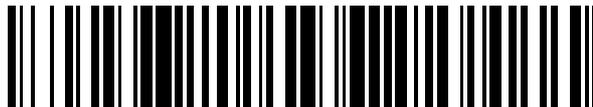


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 985**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2008** **E 08842854 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2015** **EP 2208072**

54 Título: **Métodos de pronóstico**

30 Prioridad:

22.10.2007 AU 2007905761

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

26.08.2015

73 Titular/es:

**ST VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY LIMITED
(100.0%)**

**CENTRE FOR IMMUNOLOGY VICTORIA STREET
DARLINGHURST, NSW 2010, AU**

72 Inventor/es:

**BREIT, SAMUEL NORBERT;
BROWN, DAVID ALEXANDER y
GRÖNBERG, HENRIK**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 543 985 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de pronóstico

5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de pronósticos médicos. En particular, la invención se refiere a métodos para predecir la progresión de cáncer de próstata y el pronóstico de la supervivencia global en un sujeto que implican la detección de cantidades elevadas de citocina inhibidora de macrófagos 1 (MIC-1) en una muestra corporal de prueba tal como suero.

Antecedentes de la invención

MIC-1 es un miembro divergente de la superfamilia de TGF- β clonado por primera vez basándose en una expresión de ARNm aumentada asociada con activación de macrófagos¹. Aunque MIC-1 no se expresa en macrófagos en reposo, la estimulación de macrófagos mediante varios mediadores biológicos incluyendo factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina 1 (IL-1) y factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) induce la expresión de MIC-1. Debido a esta inducción mediante muchas citocinas proinflamatorias, pero al no lograrse inducción directa mediante lipopolisacárido e interferón γ (IFN- γ), se ha planteado la hipótesis de que MIC-1 puede ser un regulador por disminución autocrino de la activación de macrófagos¹.

MIC-1 puede expresarse en varios tejidos³⁻⁶. Transferencias de tipo Northern de tejidos humanos indican la presencia de pequeñas cantidades de ARNm de MIC-1 en el riñón, páncreas y próstata, y grandes cantidades en la placenta^{3,5}. Se ha mostrado que los niveles de MIC-1 en suero aumentan con la edad en sujetos normales, aparentemente sanos⁶. Se ha asociado la sobreexpresión de MIC-1 con cáncer, particularmente cáncer de próstata⁷, y altas concentraciones en suero de MIC-1 se asocian con la presencia de enfermedad metastásica^{7,8}. También se ha detectado MIC-1 mediante inmunohistoquímica en biopsias de cánceres de mama, colon y próstata⁶. Sin embargo, no puede detectarse MIC-1 dentro de células epiteliales normales de estos órganos⁶. Esto, junto con la inducción de la expresión de MIC-1 mediante p53 y datos que sugieren que MIC-1 puede inducir apoptosis de algunas líneas celulares de tumor epitelial⁹⁻¹¹, indica un papel para MIC-1 en neoplasmas epiteliales.

Se han usado niveles anómalos de MIC-1 en una muestra en métodos para diagnosticar el riesgo de aborto espontáneo y/o parto prematuro, anomalías fetales, cáncer y enfermedad inflamatoria³⁵.

Se sabe que hay un aumento del nivel en suero de MIC-1 en algunos grupos de pacientes en comparación con individuos normales²⁹.

El cáncer de próstata se diagnostica con frecuencia mediante una concentración aumentada de antígeno prostático específico (PSA) en suero cuando el cáncer de próstata está localizado en la glándula prostática, aunque actualmente hay algunas preocupaciones sobre la precisión de esta prueba. Adicionalmente, la gestión del tratamiento de hombres con diagnóstico reciente de cáncer de próstata localizado sigue siendo un desafío clínico principal, ya que una alta proporción de sujetos con cáncer de próstata localizado sin tratar tienen un pronóstico excelente puesto que el cáncer de próstata habitualmente no es mortal y con frecuencia es asintomático, mientras que el tratamiento activo está asociado con un grave impacto sobre el estilo de vida (por ejemplo, pérdida de control urinario e impotencia) y morbilidad¹².

Actualmente, los métodos de distinción segura entre cánceres de próstata que seguirán un curso benigno, y aquellos que tienen un mal pronóstico, en los que una terapia radical puede ser beneficiosa, son inadecuados. La "suma de Gleason" (calculada de un máximo de 10) es un indicador que se usa actualmente para determinar la gravedad de cáncer de próstata: un tumor con una suma de Gleason inferior tiene tejido que está histológicamente más cerca del normal, y es menos probable que sea agresivo; mientras que un tumor con una suma de Gleason superior es más probable que sea un tumor agresivo. Sin embargo, esta técnica requiere una biopsia de la próstata y análisis histológico, y por consiguiente es una técnica invasiva y cara que requiere un análisis por expertos que requiere mucho tiempo.

Los tumores malignos se clasifican usando el sistema de clasificación de tumor-ganglio-metástasis (TNM) desarrollado y mantenido por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) para lograr un consenso sobre una norma mundialmente reconocida para clasificar el grado de propagación del cáncer³⁴. El estadio de TNM (I-IV) es un factor importante usado para entender la gravedad de cáncer de próstata. El sistema de TNM evalúa el tamaño del tumor (puntuación T), el grado de implicación de ganglios linfáticos (puntuación N), y cualquier metástasis

(puntuación M), así como usa una clasificación basada en la morfología celular de la que se deriva la suma de Gleason. En resumen, la puntuación T se clasifica de 0 (sin tumor) a 4; la puntuación N se clasifica de 0 (sin propagación a ganglios) a 3; y la puntuación M se clasifica de 0 (sin metástasis distante) a 1 (metástasis distante). Se da una clasificación de "X" para cualquier parámetro que no pueda evaluarse. El cáncer de próstata de estadio de TNM I tiene una puntuación de T1, N0 y M0 y una suma de Gleason de 4 o menos, y es cáncer que se encuentra secundariamente en una pequeña parte de la muestra, habitualmente debido a que se extrajo tejido de próstata por otros motivos; las células se parecen estrechamente a células normales y la glándula parece normal al examinarla al tacto. El cáncer de próstata estadio de TNM II tiene una puntuación de T1-T2, N0 y M0 y una suma de Gleason de 5 o más, y más parte de la próstata está implicada y puede sentirse un bulto dentro de la glándula. El cáncer de próstata de estadio de TNM III tiene una puntuación de T3, N0, M0 y cualquier puntuación de suma de Gleason, el tumor tiene propagación a través de la cápsula prostática y el bulto puede sentirse sobre la superficie de la glándula. El cáncer de próstata de estadio de TNM IV tiene una puntuación de T4, cualquiera de N, cualquiera de M y cualquier suma de Gleason, o cualquiera de T, cualquier suma de Gleason y o bien N1 y/o M1, y el tumor ha invadido estructuras cercanas, o tiene propagación a ganglios linfáticos u otros órganos.

Los pacientes con cáncer de próstata pueden someterse a una espera bajo vigilancia de su cáncer, o pueden tratarse mediante cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal, o alguna combinación de estas terapias. Los pacientes con enfermedad localizada que se gestionan mediante espera bajo vigilancia tienen una alta tasa de supervivencia libre de progresión^{13, 14}; sin embargo, un número significativo de hombres que eligen espera bajo vigilancia progresarán eventualmente a un estadio más agresivo de cáncer de próstata, en el que el tratamiento puede ser beneficioso. Los médicos carecen actualmente de herramientas para predecir con precisión el desenlace de la enfermedad y, por consiguiente, muchos pacientes con cáncer de próstata experimentan tratamiento local agresivo innecesario, con morbilidad significativa, sin ningún beneficio para la supervivencia¹⁵. Se ha propuesto la gestión mediante vigilancia activa con intervención retardada selectiva basándose en cambios tempranos de PSA como estrategia para reducir el tratamiento excesivo de pacientes con enfermedad indolente. Sin embargo, aunque tanto las mediciones de PSA de nivel inicial como la tasa de cambio de PSA son factores de pronóstico importantes, funcionan mal para distinguir entre quienes desarrollarán un cáncer de próstata mortal y aquellos con bajo o ningún riesgo de progresión de la enfermedad¹⁶.

El presente solicitante ha investigado si MIC-1 representa un biomarcador que pueda distinguir entre pacientes con tumores agresivos y aquellos con tumores que siguen un curso benigno. Para evaluar el valor predictivo de MIC-1 para determinar la progresión de cáncer de próstata, se midieron concentraciones en suero de MIC-1 en una cohorte basada en una gran población de pacientes con cáncer de próstata incidente con diversos estadios de enfermedad. Se encontró sorprendentemente que la concentración en suero o plasma de MIC-1 puede tener información de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de próstata, y como tal, MIC-1 ofrece un potencial considerable como biomarcador valioso para predecir la progresión de cáncer de próstata, y además, que concentraciones de MIC-1 elevadas pueden ser útiles para determinar métodos de tratamiento apropiados para cáncer de próstata. Adicionalmente, el presente solicitante comparó concentraciones en suero de MIC-1 durante cáncer de próstata con concentraciones en suero de MIC-1 en una población de control sana y, sorprendentemente, determinó que además de estar asociadas con la edad, las concentraciones en suero de MIC-1 elevadas estaban inversamente asociadas con la supervivencia global en sujetos aparentemente sanos.

Por consiguiente, el presente solicitante ha encontrado que las concentraciones en suero de MIC-1 pueden ser una herramienta útil para predecir la mortalidad en pacientes con cáncer de próstata así como en las poblaciones aparentemente sanas.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de pronóstico de la supervivencia global de un sujeto aparentemente sano, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de muerte del sujeto.

Un segundo aspecto de la descripción proporciona un método de pronóstico de cáncer de próstata en un sujeto varón, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba del sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de progresión de cáncer de próstata.

Un tercer aspecto de la descripción proporciona un método de selección de sujetos, a los que se les ha diagnosticado cáncer de próstata, que se beneficiarán de tratamiento activo para cáncer de próstata, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba del sujeto, en el que la

cantidad elevada de MIC-1 indica que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata.

Un cuarto aspecto de la descripción proporciona un método de selección de sujetos para terapia adyuvante tras el tratamiento de cáncer de próstata, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba del sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 indica que el sujeto se beneficiará de terapia adyuvante.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 proporciona un gráfico que muestra diagramas de cajas de concentraciones en suero de MIC-1 (pg/ml) entre una población de control no afectada por edad;

la figura 2 proporciona un gráfico que muestra concentraciones en suero de MIC-1 por estadio clínico de enfermedad en casos de cáncer de próstata;

la figura 3 proporciona gráficos que demuestran la relación entre la concentración en suero de MIC-1 y la supervivencia específica para cáncer de próstata para o bien (A, B y C) todos los sujetos o bien (D, E y F) sujetos con enfermedad localizada. (A, D) Estimaciones de Kaplan-Meier de la supervivencia estratificadas por cuartiles de concentraciones en suero de MIC-1. (B, E) Diagramas de área bajo la curva incidentes/dinámicos que demuestran la precisión de la concentración en suero de MIC-1, combinación de PSA y suma de Gleason, y combinación de concentración en suero de MIC-1, PSA y suma de Gleason como pruebas para cáncer de próstata mortal hasta seis años tras la extracción de sangre, las líneas representan gráficamente las estimaciones del área bajo la curva frente al tiempo desde que se extrajo la sangre basándose en un modelo de riesgos multiplicativos de coeficiente variable. (C, F) Resumen de concordancia global para el modelo predictivo incluyendo sólo MIC-1, la combinación de PSA y suma de Gleason, y la combinación de MIC-1, PSA y suma de Gleason. Se aplicó un análisis de tipo *bootstrap* no paramétrico basado en remuestreo de covariables y observaciones de supervivencia para determinar el intervalo de confianza (IC) para el resumen de concordancia global;

la figura 4 proporciona representaciones gráficas de Kaplan-Meier que demuestran que el nivel de MIC-1 en suero estratifica sujetos aparentemente sanos de toda la cohorte de la población de control de hombres que murieron dentro del periodo de seguimiento (A) cuando se estratifican los sujetos mediante la mediana de MIC-1 en suero (el 82% con niveles de MIC-1 por encima de la mediana sobrevivieron en comparación con el 94% de aquellos con niveles de MIC-1 por debajo de la mediana; $p < 0,0001$); y (B) cuando se estratifican los sujetos mediante cuartiles de MIC-1 en suero;

la figura 5 proporciona representaciones gráficas de Kaplan-Meier que demuestran que los cuartiles del nivel de MIC-1 en suero predicen el riesgo de mortalidad futura en la cohorte de gemelos;

la figura 6 proporciona gráficos que demuestran que el nivel de MIC-1 en suero está significativamente relacionado con el tiempo de supervivencia y es independiente del contexto genético en (A) parejas de gemelos monocigóticos (MZ; $r = 0,419$; $p < 0,0001$) y (B) en parejas de gemelos dicigóticos (DZ; $r = 0,342$; $p = 0,0046$), y esas correlaciones no fueron significativamente diferentes (razón de riesgo relativo = 1,27; IC del 95% = 0,63-2,53); y

la figura 7 proporciona un gráfico que demuestra la incidencia acumulativa de mortalidad por cáncer de próstata estratificada por cuartiles de concentración en suero de MIC-1 entre 1.442 pacientes con cáncer de próstata.

Descripción detallada de la invención

El presente solicitante ha identificado sorprendentemente que MIC-1 en suero es un potente factor de predicción de la mortalidad por cualquier causa en sujetos aparentemente sanos, que puede identificar a pacientes con riesgo aumentado de mortalidad, permitiendo posiblemente una investigación e intervención para mejorar la calidad de vida y reducir los costes de atención sanitaria.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de pronóstico de la supervivencia global de un sujeto aparentemente sano, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de muerte del sujeto.

Tal como se usa en el presente documento, el término "supervivencia global" debe entenderse como que se refiere a

la supervivencia de un sujeto aparentemente sano; más particularmente, que el sujeto no muere por ninguna causa distinta de accidente o infortunio (por ejemplo, el sujeto no muere por una causa médica tal como una enfermedad o estado potencialmente mortal tal como cáncer, particularmente un cáncer epitelial tal como cáncer de próstata, y enfermedad y acontecimientos cardiovasculares) o, en otras palabras, el sujeto no muere debido a mortalidad por cualquier causa. El término "sujeto aparentemente sano" tal como se usa en el presente documento, debe entenderse como que se refiere a un sujeto sin síntomas aparentes ni efectos patológicos de enfermedades o estados potencialmente mortales (tales como los mencionados anteriormente). Preferiblemente, el sujeto está aparentemente sano en el momento de tomar la muestra corporal de prueba de dicho sujeto.

Según el primer aspecto de la presente invención, debe entenderse que la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba predice una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio (es decir la cantidad elevada de MIC-1 proporciona un pronóstico de la muerte probable del sujeto aparentemente sano). También debe entenderse que cuando no hay una cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba (por ejemplo cuando la cantidad de MIC-1 detectada está en el intervalo, o por debajo del mismo, que se considera que es normal), el método del primer aspecto predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de supervivencia global.

En algunas realizaciones, la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba predice una probabilidad aumentada de muerte debida a cáncer o una enfermedad cardiovascular u otros acontecimientos médicos potencialmente mortales.

En algunas realizaciones, la cantidad elevada de MIC-1 predice una probabilidad aumentada de muerte del sujeto en el plazo de un periodo de 10 años, o de otro modo en el plazo de 5 años, desde la toma de la muestra corporal de prueba. En algunas realizaciones, la cantidad elevada de MIC-1 predice una probabilidad aumentada de muerte del sujeto en el plazo de 3 años, o de otro modo en el plazo de 1 año, desde la toma de la muestra corporal de prueba.

La cantidad de lo que puede considerarse una "cantidad elevada" de MIC-1 para los fines del método del primer aspecto de la presente invención puede variar según el tipo de muestra corporal particular usado y la edad del sujeto.

La muestra corporal de prueba preferida para su uso en el método del primer aspecto es una muestra de suero; sin embargo, también puede ser adecuada una muestra de líquido amniótico, extracto de placenta, sangre completa, plasma sanguíneo, capa leucocítica, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido seminal, líquido sinovial o una biopsia de tejido. Los expertos en la técnica entenderán que una cantidad de MIC-1 en una muestra corporal puede determinarse como una concentración o nivel de MIC-1 en dicha muestra corporal. Además, los expertos en la técnica entenderán que la concentración de MIC-1 en una muestra de suero es sustancialmente equivalente a la concentración de MIC-1 en una muestra de plasma dado que el principal componente del plasma es suero, constituyendo la diferencia simplemente en fibrinógeno y otros factores de coagulación. Además, los expertos en la técnica entenderán que la concentración de MIC-1 en una muestra de suero o plasma corresponde aproximadamente al doble de la concentración de MIC-1 en una muestra de sangre completa, dado que la sangre completa comprende aproximadamente la mitad de suero o plasma.

Por consiguiente, para una muestra de suero, una cantidad de >1 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio, mientras que una cantidad de MIC-1 de $>1,3$ ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice fuertemente que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio. Además, una cantidad de MIC-1 de $> 1,6$ ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice incluso más fuertemente que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio.

Anteriormente se ha mostrado que el intervalo normal de niveles de MIC-1 en suero es aproximadamente de desde 0,2 hasta 1,150 ng/ml²⁹; sin embargo, el presente solicitante ha mostrado que MIC-1 tiende a aumentar con la edad.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la cantidad de MIC-1 en una muestra de suero que es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio, es una cantidad en el heptil superior de niveles de MIC-1 determinados para sujetos aparentemente sanos de edad coincidente. Como tal, una cantidad de MIC-1 en una muestra de suero que es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio puede ser $>0,543$ ng/ml para sujetos de 45 a 54 años de edad, $>0,626$ ng/ml para sujetos de 55 a 59 años de edad, $>0,831$ ng/ml para sujetos de 60 a 64 años de edad, $>0,926$ ng/ml para sujetos de 65 a 69 años de edad, $>1,025$ ng/ml para sujetos de

70 a 74 años de edad, y >1,260 ng/ml para sujetos de 75 a 79 años de edad.

5 Sin embargo, en realizaciones preferidas, la cantidad de MIC-1 en una muestra de suero que es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio, es una cantidad en el cuartil superior de niveles de MIC-1 determinados para sujetos aparentemente sanos de edad coincidente. Como tal, una cantidad de MIC-1 en una muestra de suero que es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio puede ser >0,679 ng/ml para sujetos de 45 a 54 años de edad, >0,914 ng/ml para sujetos de 55 a 59 años de edad, >1,087 ng/ml para sujetos de 60 a 64 años de edad, >1,199 ng/ml para sujetos de 65 a 69 años de edad, >1,430 ng/ml para sujetos de 70 a 74 años de edad, y > 1,765 ng/ml para sujetos de 75 a 79 años de edad.

15 La cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante inmunoensayos tales como ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunohistoquímica (por ejemplo con muestras cortadas en secciones de una biopsia de tejido) usando anticuerpos anti-MIC-1 o fragmentos de los mismos. Pueden producirse anticuerpos anti-MIC-1 y fragmentos de los mismos mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

20 En una realización del primer aspecto de la presente invención, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante:

(i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

25 (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de sujeto(s) normal(es).

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto normal" se refiere a un sujeto que no muere por ninguna causa distinta de accidente o infortunio en el plazo de 10 años desde la toma de la(s) muestra(s) corporal(es) comparativa(s).

35 En algunas realizaciones, el/los sujeto(s) normal(es) es/son de edad coincidente, en las que el/los sujeto(s) normal(es) está(n) dentro de 10 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Más preferiblemente, el/los sujeto(s) normal(es) está(n) dentro de 5 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante.

40 Debe entenderse que cuando se detecta una cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba, cuanto mayor es la diferencia de esa cantidad con respecto a la del/de los sujeto(s) normal(es), más fuertemente predice esa cantidad elevada que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio. Por tanto, en algunas realizaciones, una diferencia en la cantidad de MIC-1 detectada en la muestra de suero corporal de prueba y la del/de los sujeto(s) normal(es) de >0,3 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio, mientras que una diferencia de >0,6 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica más fuertemente que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio.

45 En algunas realizaciones del primer aspecto de la presente invención, la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando mediciones en serie (nota: cuando se detecta una disminución en la cantidad de MIC-1 tras mediciones en serie, el método predice que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de supervivencia global). Por consiguiente, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede determinarse en puntos de tiempo diferentes en el mismo sujeto. Por ejemplo, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede detectarse a determinados intervalos de tiempo. Los intervalos de tiempo pueden determinarse para cada caso según las necesidades del sujeto. Los intervalos de tiempo pueden ser, por ejemplo, de tres meses, un año, cinco años o diez años, pero debe entenderse que los intervalos de tiempo pueden ajustarse según cualquier factor médico y de salud relevante del sujeto. Por consiguiente, puede detectarse una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba dentro de un sujeto comparando la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba en un punto de tiempo dado con la cantidad de MIC-1 en la misma muestra corporal de prueba en un punto de tiempo anterior. De esta manera, puede detectarse una cantidad elevada de MIC-1 determinando un aumento de la cantidad de MIC-1 presente en la muestra corporal de prueba dentro de cualquier sujeto dado a lo largo del tiempo.

Por consiguiente, en una realización del primer aspecto de la presente invención, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando una medición en serie mediante:

- 5 (i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y
- (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior.

10 En una realización de este tipo, la cantidad de MIC-1 aumentada dentro de un sujeto puede ajustarse para compensar el aumento de MIC-1 normalmente asociado con el aumento de edad del sujeto.

15 Debe entenderse que un mayor aumento de la cantidad de MIC-1 detectada en el sujeto tras mediciones en serie predice más fuertemente que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio que un aumento menor. En algunas realizaciones, un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de $>0,3$ ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio, mientras que un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de $>0,6$ ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica más fuertemente que el sujeto tiene una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio.

20 En algunas realizaciones del primer aspecto de la invención, el sujeto es un hombre. En otras realizaciones del primer aspecto de la invención, el sujeto es una mujer.

25 Además, en algunas realizaciones, el sujeto tiene más de 35 años de edad o, más preferiblemente, más de 45 años de edad. Sin embargo, en otras realizaciones, el sujeto puede tener más de 55 años de edad, o más de 65 años de edad, o incluso más de 75 años de edad.

30 En un segundo aspecto, también se describe en el presente documento un método de pronóstico de cáncer de próstata en un sujeto varón, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba del sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de progresión de cáncer de próstata.

35 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de progresión hacia cáncer de próstata agresivo. Tal como se usa en el presente documento, el término "cáncer de próstata agresivo" debe entenderse como que se refiere a cáncer de próstata que es probable que avance hacia un cáncer de próstata más potencialmente mortal, es decir, que avance hacia un estadio más grave y perjudicial y/o presente metástasis. En algunos cánceres agresivos, esto puede suceder a una tasa mayor que lo que se produce generalmente para cánceres menos agresivos, por ejemplo, los cánceres agresivos pueden avanzar hacia estadios más graves y perjudiciales a lo largo del transcurso de uno o más años. En otros ejemplos de cánceres agresivos, esto puede producirse incluso más rápidamente, tal como a lo largo del transcurso de uno a tres meses.

45 Según el segundo aspecto descrito en el presente documento, la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de progresión de cáncer de próstata y, por consiguiente, una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata.

50 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la cantidad elevada de MIC-1 predice una probabilidad de muerte del sujeto debido al cáncer de próstata en el plazo de un periodo de 10 años, o de otro modo en el plazo de 5 años, desde la toma de la muestra. En algunas realizaciones, la cantidad elevada de MIC-1 predice una probabilidad aumentada de muerte del sujeto en el plazo de 3 años, o de otro modo en el plazo de 1 año desde la toma de la muestra corporal de prueba.

55 La cantidad de lo que puede considerarse una "cantidad elevada" de MIC-1 para los fines del método del segundo aspecto descrito en el presente documento, puede variar según el tipo de muestra corporal particular usado y la edad del sujeto.

La muestra corporal de prueba preferida para su uso en el método del segundo aspecto es una muestra de suero;

sin embargo, otras muestras corporales tales como las mencionadas anteriormente en relación con el método del primer aspecto también pueden ser adecuadas.

5 Para una muestra de suero, una cantidad de >1 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice progresión de cáncer de próstata y, por consiguiente, una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata. Además, una cantidad de MIC-1 de >1,3 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice fuertemente progresión de cáncer de próstata y una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata. Alternativamente, una cantidad de >1,466 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice fuertemente progresión de cáncer de próstata y una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata. Todavía adicionalmente, una cantidad de MIC-1 de >1,6 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice incluso más fuertemente progresión de cáncer de próstata y una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata.

15 En una realización del segundo aspecto de la descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante:

(i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

20 (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de sujeto(s) normal(es).

25 En algunas realizaciones, la edad del/de los sujeto(s) normal(es) está en el plazo de 10 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Más preferiblemente, el/los sujeto(s) normal(es) está(n) en el plazo de 5 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante.

30 Debe entenderse que cuando se detecta una cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba, cuanto mayor es la diferencia de esa cantidad con respecto a la del/de los sujeto(s) normal(es), más fuertemente predice esa cantidad elevada que el sujeto con cáncer de próstata tiene una probabilidad aumentada de muerte por cáncer de próstata. Por tanto, en algunas realizaciones, una diferencia en la cantidad de MIC-1 detectada en la muestra de suero corporal de prueba y la del/de los sujeto(s) normal(es) de >0,3 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica que el sujeto con cáncer de próstata tiene una probabilidad aumentada de muerte por cáncer de próstata, mientras que una diferencia de >0,6 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica más fuertemente que el sujeto con cáncer de próstata tiene una probabilidad aumentada de muerte por cáncer de próstata.

35 En algunas realizaciones del segundo aspecto de la descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie. Por consiguiente, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede determinarse en diferentes puntos de tiempo en el mismo sujeto. Por ejemplo, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede detectarse en un sujeto antes del diagnóstico de cáncer de próstata, o inmediatamente tras el diagnóstico de cáncer de próstata, y después a determinados intervalos de tiempo tras el diagnóstico. Los intervalos de tiempo pueden determinarse para cada caso según las necesidades del sujeto. Los intervalos de tiempo pueden ser, por ejemplo, de tres meses o un año o dos años, pero debe entenderse que los intervalos de tiempo pueden ajustarse según el estadio de enfermedad, u otros factores médicos y de salud relevantes, del sujeto. Por consiguiente, una cantidad elevada de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie en una muestra corporal de prueba dentro de un sujeto puede detectarse comparando la cantidad de MIC-1 en la muestra corporal de prueba en un punto de tiempo dado con la cantidad de MIC-1 en la misma muestra corporal de prueba en un punto de tiempo anterior. De esta manera, la cantidad elevada de MIC-1 puede detectarse determinando el aumento de la cantidad de MIC-1 presente en la muestra corporal de prueba dentro de cualquier sujeto dado a lo largo del tiempo. Por consiguiente, en una realización del segundo aspecto de la descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie mediante:

55 (i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

(ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior.

60 En una realización de este tipo, la cantidad de MIC-1 aumentada dentro de un sujeto puede ajustarse para

compensar el aumento de MIC-1 normalmente asociado con el aumento de edad del sujeto.

5 Debe entenderse que un mayor aumento de la cantidad de MIC-1 detectada en el sujeto tras mediciones en serie predice más fuertemente progresión de cáncer de próstata y, por consiguiente, una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata, que un aumento menor. En algunas realizaciones, un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de >0,3 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice fuertemente progresión de cáncer de próstata y una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata, mientras que un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de >0,6 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que predice incluso más fuertemente progresión de cáncer de próstata y una probabilidad aumentada de muerte del sujeto debido a cáncer de próstata.

10 En algunas realizaciones del segundo aspecto de la descripción, el sujeto tiene más de 35 años de edad o, más preferiblemente, más de 45 años de edad. Sin embargo, en algunas realizaciones el sujeto puede tener más de 55 años de edad, o más de 65 años de edad, o incluso más de 75 años de edad.

15 Los resultados del método del segundo aspecto de la descripción pueden usarse en combinación con uno o más de otros indicadores de pronóstico (por ejemplo suma de Gleason, PSA, estadio de TMN). Además, el uso de los resultados del método en combinación con una evaluación de tinción estromal de MIC-1 de núcleos de tejidos de cáncer de próstata (tal como se describe en Bauskin *et al.* (2005) *Cancer Res* 65(6) 2330-2336³⁰), puede permitir una capacidad de pronóstico adicional entre cáncer de próstata localizado mortal y no mortal (es decir cáncer de próstata confinado al órgano). La tinción estromal de MIC-1 de tejidos de cáncer de próstata puede realizarse usando cualquiera de los métodos adecuados bien conocidos por los expertos en la técnica incluyendo, por ejemplo, mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-MIC-1. Por consiguiente, el método puede comprender además detectar la cantidad elevada de MIC-1 en combinación con uno o más factores de pronóstico seleccionados del grupo que consiste en suma de Gleason, cantidad de antígeno prostático específico, tinción estromal para MIC-1 y estadio de tumor-ganglio-metástasis.

20 Los sujetos con cáncer de próstata pueden someterse a espera bajo vigilancia de su cáncer, o pueden tratarse mediante cualquier método incluyendo cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta densidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal, terapia génica, vacunación, terapia con citocinas o de modulación de citocinas (por ejemplo terapia con anticuerpos), o alguna combinación de estas terapias.

25 Por consiguiente, en un tercer aspecto, la presente descripción proporciona un método de selección de sujetos, a los que se les ha diagnosticado cáncer de próstata, que se beneficiarán del tratamiento activo para cáncer de próstata, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba del sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 indica que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata.

30 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la cantidad elevada de MIC-1 indica que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata. En otras realizaciones, la cantidad elevada de MIC-1 indica fuertemente que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento activo para cáncer de próstata" debe entenderse como que se refiere a tratamiento para cáncer de próstata que puede eliminar y/o controlar la enfermedad, tal como la eliminación de toda la glándula prostática. Tal tratamiento activo puede estar asociado con efectos secundarios no deseados pero puede prevenir que el cáncer de próstata avance a un cáncer de próstata más potencialmente mortal, es decir que avance a un estadio más grave y perjudicial y/o presente metástasis. Los tratamientos activos pueden incluir cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta densidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal, terapia génica, vacunación, terapia con citocinas o de modulación de citocinas (por ejemplo terapia con anticuerpos), o alguna combinación de estas terapias.

40 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, al sujeto se le ha diagnosticado recientemente cáncer de próstata.

45 La muestra corporal de prueba preferida para su uso en el método del tercer aspecto es una muestra de suero; sin embargo, otras muestras corporales tales como las mencionadas anteriormente en relación con el método del primer aspecto también pueden ser adecuadas.

50 La cantidad de lo que puede considerarse "cantidad elevada" de MIC-1 para los fines del método del tercer aspecto

de la presente descripción, puede variar según el tipo de muestra corporal particular usado y la edad del sujeto tal como se describió anteriormente para el primer aspecto de la invención y el segundo aspecto de la descripción.

5 Para una muestra de suero de un sujeto con diagnóstico de cáncer de próstata, una cantidad de MIC-1 de >1 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata. Además, una cantidad de MIC-1 de >1,3 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica fuertemente que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata; mientras que una cantidad de MIC-1 de >1,6 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica incluso más fuertemente que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata.
10

La cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba puede determinarse fácilmente tal como se describió para el primer aspecto de la invención y el segundo aspecto de la descripción.

15 En una realización del tercer aspecto de la presente descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante:

(i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

20 (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de sujeto(s) normal(es).

25 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la edad del/de los sujeto(s) normal(es) está en el plazo de 10 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Más preferiblemente, el/los sujeto(s) normal(es) está(n) en el plazo de 5 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante.

30 En algunas realizaciones del tercer aspecto de la presente descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie. Por consiguiente, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede determinarse en diferentes puntos de tiempo en el mismo sujeto. Por ejemplo, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede detectarse en un sujeto antes del diagnóstico de cáncer de próstata, o inmediatamente tras el diagnóstico de cáncer de próstata, y después a determinados intervalos de tiempo tras el diagnóstico. Los intervalos de tiempo pueden determinarse para cada caso según las necesidades del sujeto. Los intervalos de tiempo pueden ser, por ejemplo, de tres meses o un año o dos años, pero debe entenderse que el periodo de tiempo puede ajustarse según el estadio de enfermedad, o cualquier otro factor médico y de salud relevante, del sujeto. Por consiguiente, una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba dentro de un sujeto puede detectarse comparando la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba en un punto de tiempo dado con la cantidad de MIC-1 en la misma muestra corporal de prueba en un punto de tiempo anterior. De esta manera, la cantidad elevada de MIC-1 puede detectarse determinando el aumento de la cantidad de MIC-1 presente dentro de cualquier sujeto dado a lo largo del tiempo.
35
40

45 Por consiguiente, en una realización del tercer aspecto de la presente descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie mediante:

(i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

50 (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior.

En una realización de este tipo, la cantidad de MIC-1 aumentada dentro de un sujeto puede ajustarse para compensar el aumento de MIC-1 normalmente asociado con el aumento de edad del sujeto.

55 Debe entenderse que un mayor aumento de la cantidad de MIC-1 detectada en el sujeto tras mediciones en serie indica más fuertemente que el sujeto puede beneficiarse de tratamiento activo para cáncer de próstata. En algunas realizaciones, un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de >0,3 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica fuertemente que el sujeto puede beneficiarse de tratamiento activo para cáncer de próstata, mientras que un

aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de $>0,6$ ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica fuertemente que el sujeto se beneficiará del tratamiento activo para cáncer de próstata.

- 5 En algunas realizaciones del tercer aspecto de la presente descripción, el sujeto tiene más de 35 años de edad o, más preferiblemente, más de 45 años de edad. Sin embargo, en algunas realizaciones el sujeto puede tener más de 55 años de edad, o más de 65 años de edad, o incluso más de 75 años de edad.

10 Los resultados del método del tercer aspecto de la descripción pueden usarse en combinación con uno o más de otros indicadores de pronóstico (por ejemplo suma de Gleason y PSA). Además, el uso de los resultados del método en combinación con una evaluación de tinción estromal de MIC-1 puede permitir una capacidad adicional para seleccionar una estrategia de tratamiento. Por consiguiente, el método puede comprender además detectar la cantidad elevada de MIC-1 en combinación con uno o más factores de pronóstico seleccionados del grupo que consiste en la suma de Gleason, cantidad de antígeno prostático específico, tinción estromal de MIC-1 y estadio de tumor-ganglio-metástasis.

15 El presente solicitante también ha observado que los niveles en suero de MIC-1 pueden permanecer elevados en pacientes con cáncer de próstata incluso tras el tratamiento activo (es decir, los niveles de MIC-1 elevados pueden deberse a cáncer residual, no detectada) tal como cirugía o radioterapia. En tales casos, la medición de tales niveles de MIC-1 elevados tras el tratamiento puede indicar aquellos sujetos que pueden beneficiarse de terapia adyuvante.

20 Por tanto, en un cuarto aspecto, la presente descripción proporciona un método de selección de sujetos para terapia adyuvante tras el tratamiento de cáncer de próstata, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba del sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 indica que el sujeto se beneficiará de terapia adyuvante.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "terapia adyuvante" debe entenderse como que se refiere a un tratamiento adicional para cáncer de próstata que puede eliminar y/o controlar la enfermedad, tal como la eliminación de toda la glándula prostática. Tal terapia adyuvante puede estar asociada con efectos secundarios no deseados pero puede prevenir que el cáncer de próstata avance a un cáncer de próstata más potencialmente mortal, es decir que avance a un estadio más grave y perjudicial y/o presente metástasis. La terapia adyuvante puede incluir cirugía, radioterapia, ultrasonidos focalizados de alta densidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal, terapia génica, vacunación, terapia con citocinas o de modulación de citocinas (por ejemplo terapia con anticuerpos), o alguna combinación de estas terapias.

30 La muestra corporal de prueba preferida para su uso en el método del cuarto aspecto es una muestra de suero; sin embargo, otras muestras corporales tales como las mencionadas anteriormente en relación con el método del primer aspecto también pueden ser adecuadas.

35 La cantidad de lo que puede considerarse "cantidad elevada" de MIC-1 para los fines del método del cuarto aspecto de la presente descripción puede variar según el tipo de muestra corporal particular usado y la edad del sujeto tal como se describió anteriormente para el primer aspecto de la invención y el segundo aspecto de la descripción.

40 Para una muestra de suero de un sujeto con diagnóstico de cáncer de próstata, una cantidad de MIC-1 de >1 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica que el sujeto se beneficiará de terapia adyuvante para cáncer de próstata. Además, una cantidad de MIC-1 de $>1,3$ ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica fuertemente que el sujeto se beneficiará de terapia adyuvante para cáncer de próstata; mientras que una cantidad de MIC-1 de $>1,6$ ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica incluso más fuertemente que el sujeto se beneficiará de terapia adyuvante para cáncer de próstata.

45 La cantidad de MIC-1 presente en una muestra corporal de prueba puede determinarse fácilmente tal como se describió para el primer aspecto de la invención y el segundo aspecto de la descripción.

50 En una realización del cuarto aspecto de la presente descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante:

- (i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

(ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de sujeto(s) normal(es).

5 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la edad del/de los sujeto(s) normal(es) está en el plazo de 10 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante. Más preferiblemente, el/los sujeto(s) normal(es) está(n) en el plazo de 5 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante.

10 En algunas realizaciones del cuarto aspecto de la presente descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie. Por consiguiente, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede determinarse en diferentes puntos de tiempo en el mismo sujeto. Por ejemplo, la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba puede detectarse en un sujeto antes del diagnóstico de cáncer de próstata, o inmediatamente tras el diagnóstico de cáncer de próstata, y después a determinados intervalos de tiempo tras el diagnóstico, así como en determinados momentos tras el tratamiento para cáncer de próstata. Los intervalos de tiempo pueden determinarse para cada caso según las necesidades del sujeto. Los intervalos de tiempo pueden ser, por ejemplo, de tres meses o un año o dos años, pero debe entenderse que el periodo de tiempo puede ajustarse según el estadio de enfermedad, o cualquier otro factor médico y de salud relevante y tratamiento, del sujeto. Por consiguiente una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba dentro de un sujeto puede detectarse comparando la cantidad de MIC-1 en una muestra corporal de prueba en un punto de tiempo dado con la cantidad de MIC-1 en la misma muestra corporal de prueba en un punto de tiempo anterior. De esta manera, la cantidad elevada de MIC-1 puede detectarse determinando el aumento de la cantidad de MIC-1 presente dentro de cualquier sujeto dado a lo largo del tiempo.

25 Por consiguiente, en una realización del cuarto aspecto de la presente descripción, la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie mediante:

30 (i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y

(ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior.

35 En una realización de este tipo, la cantidad de MIC-1 aumentada dentro de un sujeto puede ajustarse para compensar el aumento de MIC-1 normalmente asociado con el aumento de edad del sujeto.

40 Debe entenderse que un mayor aumento de la cantidad de MIC-1 detectada en el sujeto tras mediciones en serie indica más fuertemente que el sujeto puede beneficiarse de terapia adyuvante para cáncer de próstata. En algunas realizaciones, un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de >0,3 ng/ml en una muestra de suero es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica fuertemente que el sujeto puede beneficiarse de terapia adyuvante para cáncer de próstata, mientras que un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie de >0,6 ng/ml es probable que represente una cantidad elevada de MIC-1 que indica fuertemente que el sujeto se beneficiará de terapia adyuvante para cáncer de próstata.

45 En algunas realizaciones del cuarto aspecto de la presente descripción, el sujeto tiene más de 35 años de edad o, más preferiblemente, más de 45 años de edad. Sin embargo, en algunas realizaciones el sujeto puede tener más de 55 años de edad, o más de 65 años de edad, o incluso más de 75 años de edad.

50 Los resultados del método del cuarto aspecto de la descripción pueden usarse en combinación con uno o más de otros indicadores de pronóstico (por ejemplo suma de Gleason y PSA). Además, el uso de los resultados del método en combinación con una evaluación de tinción estromal de MIC-1 puede permitir una capacidad adicional para seleccionar una estrategia de tratamiento. Por ejemplo, se ha mostrado anteriormente que los niveles de tinción estromal de MIC-1 están asociados con el desenlace de cáncer de próstata tras una prostatectomía radical, proporcionando la disminución de niveles estromal un importante factor de predicción independiente de recidiva de la enfermedad³⁰. Por consiguiente, el método puede comprender además detectar la cantidad elevada de MIC-1 en combinación con uno o más factores de pronóstico seleccionados del grupo que consiste en suma de Gleason, cantidad de antígeno prostático específico, tinción estromal de MIC-1 y estadio de tumor-ganglio-metástasis.

60 La invención se describirá a continuación en el presente documento mediante el siguiente ejemplo no limitativo y las

figuras adjuntas.

Ejemplos

- 5 Ejemplo 1 Concentraciones en suero de MIC-1 en población de control sana y pacientes con cáncer de próstata – sólo para ilustración

Materiales y métodos

- 10 Población de estudio con cáncer de próstata

15 La población con cáncer de próstata era parte de un estudio de control de casos, basado en población, de la etiología de cáncer de próstata conocido como el estudio Cancer Prostate in Sweden (CAPS, cáncer de próstata en Suecia), que se realizó en dos fases con inclusión entre enero de 2001 y octubre de 2003. En resumen, los sujetos eran todos hombres de entre 35 y 79 años de edad con adenocarcinoma de próstata verificado patológicamente (CIE-10: C61). Se tomaron muestras de suero de 1380 casos de cáncer de próstata para el análisis en suero de MIC-1. Se obtuvo información clínica tal como estadio de tumor-ganglio-metástasis (TNM), suma de Gleason, concentración de antígeno prostático específico (PSA) para diagnóstico, y tratamiento primario mediante enlace con el National Prostate Cancer Registry (tabla 1). Los pacientes con cáncer de próstata donaron sangre, en promedio 20 4,9 meses (intervalo de 0,7 a 23,7 meses) tras la fecha de diagnóstico, que se almacenó a -70°C hasta su análisis.

Población de control aparentemente sana

25 Se seleccionaron aleatoriamente 876 sujetos varones, no afectados, aparentemente sanos, de la población de control del Swedish Population Registry, y se hizo coincidir la frecuencia con la distribución esperada de los casos de próstata descritos anteriormente por edad (en categorías de edad de 5 años) y residencia geográfica. Los casos eran todos hombres de entre 35 y 79 años de edad. Se tomaron muestras de suero de los 876 sujetos de la población de control para el análisis en suero de MIC-1.

- 30 Tabla 1. Características descriptivas de la cohorte de estudio.*

Característica	Vivos (n=1.064)	Fallecidos por otros acontecimientos (n=105)	Fallecidos por cáncer de próstata (n=211)
Edad (años)	66,2 ± 7,1	71,6 ± 6,3	68,9 ± 7,4
Niveles de PSA, ng/ml			
<20	731 (69)	60 (57)	43 (20)
20-49	168 (16)	16 (15)	43 (20)
≥50	135 (13)	27 (26)	120 (57)
Faltan	30 (3)	2 (2)	5 (2)
Estadio clínico [†]			
I	24 (2)	3 (3)	0
II	771 (72)	58 (55)	41 (19)
III	177 (17)	32 (30)	53 (25)
IV	71 (7)	10 (10)	114 (54)
Faltan	21 (2)	2 (2)	3 (1)
Puntuación de Gleason			
2-6	576 (54)	52 (50)	11 (5)
7	287 (27)	28 (27)	64 (30)
8-10	107 (10)	19 (18)	92 (44)
Faltan	94 (9)	6 (6)	44 (21)
Tratamiento primario			
Espera bajo vigilancia	197 (19)	28 (27)	12 (6)
Curativo	599 (56)	32 (30)	29 (14)
Paliativo	268 (25)	45 (43)	170 (81)

Concentración de MIC-1 en suero (pg/ml)	1066 ± 602	1745 ± 1206	2265 ± 3101
---	------------	-------------	-------------

* Los valores con el signo más-menos son medias ± DE.

† Estadio clínico agrupado según la clasificación de TNM de la Unión Internacional Contra el Cáncer de tumores malignos¹².

Evaluación de seguimiento

Se logró un seguimiento completo para determinar la mortalidad específica por cáncer de próstata hasta el 1 de marzo de 2007 mediante enlace de registros con el Swedish Cause of Death Registry usando el número de registro nacional único de cada participante del estudio. La revisión de los certificados de defunción, realizada por un oncólogo experto, estableció la causa de la muerte para los sujetos fallecidos después del 31 de diciembre de 2004, definiéndose la muerte específica por cáncer de próstata como aquellos que tenían cáncer de próstata clasificado como causa de la muerte subyacente. El tiempo de seguimiento promedio fue de 4,6 años (intervalo de 0,6 a 6,5 años). Un total de 325 (23%) pacientes con cáncer de próstata murieron durante el seguimiento y de ellos 218 (15%) tenían cáncer de próstata clasificado como causa de la muerte subyacente. Entre la población de control no afectada, 82 (9%) murieron durante el seguimiento.

Determinación de niveles en suero de MIC-1

Se determinaron los niveles en suero de MIC-1 usando un ELISA de tipo sándwich de MIC-1. El ELISA de tipo sándwich se estableció usando el anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón 26G6H6^{2,3} para la captura del antígeno y un anticuerpo policlonal (AcP) de oveja 233B3-P para la detección². Se determinó la concentración óptima de ambos anticuerpos y después se usó para todos los estudios posteriores. Se recubrieron placas de ELISA Maxisorp de noventa y seis pocillos con sobrenadante de AcM 26G6H6 diluido 1:5 (la concentración final era de aproximadamente 20 ng/ml) en tampón de recubrimiento (carbonato 0,1 mol/l en agua destilada, pH 9,4-9,8) a 4°C durante 24 horas. Entonces se lavaron las placas de ELISA tres veces con 300 µl/pocillo de albúmina de suero bovina (BSA) al 1% (p/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 2 h a 37°C. Entonces se añadieron patrones de MIC-1 recombinante humana (rhMIC-1), sobrenadante de cultivo tisular o suero de paciente a las placas (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se lavaron las placas tres veces, seguido por la adición de 100 µl/pocillo del AcP de oveja 233B3-P diluido 1:5000 en diluyente de anticuerpo (dil. de Ac; PBS que contenía BSA al 1% (p/v) y Tween-20 al 0,05% (v/v)) y se incubaron durante 1 h a 37°C. Entonces se lavaron las placas de ELISA tres veces, y se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo de burro anti-IgG oveja biotinilado diluido hasta 1:5000 de dil. de Ac y se incubaron durante 1 h a 37°C. Se lavaron las placas cuatro veces, seguido por la adición de 100 µl/pocillo de sustrato de peroxidasa (diclorhidrato de o-fenilendiamina 1 mg/ml (Sigma)) en tampón fosfato-citrato 0,05 mol/l que contenía H₂O₂ al 0,014%, pH 5,0 (Sigma). Se dejó que avanzara el desarrollo de color durante 5-15 min y se terminó mediante la adición de 100 µl/pocillo de H₂SO₄ 4 N. Se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de microplacas. Se determinó la concentración de MIC-1 humana (hMIC-1) en las muestras mediante comparación con la curva patrón de rhMIC-1. Se construyó la curva patrón usando software de ajuste de curva patrón suministrado con el lector de microplacas (Pasteur Diagnostics). Se determinó la concentración de rhMIC-1 en la curva patrón basándose en una comparación de este patrón con un patrón maestro de MIC-1 recombinante altamente purificada. Se determinó la concentración de proteína en el patrón maestro mediante un promedio de ocho estimaciones de la composición de aminoácidos totales. Todas las muestras se sometieron a ensayo por triplicado en al menos dos ocasiones. Los resultados se presentan como la media +/- DE. Las muestras de suero se marcaron de manera ciega para la determinación de concentraciones en suero.

Análisis estadístico

Se compararon los niveles en suero de MIC-1 por edad usando análisis de ANOVA, con niveles de concentración de MIC-1 sometidos a transformación logarítmica. Se evaluó la supervivencia desde la fecha de diagnóstico hasta la fecha de muerte o hasta la fecha de censura (1 de marzo de 2007). Se censuró el tiempo de supervivencia en el momento de la muerte para los pacientes que murieron por causas distintas de cáncer de próstata. Se ajustaron modelos de regresión de Cox para evaluar las razones de riesgos (HR) de mortalidad por cáncer de próstata mediante niveles en suero de MIC-1.

Resultados

Asociación entre concentración en suero de MIC-1 en la población de control no afectada y la edad

Tal como se muestra en la tabla 2 y la figura 1, la concentración en suero de MIC-1 se correlaciona fuertemente con

la edad de los sujetos de la población de control aparentemente sana, no afectada. Por ejemplo, la concentración en suero de MIC-1 media ± DE para los sujetos de 45-54 años de edad fue de 543 ± 352 pg/ml; mientras que fue de 1260 ± 1033 pg/ml en los sujetos de 75-79 años de edad.

5 Tabla 2 Datos estadísticos descriptivos de las concentraciones en suero de MIC-1 entre la población de control

Edad	N.º	Mín.	Cuar. del 25%	Media	Mediana	Cuar. del 75%	Máx.	Intervalo intercuartílico	DE
45-54	40	239	439	613	543	679	2467	240	352
55-59	88	235	486	762	626	914	3983	428	496
60-64	192	156	614	967	831	1087	4052	472	604
65-69	174	301	761	1177	926	1199	9638	438	1136
70-74	194	341	750	1190	1025	1430	4710	680	687
75-79	188	414	976	1551	1260	1765	7825	789	1033

P global 5,6E-41

¹ANOVA

Asociación entre la concentración en suero de MIC-1 en la población de control no afectada y la supervivencia global

10 Tal como se muestra en la tabla 3, la concentración en suero de MIC-1 mostró sorprendentemente una fuerte correlación inversa con la supervivencia global en la cohorte de la población de control. Por ejemplo, cuando se estratificó la población de control en cuartiles según el nivel de MIC-1 en suero, sólo el 3% de la población de control con una concentración en suero de MIC-1 de <673 pg/ml murió por cualquier causa; mientras que el 22% de la población de control con una concentración en suero de MIC-1 de >1299 pg/ml murió por cualquier causa.

15 Tabla 3 Razones de riesgos mediante concentraciones en suero de MIC-1 para la muerte por cualquier causa entre 876 muertes en la población de control

Factor de predicción MIC-1 (pg/ml)	N.º de sujetos	N.º	(%)	HR ¹	IC del 95%		HR ²	IC del 95%	
<673	219	6	3%	1,00					
673-934	219	14	6%	2,40	0,92	6,25	1,97	0,74	5,24
935-1299	219	14	6%	2,38	0,91	6,19	1,57	0,58	4,27
>1299	219	48	22%	8,83	3,78	20,64	5,23	2,11	12,96

¹ Razones de riesgos de modelos de Cox

² Razones de riesgos de modelos de Cox ajustados para la edad

20 Cohorte de pacientes con cáncer de próstata y seguimiento

25 En total, 414 (30%) de los casos de cáncer de próstata se descubrieron a través de una concentración de PSA elevada en una prueba de PSA; y a 897 (65%) de los pacientes se les diagnosticó una enfermedad localizada, en la que el cáncer estaba confinado dentro de la cápsula prostática sin evidencias de propagación regional o distante (tabla 1). La mayoría de los pacientes recibieron tratamiento inicial; el 48% de la cohorte de estudio se trataron de manera primaria con intención curativa y el 35% con intención paliativa. Durante el seguimiento, 316 (23%) de los 1380 hombres murieron y, de ellos, 218 (15%) tenían cáncer de próstata clasificado como causa de la muerte subyacente. El tiempo de seguimiento promedio fue de 4,7 años (intervalo de 0,1 a 5,9 años).

30 Concentraciones en suero de MIC-1 y estadio clínico de la enfermedad de cáncer de próstata

35 Las concentraciones en suero de MIC-1 se diferenciaron significativamente en diferentes estadios clínicos de cáncer de próstata (P<0,001). Se observaron concentraciones en suero de MIC-1 significativamente elevadas entre pacientes con cáncer de próstata en estadio III localmente avanzado (media = 1394 pg/ml, p<0,001) y entre pacientes con cáncer de próstata en estadio IV metastásico (media = 2084 pg/ml, p<0,001) en comparación con pacientes con enfermedad en estadio I-II localizada (media = 1101 pg/ml).

Concentraciones en suero de MIC-1 y muerte por cáncer de próstata

5 Se estratificaron los pacientes con cáncer de próstata en cuartiles según los niveles de MIC-1 en suero. La distribución de concentraciones en suero de MIC-1 en pacientes que murieron en última instancia por cáncer de próstata estaba sesgada hacia el cuartil superior en comparación con los pacientes que sobrevivieron (figura 2). Un análisis de regresión de Cox de una única variable reveló una fuerte asociación entre concentraciones de MIC-1 crecientes y tasas de muerte superiores, estando asociado cada incremento del 100% en la concentración de MIC-1 sometida a transformación logarítmica con una tasa de muerte cuatro veces superior (P para la tendencia <0,001).

10 Aunque sólo el 6% de los pacientes con concentraciones en suero de MIC-1 <722 pg/ml murieron durante el seguimiento, el 30% de los pacientes con concentraciones en suero de MIC-1 >1466 pg/ml murieron, proporcionando un gradiente de 6 veces (razón de riesgos = 6,1, intervalo de confianza (IC) del 95% = de 3,8 a 9,8; tabla 4).

15 El ajuste para la suma de Gleason, estadio de TNM y concentración de PSA atenuó la fuerza de la asociación entre las concentraciones en suero de MIC-1 y la supervivencia del cáncer de próstata. Sin embargo, las concentraciones de MIC-1 superiores siguieron siendo un factor de predicción independiente de pronóstico con una tasa de muerte más de tres veces superior en la mayor categoría en comparación con la menor (razón de riesgos = 3,4, IC del 95% = de 2,0 a 5,8; tabla 4).

20 En comparación con la cohorte de estudio total, se observó una asociación incluso más fuerte entre las concentraciones en suero de MIC-1 y la supervivencia del cáncer de próstata entre pacientes con enfermedad localizada. Los pacientes con las mayores concentraciones de MIC-1 en suero encontraron una tasa de muerte 11 veces superior a la de aquellos en la menor categoría (razón de riesgos = 11,4, IC del 95% = de 3,4 a 38,3). En un análisis ajustado, MIC-1 siguió siendo un factor de pronóstico independiente con una tasa de muerte casi seis veces superior en la mayor categoría en comparación con la menor (razón de riesgos = 5,8, IC del 95% = de 1,7 a 20,2).

25

Precisión predictiva de las concentraciones en suero de MIC-1 para el desenlace del cáncer de próstata

30 Las concentraciones en suero de MIC-1 mostraron una buena precisión predictiva en la clasificación de cáncer de próstata mortal de no mortal para momentos de seguimiento tempranos; sin embargo, la capacidad de distinción disminuyó gradualmente con el tiempo hasta aproximadamente 0,68 al final del seguimiento, dando como resultado un resumen de concordancia global de 0,70 (IC del 95% = de 0,65 a 0,72; figura 3). El resumen de concordancia global aumentó significativamente desde 0,82 para el modelo predictivo que incluía PSA y suma de Gleason hasta

35 0,84 para el modelo predictivo que también incluía MIC-1 (p < 0,001). Entre pacientes con diagnóstico de enfermedad localizada, el resumen de concordancia global aumentó significativamente desde 0,82 hasta 0,86 (p < 0,001) cuando se incluyó MIC-1 además de PSA y la suma de Gleason en el modelo predictivo.

40 Tabla 4 Razones de riesgos mediante niveles en suero de MIC-1 para la muerte por cáncer de próstata entre 1380 pacientes con cáncer de próstata.

Concentración en suero de MIC-1 (pg/ml)	Número de pacientes	Frecuencia de muertes por cáncer de próstata			IC del 95%	HR ²	IC del 95%
		N.º de pacientes	proporción	HR ¹			
MIC-1							
<722	345	21	0,06	1,0		1,0	
722-1015	345	32	0,09	1,6	0,9-2,7	1,1	0,6-1,9
1016-1466	345	56	0,16	2,8	1,7-4,7	1,8	1,0-3,0
>1466	345	102	0,30	6,1	3,8-9,8	3,4	2,0-5,8
Tendencia de P				<0,001		<0,001	
Suma de Gleason							
2-6	673	18	0,03	1,0		1,0	
7	444	87	0,20	8,1	4,9-13,4	4,0	2,3-6,8
8-10	233	101	0,43	22,4	13,5-37,0	7,9	4,5-13,8
Tendencia de P				<0,001		<0,001	
Estadio de T							

T1-T2	947	62	0,07	1,0		1,0	
T3-T4	406	146	0,36	6,8	5,1-9,2	1,9	1,4-2,7
PSA							
0-19	834	43	0,05	1,0		1,0	
20-49	227	43	0,19	4,0	2,6-6,1	1,8	1,2-2,9
50+	282	120	0,43	11,0	7,8-15,6	2,0	1,3-3,0
Tendencia de P				<0,001		<0,001	
Metastásico							
Confinado a órgano	1188	104	0,09	1,0	0	1,0	
N+	39	15	0,38	5,1	2,9-8,7	3,2	1,8-5,7
M+	134	90	0,67	13,2	9,9-17,6	4,2	3,0-5,9
Tendencia de P				<0,001		<0,001	

¹Razones de riesgos de modelos de Cox de una única variable

²Razones de riesgos de un modelo de Cox múltiple que incluye MIC-1, suma de Gleason, estadio de TNM, PSA en el diagnóstico y presencia de metástasis regionales o distantes como covariables.

Discusión

5 Los estudios descritos en este ejemplo confirman la asociación entre las concentraciones en suero de MIC-1 y el estadio de enfermedad y demuestran el valor pronóstico de la concentración de MIC-1 en suero en una gran cohorte basada en población de pacientes con cáncer de próstata. En análisis de múltiples variables, ajustados para factores de pronóstico importantes incluyendo la suma de Gleason, estadio clínico y concentración de PSA en el diagnóstico, MIC-1 siguió siendo un indicador de pronóstico independiente del desenlace de la enfermedad.

10 De manera importante, en enfermedad confinada a órgano, una concentración de MIC-1 en suero elevada era un factor de predicción fuerte, independiente, de cáncer de próstata mortal en última instancia. El valor predictivo de concentraciones de MIC-1 en suero se potenció adicionalmente cuando también se usaron marcadores tradicionales de enfermedad (suma de Gleason y PSA) para clasificar cáncer de próstata mortal de no mortal. El valor pronóstico de MIC-1 en suero, suma de Gleason y PSA en cáncer de próstata inicialmente localizado fue especialmente pronunciado. Estos resultados indican fuertemente que la concentración de MIC-1 en suero es un importante biomarcador que puede predecir la progresión del cáncer de próstata.

20 Los estudios también muestran que la combinación de la concentración de MIC-1 en suero con la concentración de PSA y suma de Gleason mejora significativamente la precisión del pronóstico del desenlace de la enfermedad, especialmente entre pacientes con enfermedad localizada. Específicamente, esta mejora fue la más pronunciada en predicciones de acontecimiento temprano con una disminución gradual del beneficio predictivo al aumentar el tiempo de seguimiento. Por tanto, puede usarse una alta concentración de MIC-1 en el diagnóstico para identificar pacientes que pueden beneficiarse de un tratamiento adyuvante sistémico primario además de tratamiento local.

25 A pesar de la fuerte relación de MIC-1 con cáncer, su papel en la tumorigénesis no se entiende bien⁶. La mayoría de los estudios notifican un papel antitumorigénico de MIC-1 tanto en la regulación del crecimiento tumoral^{9, 17, 18}, mediante inducción de apoptosis a través de rutas tanto dependientes de p53 como independientes de p53, como mediante actividad antiangiogénica¹⁹; sin embargo, también se ha notificado potenciación de la actividad tumorigénica²⁰. En los presentes estudios, se observó una asociación significativa entre concentraciones en suero de MIC-1 y supervivencia específica de cáncer de próstata. La dirección constante de la asociación entre las concentraciones de MIC-1 en suero y la muerte por cáncer de próstata sugiere un papel funcional de MIC-1 en la progresión del cáncer de próstata.

35 En conclusión, las concentraciones en suero de MIC-1 estaban notablemente elevadas en pacientes con cáncer de próstata con enfermedad localmente avanzada y metastásica. Además, las concentraciones de MIC-1 en suero fueron un fuerte factor de predicción de muerte por cáncer de próstata, independiente de factores de pronóstico conocidos, particularmente entre pacientes con enfermedad confinada a la glándula prostática. Además, las concentraciones de MIC-1 en suero mostraron una fuerte correlación con la edad y, además, la supervivencia global entre la población de control.

40 Ejemplo 2 Examen adicional de la asociación de MIC-1 en suero con la supervivencia en la cohorte de la población de control de hombres aparentemente sanos

*Materiales y métodos*Evaluación de seguimiento de sujetos de la población de control de hombres

5 Para la cohorte inicial de 876 hombres aparentemente sanos descrita anteriormente, se logró un seguimiento completo de la mortalidad específica hasta el 1 de marzo de 2007 mediante enlace de registros con el Swedish Cause of Death Registry usando el número de registro nacional único de cada participante del estudio. La revisión de los certificados de defunción estableció la causa de la muerte para individuos fallecidos después del 31 de diciembre de 2004. El tiempo de seguimiento promedio fue de 5,2 años (intervalo de 0,1 a 5,9 años). Un total de 102 pacientes (12%) murieron durante el seguimiento, obteniéndose la causa de la muerte a partir de los certificados de defunción y codificándose según las normas de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE). Además de mirar la mortalidad global, se examinaron las causas primarias de la muerte debida a cáncer (CIE9 de 140 a 239, CIE10 de C00 a D48) y enfermedad cardiovascular (CVD) (CIE9 de 401 a 459 o CIE10 de I10 a I99).

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la mediana y (\pm) intervalo, a menos que se indique otra cosa, indicando $p < 0,05$ la significación. Se compararon cohortes usando prueba de la t para datos independientes y análisis de la chi cuadrado para variables continuas y categóricas, respectivamente. Dado que muchos valores no estaban distribuidos de manera normal, se calcularon correlaciones entre marcadores mediante la prueba de los rangos de Spearman. Se compararon diferencias en las tasas de supervivencia acumulativas entre pacientes con diversos niveles de MIC-1. La exposición se calculó desde la fecha de extracción de sangre hasta la fecha de muerte censurando en primer lugar para la duración del intervalo de tiempo de interés. Se estimaron los riesgos relativos (RR) no ajustados y ajustados de muerte y el IC del 95% mediante el uso de modelos de riesgos proporcionales de Cox. Se estimaron los RR ajustados tras ajustar en primer lugar modelos con variables identificadas en análisis anteriores como factores de riesgo independientes. Se calcularon curvas de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon entre grupos de estratificación de riesgos usando la estadística de rangos logarítmicos. Cuando se compararon coeficientes de correlación, se determinó el valor r de las correlaciones mediante la prueba de la z de correlación y se comparó usando la transformación de r a z de Fisher. Se realizó una comparación de riesgos relativos tal como se describió anteriormente²⁵. Se realizaron análisis con el software StatView 5.0 (SAS Inc., Campus Drive, Cary, NC, Estados Unidos de América).

*Resultados y discusión*Características de la cohorte de la población de control de hombres

De los 876 sujetos incluidos, 102 murieron durante el tiempo de seguimiento. De ellos, 30 murieron por cáncer y 46 pacientes padecieron acontecimientos cardiovasculares, de los cuales 13 fueron acontecimientos isquémicos del miocardio. Los 26 pacientes restantes murieron por otras causas o no pudieron clasificarse con seguridad basándose en su certificado de defunción (tabla 5). La mediana del nivel de MIC-1 en suero fue de 934 pg/ml (intervalo de 156-9638 pg/ml; intervalo intercuartílico de 628 pg/ml).

Tabla 5 Datos descriptivos para la cohorte de la población de control de 876 hombres aparentemente sanos

Variable	Específica	Datos ¹
Edad en la extracción de sangre (años)		68 \pm 12
Tiempo de seguimiento (años)		5,3 \pm 0,5
Estado de fumador n (%)		
	Nunca	330 (38%)
	Actual o anterior	513 (58%)
	Desconocido	33 (4%)
Nivel de MIC-1 (pg/ml)		935 \pm 627
IMC (kg/m ²)		25,9 \pm 3,9
Mortalidad n (%)		
	Vivos	774 (88%)
	Muertos	102 (12%)

Causa de la muerte n (%)

Cardiovascular	43 (42%)
Tiempo de seguimiento	3,3 ± 2,9
Cáncer	33 (33%)
Tiempo de seguimiento	2,7 ± 2,2
Otra	26 (25%)
Tiempo de seguimiento	3,1 ± 1,7

¹Los datos se presentan como mediana ± intervalo intercuartílico o número absoluto (% de cohorte)

El nivel de MIC-1 en suero es un factor de predicción de muerte en una población de hombres normales

5 Los niveles de MIC-1 en suero se correlacionaron significativamente con la edad y predijeron la mortalidad en la cohorte de todos hombres con un riesgo de muerte relativo ajustado por la edad de 3,38 (IC del 95%=1,38-8,26). Los niveles de MIC-1 en suero por encima de la mediana (935+627 pg/ml) de los 876 sujetos de la cohorte de control de hombres se asociaron con muerte (p<0,0001). Una representación gráfica de Kaplan-Meier de sujetos estratificados mediante la mediana de MIC-1 en suero (935 pg/ml) muestra que los sujetos con niveles de MIC-1 superiores a la mediana tenían una supervivencia significativamente peor en comparación con la supervivencia de sujetos con niveles de MIC-1 por debajo de la mediana (el 82% en comparación con el 94%; p<0,0001; figura 4A). Además, el nivel de MIC-1 en suero era significativamente superior en sujetos que murieron en última instancia dentro del periodo de estudio (mediana = 885 pg/ml para sujetos que sobrevivieron en comparación con la mediana = 1432 pg/ml para sujetos que murieron; p<0,0001). Sin embargo, los sujetos que murieron eran significativamente mayores que los que sobrevivieron (mediana de la edad en la extracción de sangre para los supervivientes = 67 años en comparación con la mediana de la edad en la extracción de sangre para los que murieron = 75 años; p<0,0001). Además, el nivel de MIC-1 en suero se correlacionó con la edad (p=0,458; p<0,0001). La cohorte se dividió en cuartiles basándose en los niveles de MIC-1 en suero y volvió a examinarse tal como se muestra en la figura 4B. La mayoría de los sujetos que murieron dentro del periodo de seguimiento tenían niveles de MIC-1 en suero en el cuartil superior (>1299 pg/ml). Además, el nivel de MIC-1 en suero en el cuartil superior estaba significativamente asociado con la mortalidad (p<0,0001), sobreviviendo tan sólo el 74% de los sujetos en este cuartil en comparación con más del 90% de sujetos en los tres cuartiles inferiores. En hombres que murieron en última instancia debido a causas no cardiovasculares o distintas de cáncer, la enfermedad cardiovascular y el cáncer tenían más probabilidad de tener niveles de MIC-1 en suero en el cuartil superior (p=0,0034, p<0,0001, p= 0,0429, respectivamente). Usando el modelo de riesgos proporcionales de Cox, un nivel de MIC-1 en suero en el cuartil superior generó un riesgo de muerte aumentado más de 7 veces (RR de 7,05; IC del 95% de 3,49-14,25) tal como se muestra en la tabla 6. Cuando se ajustó para otros riesgos de mortalidad, historia de fumador, IMC y edad, una MIC-1 en suero en el cuartil superior todavía estaba significativamente relacionada con el riesgo de mortalidad futura (RR de 3,38; IC del 95% de 1,38-8,26; tabla 6).

30 Tabla 6 Análisis de riesgos proporcionales de Cox de múltiples variables de la mortalidad por cualquier causa en la cohorte de la población de control de hombres

	Ajuste	n	Razón de riesgos	IC del 95%	p
<i>Cuartil de MIC-1</i>	†				
156-672 pg/ml		219	1		
673-934 pg/ml		219	1,94	0,87-4,35	0,1078
935-1299 pg/ml		219	2,25	1,02-4,94	0,0434
> 1299 pg/ml		219	7,05	3,49-14,25	<0,0001
<i>Cuartil de MIC-1</i>	‡				
156-672 pg/ml		219	1		
673-934 pg/ml		219	1,89	0,737-4,85	0,1854
935-1299 pg/ml		219	1,43	0,55-3,68	0,462
> 1299 pg/ml		219	3,38	1,38-8,26	0,0077

† En bruto ‡ Ajustado para la edad, IMC e historial de fumador

35 Por consiguiente, el nivel de MIC-1 en suero proporciona un factor de predicción independiente y potente de la mortalidad por cualquier causa futura en una población de hombres normales.

Ejemplo 3 Asociación de la MIC-1 en suero en una cohorte independiente de gemelos

Con fines de validación, se examinó la asociación de la MIC-1 en suero con la supervivencia en una cohorte independiente de gemelos.

5 *Materiales y métodos*

Cohorte de gemelos

La cohorte de gemelos incluyó 308 sujetos (que comprendían 154 parejas de gemelos del mismo sexo) que se encontraba dentro del Swedish Twin Registry²¹, actualmente el mayor registro de gemelos basado en la población en todo el mundo que registra a más de 85.000 parejas de gemelos nacidos desde 1886. El subconjunto de gemelos para los análisis actuales participó en estudios de envejecimiento^{22,23}. La cigosidad se había determinado previamente preguntando a las parejas si eran “tan parecidos como dos gotas de agua” o “no más parecidos que hermanos en general”; y se confirmó la cigosidad para todas las parejas o bien mediante polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) o bien mediante pruebas serológicas y marcadores de microsatélites.

Evaluación de seguimiento de la cohorte de gemelos

Para los 308 sujetos dentro de la población de gemelos, se obtuvieron tasas de muerte a través del registro de la población total hasta el final de 2003 y las causas de la muerte estaban disponibles mediante enlace con el Swedish Cause of Death Registry usando el número de registro personal de cada gemelo (PRN). El Cause of Death Registry, establecido en 1961, está completo al 99% para toda la población sueca que ha muerto desde 1961. Se actualizaron las causas de la muerte hasta el final de 2001. Las muertes por causas específicas se obtuvieron a partir de certificados de defunción y se codificaron según las normas de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE). Además de examinar la mortalidad global, se evaluaron las causas primarias de la muerte debida a cáncer (CIE9 de 140 a 239, CIE10 de C00 a D48) y CVD (CIE9 de 401 a 459 o CIE10 de I10 a I99). Se derivó información sobre la edad y el sexo del Swedish Twin Registry. Se calculó el tiempo de observación para cada gemelo a partir de la fecha de entrada en la cohorte, tal como se define mediante la fecha de extracción de sangre (1992-1996), hasta la aparición de muerte o la censura (supervivencia) al final del periodo de observación (31 de marzo de 2003).

30

Determinación de la longitud de telómeros

Se disponía de sangre completa para el análisis de telómeros para 154 parejas de gemelos²⁴. Se evaluó la longitud de telómeros mediante análisis de fragmentos de restricción terminales (TRF), que se basa en la digestión con enzimas de restricción y la hibridación mediante transferencia de tipo Southern de un mínimo de 10^5 células para medir la longitud promedio de telómeros. Ésta era una de las primeras técnicas y más ampliamente usadas y produce resultados fiables, aunque sesga los resultados frente a la detección de telómeros cortos. Se midió la longitud de telómeros para participantes del estudio en una serie de 18 lotes. Con el fin de tener en cuenta posibles diferencias específicas de lote en las mediciones de telómeros, se normalizaron las longitudes de telómeros de cada lote respectivo por separado para ajustarse a una distribución normal y después se combinaron las longitudes de telómeros normalizadas de cada lote para el análisis de una variable de longitud de telómeros continua. Cuando se analizó la longitud de telómeros como variable categórica, cada lote se dividió independientemente en cuartiles basándose en la longitud, y después se combinó cada cuartil a lo largo de los lotes. Tanto los métodos de normalización como de cuartiles fueron medidas que controlan la variación de mediciones entre lotes. Para verificar el control de variaciones entre lotes, los análisis se limitaron a longitudes de telómeros normalizadas de las 33 parejas de gemelos en las que los gemelos conjuntos se midieron en el mismo lote.

45

Determinación de niveles de MIC-1 en suero

Se determinaron las concentraciones en suero de MIC-1 (pg/ml) usando un ELISA de tipo sándwich sensible², establecido usando el anticuerpo monoclonal (AcM) de ratón 26G6H6 para la captura de antígeno y un anticuerpo policlonal (AcP) de oveja 233B3-P para la detección, tal como se describió anteriormente. Todas las muestras se sometieron a ensayo por triplicado y el coeficiente de variación entre muestras fue inferior al 12 por ciento.

55 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico tal como para el ejemplo 2.

Resultados y discusión

Características de la cohorte de gemelos

- 5 Tal como se muestra en la tabla 7, los sujetos en la cohorte de gemelos eran significativamente mayores que los sujetos de la cohorte de la población de control de hombres en la extracción de sangre (mediana para la cohorte de gemelos = 78 años en comparación con la mediana para la cohorte de la población de control de hombres = 68 años; $p < 0,0001$). La cohorte de gemelos tenía niveles de MIC-1 en suero superiores (mediana=1393 pg/ml; intervalo de 428-8064 pg/ml; intervalo intercuartílico de 1056 pg/ml; $p < 0,0001$) a la cohorte de la población de control de hombres, y el nivel de MIC-1 en suero se correlacionaba significativamente con la edad ($\rho = 0,614$; $p < 0,0001$).
- 10 Adicionalmente, la población de gemelos tenía un IMC significativamente inferior (mediana= 23,84 kg/m^2) al de la cohorte de la población de control de hombres (mediana = 25,92 kg/m^2 ; $p < 0,0001$).

Tabla 7 Datos descriptivos para la cohorte de gemelos de 308 sujetos

Variable	Específica	Datos ¹
Edad en la extracción de sangre (años)		78 \pm 14
Tiempo de seguimiento (años)		9,4 \pm 7,7
Sexo, n (%)		
	Hombres	98 (32%)
	Mujeres	210 (68%)
Cigosidad n (%)		
	Monocigotos	168 (56%)
	Dicigotos	140 (44%)
Estado de fumador n (%)		
	Nunca	203 (67%)
	Actual o anterior	105 (33%)
	Desconocido	0
Nivel de MIC-1 (pg/ml)		1393 \pm 1056
IMC (kg/m^2)		23,8 \pm 3,6
Mortalidad n (%)		
	Vivos	109 (35%)
	Muertos	199 (65%)
Causa de la muerte n (%)		
	Cardiovascular	92 (46%)
	<i>Tiempo de seguimiento</i>	5,3 \pm 4,4
	Cáncer	29 (15%)
	<i>Tiempo de seguimiento</i>	4,7 \pm 4,0
	Otra	78 (39%)
	<i>Tiempo de seguimiento</i>	8,5 \pm 6,9
¹ Los datos se presentan como la mediana \pm intervalo intercuartílico o número absoluto (% de cohorte)		

- 15 De los 199 sujetos que murieron, 29 murieron por cáncer, y 92 por causas cardiovasculares, de las cuales 41 fueron infartos de miocardio. Los sujetos que murieron en última instancia de la cohorte de gemelos eran mayores en la toma de muestras de sangre que los sujetos que murieron de la cohorte de la población de control de hombres (mediana = 83 años para la cohorte de gemelos en comparación con la mediana = 71 años para la cohorte de la población de control de hombres; $p < 0,0001$). Al contrario que la cohorte de la población de control de hombres, en la cohorte de gemelos había más del 67% de mujeres, aunque no hubo diferencias significativas en los niveles de MIC-1 en suero entre los sexos (mediana del nivel de MIC-1 para hombres en la cohorte de gemelos = 1407 pg/ml en comparación con la mediana del nivel de MIC-1 para mujeres en la cohorte de gemelos = 1383 pg/ml; $p = 0,5149$). Sin embargo, las mujeres en la cohorte de gemelos eran significativamente mayores que los hombres en la cohorte de gemelos en la toma de muestras de sangre (mediana de la edad para mujeres en la cohorte de gemelos = 82 años en comparación con la mediana de la edad para hombres en la cohorte de gemelos = 74 años; $p < 0,0001$). No hubo diferencias en las tasas de muerte entre hombres y mujeres ($p = 0,6268$). Resulta interesante que la MIC-1 en suero estaba correlacionada negativamente con la longitud de telómeros ($\rho = -0,181$; $p = 0,0011$). Los niveles de IL-6 en suero estaban disponibles para 117 sujetos de la cohorte de gemelos y los niveles de CRP estaban disponibles para
- 20
- 25

109 sujetos de la cohorte de gemelos. El nivel de MIC-1 en suero estaba correlacionado con la IL-6 en suero ($p=0,233$; $p=0,0121$); sin embargo, la MIC-1 en suero no estaba correlacionada con el nivel en suero de CRP ($p=0,054$; $p=0,5765$). Dado que la IL-6 en suero, CRP, edad y longitud de telómeros e IMC son todos marcadores de mortalidad establecidos, se comparó su capacidad para predecir la mortalidad con la del nivel de MIC-1 en suero.

5

MIC-1 es un marcador independiente validado de mortalidad futura

10 Se estratificaron los niveles de MIC-1 en suero de sujetos en la cohorte de gemelos en cuartiles. La MIC-1 en suero predijo la mortalidad, estando niveles de MIC-1 en suero crecientes asociados con riesgo aumentado de mortalidad ($p<0,0001$; tabla 8; figura 5). En esta cohorte, sólo el 6% de los sujetos con nivel de MIC-1 en suero en el cuartil superior sobrevivieron el periodo de seguimiento, en comparación con el 69% de los pacientes con niveles de MIC-1 en suero en el cuartil inferior.

15 Los sujetos que murieron en última instancia por cáncer, enfermedad cardiovascular u otros estados tenían más probabilidades de haber tenido niveles de MIC-1 en suero en el cuartil superior ($p = 0,0345$, $p < 0,0001$, $p = 0,0263$, respectivamente). Los sujetos con niveles de MIC-1 en suero en el cuartil superior tenían un riesgo aumentado de mortalidad (RR = 8,64; IC del 95% = 5,41-13,78), lo que confirma observaciones realizadas en la cohorte de la población de control de todo hombres. Sin embargo, en la cohorte de gemelos, cualquier nivel de aumento en el nivel en suero de MIC-1 por encima del cuartil inferior indicó un riesgo aumentado de muerte (tabla 8). Cuando se realizaron ajustes para otros factores asociados con la mortalidad (por ejemplo historial de fumador anterior o actual, IMC, sexo, longitud de telómeros y edad), los niveles de MIC-1 en suero en los dos cuartiles superiores siguieron estando asociados independientemente con un aumento del riesgo de mortalidad futura (cuartil superior: RR = 2,87, IC del 95% = 1,68-4,91; segundo cuartil superior: RR = 1,99, IC del 95% = 1,20-3,29; tabla 8).

25 La cohorte de gemelos también validó el hallazgo de que MIC-1 en suero es un factor de predicción independiente de la mortalidad cuando se ajusta adicionalmente para la longitud de telómeros, IL-6 y CRP. Sólo 108 sujetos de la cohorte de gemelos tenían datos disponibles de niveles tanto de IL-6 como de CRP en suero. Como los dos cuartiles superiores de MIC-1 en suero predecían significativamente la mortalidad, cuando se ajustaron, se estratificó MIC-1 en suero según la mediana (1392 pg/ml). Además de ajustar para el historial de fumador anterior o actual, IMC, sexo, longitud de telómeros y edad, también se ajustaron las razones de riesgos para los niveles de IL-6 y CRP en suero. El nivel de MIC-1 en suero por encima de la mediana, cuando se ajustó para el historial de fumador anterior o actual, IMC, sexo, longitud de telómeros y edad, niveles de IL-6 en suero y de CRP en suero, fue un factor de predicción independiente de la mortalidad (RR=2,26; IC del 95%=1,19-4,29; tabla 8).

35 En la cohorte de la población de control de todo hombres y la cohorte de gemelos, MIC-1 en suero no está fuertemente asociada con el IMC (datos no mostrados). Esto se debe probablemente a los niveles de MIC-1 en suero relativamente inferiores en estas cohortes en comparación con poblaciones específicas de enfermedad (aparte de las poblaciones de enfermedad cardiovascular). Estos resultados indican que los niveles de MIC-1 en suero que afectan al IMC son significativamente superiores en poblaciones con enfermedad²⁷. Se mostró anteriormente que en pacientes con insuficiencia cardíaca, es probable que los niveles de MIC-1 en suero que afectan al IMC sean superiores a 3700 pg/ml²⁸. Sin embargo, el IMC era significativamente superior y los niveles de MIC-1 en suero eran inferiores en la cohorte de control de la población de todo hombres más jóvenes en comparación con la cohorte de gemelos mayores, lo que indica una correlación inversa de la MIC-1 en suero con el IMC tal como se describió anteriormente²⁷. Adicionalmente, tras combinar los pacientes con niveles de MIC-1 en suero superiores a 3800 pg/ml en las cohortes tanto de la población de control de hombres como de gemelos, la MIC-1 en suero tendía a asociarse de manera negativa con el IMC ($p=-0,351$; $p=0,0547$). Los pacientes con cáncer de próstata sólo tienen una relación significativa con el IMC cuando los niveles de MIC-1 son superiores a 6000 pg/ml²⁷ y se produce una relación similar en enfermedad renal crónica (Breit *et al.* presentado a The Lancet).

50 Por consiguiente, se ha validado que los niveles de MIC-1 en suero son un factor de predicción independiente y potente de la mortalidad por cualquier causa futura en una población de gemelos que era predominantemente de mujeres, correlacionándose la MIC-1 en suero con el tiempo hasta la muerte en la cohorte de gemelos. Tal como se publicó anteriormente, los niveles de MIC-1 en suero se correlacionaron con la edad y otros marcadores de mortalidad y envejecimiento, específicamente, IL-6 y CRP²⁶. El nivel de MIC-1 en suero está correlacionado de manera débil pero significativa con la longitud de telómeros, lo cual puede verse influido por varias variables del entorno. El estrés oxidativo acorta significativamente la longitud de telómeros e induce daño del ADN que conduce posiblemente a senescencia replicativa (Breit *et al.* presentado a The Lancet), un marcador de envejecimiento biológico.

60 Tabla 8 Análisis de riesgos proporcionales de Cox de múltiples variables de la mortalidad por cualquier causa en la cohorte de gemelos

	Ajuste	n	Razón de riesgos	IC del 95%	p
<i>Cuartil de MIC-1</i>	†				
428-1014 pg/ml		77	1		
1015-1377 pg/ml		77	2,18	1,32-3,59	0,0023
1378-2084 pg/ml		77	4,25	2,64-6,85	<0,0001
>2085 pg/ml		77	8,92	5,55-14,33	<0,0001
<i>Cuartil de MIC-1</i>	‡				
428-1014 pg/ml		77	1		
1015-1377 pg/ml		77	1,51	0,91-2,50	0,1093
1378-2084 pg/ml		77	2,09	1,25-3,47	0,0046
>2085 pg/ml		77	3	1,74-5,16	<0,0001
<i>Cuartil de MIC-1</i>	*				
428-1014 pg/ml		23	1		
1015-1377 pg/ml		21	1,21	0,48-3,06	0,6919
1378-2084 pg/ml		30	2,61	1,04-6,56	0,0418
>2085 pg/ml		34	2,5	0,94-6,69	0,0675
<i>Heptil de MIC-1</i>	*				
428-1392 pg/ml		44	1		
>1392 pg/ml		64	2,26	1,19-4,29	0,0125

† En bruto.

‡ Ajustado para la edad, sexo, IMC e historial de fumador y longitud de telómeros.

* Ajustado para la edad, sexo, IMC e historial de fumador, longitud de telómeros, IL-6 y CRP.

Los niveles de MIC-1 en suero predicen la tasa de mortalidad independientemente del contexto genético

5 A pesar de estar correlacionado con posibles marcadores de envejecimiento biológico, de los cuales un número significativo predicen la mortalidad²⁶, los resultados indican que el nivel de MIC-1 en suero predice independientemente la mortalidad y no se ve influido significativamente por el contexto genético, ya que el nivel de MIC-1 en suero estaba directamente correlacionado con el tiempo de supervivencia y no se veía influido por la cigosidad de gemelos. Cuando ambos miembros de una pareja de gemelos murieron, el nivel de MIC-1 en suero estaba correlacionado de manera significativa e inversa con el tiempo de supervivencia ($r=0,344$; $p<0,0001$). Tal como se muestra en las figuras 6A y 6B, no hubo ninguna diferencia significativa en la fuerza de la correlación entre parejas de gemelos monocigóticas (MZ) y dicigóticas (DZ) (MZ: $r=0,419$, $p<0,0001$; DZ: $r=0,342$, $p=0,0046$; diferencia $z=-0,51$; $p=0,2946$, unilateral, $p=0,5892$, bilateral; transformación de r a z de Fisher). Adicionalmente, usando el modelo de riesgos proporcionales de Cox no hubo ninguna diferencia significativa en el riesgo de muerte entre gemelos MZ y DZ que tenían niveles de MIC-1 en suero superiores a la mediana en la entrada en el estudio (MZ: RR= 1,71, IC del 95% = 1,06-2,77; DZ: RR= 2,17, IC del 95% = 1,32-3,56), y estas correlaciones no fueron significativamente diferentes (razón de riesgo relativo=1,27; IC del 95%=0,63-2,53). Por tanto, los niveles de MIC-1 en suero tenían una potencia predictiva similar para la mortalidad en gemelos monocigóticos y dicigóticos lo que indica que cambios de MIC-1 en suero están relacionados con procesos patológicos activos en vez de con el contexto genético.

Por consiguiente, el nivel de MIC-1 en suero es un biomarcador importante que puede predecir el riesgo aumentado de mortalidad por cualquier causa.

25 Ejemplo 4 Concentración en suero de MIC-1 en pacientes con cáncer de próstata – sólo para ilustración

Para verificar los niveles en suero de MIC-1 en pacientes con cáncer de próstata descritos en el ejemplo 1, se examinó una cohorte de hombres con diagnóstico de cáncer de próstata a partir del mismo estudio que se describió en el ejemplo 1, excepto porque en este caso la cohorte era más grande y estuvo seguida por 10 meses adicionales.

Materiales y métodos

Cohorte de estudio

5 Este estudio usó muestras de suero de 1442 sujetos con cáncer de próstata (del Cancer Prostate in Sweden (CAPS)) para la medición de niveles de MIC-1. Basándose en el historial de tratamiento notificado por el propio sujeto, se clasificaron las muestras como o bien antes del tratamiento (n = 431) o bien después del tratamiento (n = 1011).

Evaluación de seguimiento

15 Con el uso del número de registro nacional único de cada sujeto, se evaluó el estado vital a partir de la fecha de extracción de sangre hasta el 15 de enero de 2008, mediante enlace de registros con el Swedish Population Registry, y se obtuvo la supervivencia específica de cáncer de próstata mediante enlace con el Cause of Death Registry hasta el 31 de diciembre de 2005. Una revisión de certificados de defunción, realizada por un oncólogo, estableció la causa de la muerte para individuos que fallecieron después del 31 de diciembre de 2005.

Determinación de niveles en suero de MIC-1

20 Se determinaron las concentraciones en suero de MIC-1 (pg/ml) tal como se describió en el ejemplo 1. Todas las muestras se analizaron por triplicado y el coeficiente de variación entre las muestras era inferior al 12 por ciento.

Análisis estadístico

25 Se sometieron a prueba diferencias en los niveles en suero de MIC-1 entre características clínicas usando la prueba de Kruskal-Wallis. Se realizó un análisis de tiempo hasta el acontecimiento usando la muerte por cáncer de próstata como desenlace. Se censuró el tiempo de supervivencia en el momento de la muerte para sujetos que murieron por causas distintas de cáncer de próstata. La asociación entre el nivel en suero de MIC-1 y la muerte por cáncer de próstata se evaluó usando un análisis de regresión de Cox con los niveles en suero clasificados en cuatro grupos basándose en cuartiles de la distribución de los niveles de MIC-1 entre todos los pacientes, usándose la menor categoría (es decir el cuartil inferior) como grupo de referencia. En el análisis estratificado mediante grupo de riesgo de pronóstico, se realizó el análisis de regresión de Cox de los niveles de MIC-1 sometidos a transformación logarítmica. Para evaluar la potencia de distinción de los niveles en suero de MIC-1 sobre la mortalidad por cáncer de próstata, se estimó la probabilidad de concordancia basada en la estimación de parámetros a partir de un modelo de regresión de Cox³¹. La estimación de concordancia osciló entre 0,5 y 1,0, representando 1,0 una concordancia perfecta entre la variable de pronóstico y el tiempo de supervivencia. Se reconoció la presencia de riesgos en competencia usando el paquete *cmprsk* para el lenguaje de programación R³² para estimar la incidencia acumulativa de mortalidad por cáncer de próstata. Se usó una prueba de Gray³³ para evaluar diferencias en la incidencia acumulativa entre pacientes clasificados según cuartiles de la distribución de niveles de MIC-1. Todos los valores de P notificados se basaron en hipótesis bilaterales.

Resultados

Niveles en suero de MIC-1 y características clínicas

45 La tabla 9 muestra niveles en suero de MIC-1 mediante características clínicas de pacientes. Los niveles en suero de MIC-1 estaban significativamente elevados a lo largo de un nivel creciente del estadio de T (P < 0,0001), estadio de M (P < 0,0001), suma de Gleason (P < 0,0001), y nivel de PSA en el diagnóstico (P < 0,0001). No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles en suero de MIC-1 entre pacientes negativos para ganglios y positivos para ganglios.

Tabla 9 Niveles en suero de MIC-1 en una cohorte de cáncer de próstata más grande

Característica	Pacientes		Nivel en suero de MIC-1 (pg/ml)		
	N.º	(%)	Mediana	Intervalo	Valor de P ¹
Estadio de tumor					

T1	518	(35,9)	872	219-5090	
T2	473	(32,8)	1008	176-6410	
T3	373	(25,9)	1143	196-31252	
T4	51	(3,5)	1276	143-9243	
Tx	27	(1,9)	961	236-8876	<0,0001
Estadio de ganglios					
N0/Nx	1394	(96,7)	1002	143-31252	
N1	48	(3,3)	1094	356-9243	0,31
Estadio de metástasis					
M0/Mx	1302	(90,3)	974	176-12004	
M1	140	(9,7)	1324	143-31252	
Puntuación de Gleason de biopsia					
2-6	707	(49,0)	898	176-8876	
7	460	(31,9)	1100	234-12004	
8-10	244	(16,9)	1099	143-31252	
Falta	31	(2,1)	1040	219-5374	<0,0001
Nivel de PSA					
<20 ng/ml	870	(60,3)	888	176-8876	
20-49 ng/ml	237	(16,4)	1103	256-9243	
>50 ng/ml	296	(20,5)	1276	143-31252	
Falta	39	(2,7)	914	236-5259	<0,0001

¹ Prueba de Kruskal-Wallis

Niveles en suero de MIC-1 y muerte por cáncer de próstata

5 En conjunto, 380 (26%) de los 1442 hombres murieron durante el seguimiento y, de ellos, 265 (18%) tenían cáncer de próstata clasificado como causa de la muerte subyacente. El tiempo de seguimiento promedio fue de 4,9 años (intervalo de 0,1 a 6,8 años). La cohorte se estratificó en cuartiles según el nivel en suero de MIC-1. La distribución de niveles en suero de MIC-1 en pacientes que murieron en última instancia por cáncer de próstata estaba sesgada hacia el cuartil superior en comparación con los pacientes que sobrevivieron. Tal como se muestra en la figura 7 y la tabla 10, tras seis años de seguimiento, la incidencia acumulativa de muerte por cáncer de próstata fue del 7% entre los sujetos con concentraciones en suero de MIC-1 inferiores a 710 pg/ml (es decir en el cuartil inferior, denominado 1^{er} cuartil en la figura 7) y del 34% entre los sujetos con concentraciones en suero de MIC-1 superiores a 1456 pg/ml (es decir en el cuartil superior, denominado 4^o cuartil en la figura 7) (P < 0,0001), correspondiente a un riesgo relativo de seis veces (razón de riesgos [HR], 6,33; intervalo de confianza del 95% [IC], 4,11-9,74; tabla 10). En un análisis de múltiples variables que se ajustó para los efectos de los factores de pronóstico establecidos suma de Gleason, estadio de TNM y nivel de PSA en el diagnóstico, los niveles de MIC-1 superiores siguieron estando asociados con la muerte por cáncer de próstata (HR ajustada, 3,58; 95% IC, 2,28-5,63; tabla 10).

Tabla 10 Riesgo de muerte por cáncer de próstata entre 1442 pacientes con cáncer de próstata

Nivel de MIC-1 (pg/ml)	N.º de pacientes	N.º de muertes por cáncer de próstata	HR en bruto	(IC del 95%)	HR ajustada*	(IC del 95%)
<i>Todas las muestras</i>						
<710	361	25	1,00		1,00	
710-1006	360	51	2,10	(de 1,30 a 3,39)	1,48	(de 0,91 a 2,42)
1006-1456	360	68	2,90	(de 1,83 a 4,59)	1,75	(de 1,09 a 2,81)
>1456	361	121	6,33	(de 4,11 a 9,74)	3,58	(de 2,28 a 5,63)
Tendencia de P			<0,0001		<0,0001	
<i>Muestras antes del</i>						

<i>tratamiento</i>						
<710	112	2	1,00		1,00	
710-1006	108	6	3,12	(de 0,63 a 15,47)	2,20	(de 0,44 a 11,04)
1006-1456	105	10	5,49	(de 1,2 a 25,04)	3,15	(de 0,65 a 15,18)
>1456	106	20	12,08	(de 2,82 a 51,70)	9,61	(de 2,22 a 41,57)
Tendencia de P			<0,0001		<0,0001	
<i>Muestras después del tratamiento</i>						
<710	249	23	1,00		1,00	
710-1006	252	45	2,00	(de 1,21 a 3,30)	1,40	(de 0,84 a 2,36)
1006-1456	255	58	2,66	(de 1,64 a 4,31)	1,61	(de 0,98 a 2,65)
>1456	255	101	5,95	(de 3,78 a 9,37)	3,09	(de 1,91 a 5,00)
Tendencia de P			<0,0001		<0,0001	

* Razones de riesgos de un modelo de Cox múltiple que incluye niveles de MIC-1 en suero, estadio de T clínico, puntuación de Gleason de biopsia, nivel de PSA en suero en el diagnóstico y estado metastásico como covariables.

Se realizó una evaluación separada de los niveles en suero de MIC-1 entre hombres con sangre extraída antes del tratamiento (n = 431) y después del tratamiento (n = 1,011). En comparación con la cohorte de estudio total, se observó una asociación incluso más fuerte entre los niveles en suero de MIC-1 antes del tratamiento y la supervivencia del cáncer de próstata (tabla 10). Los sujetos dentro del cuartil superior (es decir, con nivel de MIC-1 en suero de >1456 pg/ml) tenían una tasa de muerte más de doce veces superior a la de aquellos en el cuartil inferior (es decir, con niveles de MIC-1 <710 pg/ml, HR, 12,08; IC del 95%, 2,82-51,70). En un análisis ajustado, los niveles de MIC-1 antes del tratamiento siguieron siendo un factor de pronóstico independiente con una tasa de muerte casi diez veces superior en el cuartil superior en comparación con el cuartil inferior (HR, 9,61; IC del 95%, 2,22-41,57). Los sujetos con niveles en suero de MIC-1 después del tratamiento en el cuartil superior también estaban asociados con un riesgo aumentado de muerte por cáncer de próstata con una tasa de muerte casi seis veces superior en comparación con aquellos en el cuartil inferior (HR, 5,95; IC del 95%, 3,78-9,37; tabla 10). El ajuste para la suma de Gleason, estadio de TNM y nivel de PSA en el diagnóstico atenuó la fuerza de la asociación entre los niveles en suero de MIC-1 después del tratamiento y la muerte por cáncer de próstata; sin embargo, los niveles de MIC-1 en suero después del tratamiento en el cuartil superior (es decir >1456 pg/ml) siguieron siendo un factor de predicción independiente de pronóstico con una tasa de muerte por cáncer tres veces superior en la categoría mayor en comparación con la menor (HR, 3,09; IC del 95%, 1,91-5,00; tabla 10).

Niveles en suero de MIC-1 en sujetos con enfermedad clínicamente localizada

Entonces se limitó el análisis a sujetos con enfermedad clínicamente localizada (es decir sujetos con una puntuación T de T1/T2 y una puntuación N de N0/Nx y una puntuación M de M0/Mx), porque el pronóstico individual y la gestión es un desafío especial en estos sujetos. Para explorar el valor pronóstico de los niveles en suero de MIC-1 en subgrupos más homogéneos, se estratificaron adicionalmente los sujetos en los grupos tradicionales de riesgo bajo (PSA<10 y suma de Gleason<7), riesgo intermedio (PSA de 10 a 20 o suma de Gleason de 7) y riesgo alto (PSA>20 y suma de Gleason>7). Sin embargo, dado que sólo un sujeto murió por cáncer de próstata durante el seguimiento en el grupo de riesgo bajo, se combinaron los grupos de riesgo bajo e intermedio en un grupo de riesgo. Un análisis de regresión de Cox de los niveles en suero de MIC-1 sometidos a transformación logarítmica reveló una asociación significativa con la muerte por cáncer de próstata en hombres en el grupo de riesgo bajo/intermedio así como en el grupo de riesgo alto (P = 0,0001 y P = 0,001, respectivamente; tabla 11). La estimación de probabilidad de concordancia, que evalúa la fuerza predictiva del modelo de Cox, entre hombres en el grupo de riesgo bajo/intermedio era de 0,71 (EE, 0,04) mientras que los hombres en el grupo de riesgo alto tenían una probabilidad de concordancia de 0,66 (EE, 0,04).

El análisis limitado a muestras que se extrajeron antes o después del tratamiento reveló una asociación significativa entre los niveles en suero de MIC-1 sometidos a transformación logarítmica y la muerte por cáncer de próstata tanto entre hombres en el grupo de riesgo bajo/intermedio (antes del tratamiento, P = 0,009; después del tratamiento, P = 0,006) y entre hombres en el grupo de riesgo alto (antes del tratamiento, P = 0,02; después del tratamiento, P =

0,01). Entre hombres con la sangre extraída tanto antes como después del tratamiento, las probabilidades de concordancia estimadas eran superiores entre hombres con riesgo bajo/intermedio en comparación con hombres en el grupo de riesgo alto (0,72 frente a 0,69; y 0,70 frente a 0,65, respectivamente; tabla 3).

5 Tabla 11 Riesgo de muerte por cáncer de próstata entre 857 sujetos con enfermedad localizada

Nivel de MIC-1	N.º de pacientes	N.º de muertes por cáncer de próstata	HR	(IC del 95%)	Valor de P	Probabilidad de concordancia (EE)
<i>Todas las muestras</i>						
Riesgo bajo / intermedio	632	12	6,34	(de 2,46 a 16,29)	0,0001	0,71 (0,04)
Riesgo alto	225	29	3,07	(de 1,57 a 5,98)	0,001	0,66 (0,04)
<i>Muestras antes del tratamiento</i>						
Riesgo bajo / intermedio	256	6	7,00	(de 1,64 a 29,93)	0,009	0,72 (0,06)
Riesgo alto	76	7	4,16	(de 1,25 a 13,88)	0,02	0,69 (0,06)
<i>Muestras después del tratamiento</i>						
Riesgo bajo / intermedio	376	6	5,84	(de 1,64 a 20,8)	0,006	0,70 (0,05)
Riesgo alto	149	22	2,72	(de 1,22 a 6,07)	0,01	0,65 (0,05)

* El papel de pronóstico del nivel en suero de MIC-1 se somete a prueba dentro de cada categoría de grupo de riesgo de pronóstico. El nivel en suero de MIC-1 sometido a transformación logarítmica se modelizó como variable continua.

10 Este ejemplo confirma la asociación entre las concentraciones en suero de MIC-1 y el estadio de enfermedad, y demuestra adicionalmente, por primera vez, el valor pronóstico del nivel de MIC-1 en suero como marcador para distinguir entre cáncer de próstata mortal y no mortal. En un análisis de múltiples variables, el ajuste para los factores de pronóstico establecidos suma de Gleason, estadio clínico y nivel de PSA en el diagnóstico, no afectó considerablemente al valor pronóstico independiente de MIC-1. Resulta importante que, en enfermedad confinada a órgano, un nivel de MIC-1 en suero elevado fue un factor de predicción independiente de cáncer de próstata mortal. Por tanto, los resultados indican que los niveles de MIC-1 en suero pueden pronosticar la muerte por cáncer de próstata y la progresión de la enfermedad.

20 Debido al impacto del examen para la detección de cáncer de próstata con PSA, el cáncer de próstata está diagnosticándose cada vez más en un estadio localizado. Dado que la supervivencia libre de progresión en sujetos con enfermedad localizada gestionados con espera bajo vigilancia es alta^{13,14} y el desenlace de la enfermedad no puede predecirse de manera precisa, el tratamiento excesivo de sujetos con enfermedad con riesgo bajo es común. La gestión mediante vigilancia activa con intervención retrasada selectiva basándose en cambios tempranos de PSA se ha propuesto como estrategia para reducir el tratamiento excesivo de sujetos con enfermedad indolente. Sin embargo, aunque tanto las mediciones de PSA de nivel inicial como la tasa de cambio de PSA son factores de pronóstico importantes, funcionan mal para distinguir entre quienes desarrollarán un cáncer de próstata mortal y aquellos con un riesgo bajo de progresión de la enfermedad¹⁶. Los resultados obtenidos en este ejemplo muestran que los niveles de MIC-1 en suero tanto antes del tratamiento como después del tratamiento pueden usarse para predecir el desenlace de la enfermedad en sujetos con enfermedad confinada a órgano. Por tanto, una alta concentración de MIC-1 en el diagnóstico puede identificar a sujetos que se beneficiarán de un tratamiento adyuvante sistémico temprano además del tratamiento local.

30 En resumen, con el uso de concentraciones de MIC-1 en suero, se estratificaron sujetos con cáncer de próstata en grupos con tasas de mortalidad por cáncer de próstata sustancialmente diferentes independientemente de marcadores de pronóstico tradicionales de enfermedad. Hubo una asociación entre los niveles de MIC-1 en suero tanto antes del tratamiento como después del tratamiento y el desenlace clínico en sujetos con enfermedad con

riesgo alto clínicamente localizada, un grupo cuyo pronóstico es difícil de evaluar. Adicionalmente, los niveles de MIC-1 en suero identificaron sujetos con enfermedad con riesgo de bajo a intermedio que en última instancia presentaron progresión. Además, la evaluación de tinción estromal de MIC-1 además de la determinación del nivel de MIC-1 en suero puede permitir una capacidad de distinción adicional entre cáncer de próstata localizado mortal y no mortal.

A lo largo de esta memoria descriptiva, la palabra “comprender”, o variaciones tales como “comprende” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o etapa establecido, o grupo de elementos, número enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, número enteros o etapas.

Cualquier discusión de documentos, actos, materiales, dispositivos, artículos o similares que se ha incluido en la presente memoria descriptiva es únicamente con los fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como una admisión de que cualquiera o la totalidad de estos contenidos forman parte de la base de la técnica anterior o eran conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención tal como existía en Australia o en cualquier otra parte antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Bibliografía

1. Bootcov MR, *et al.* (1997) MIC-1, a novel macrophage inhibitory cytokine, is a divergent member of the TGF-beta superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(21): 11514-11519.
2. Brown DA., *et al.* (2002) Antibody-based approach to high volume genotyping for MIC-1 polymorphism. *Biotechniques*; 33(1):118-120, 22, 24 *passim*.
3. Moore AG., *et al.* (2000) The transforming growth factor- β superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *J Clin Endocrinol Metab*; 85(12): 4781-4788.
4. Bottner M., *et al.* (1999) Expression of a novel member of the TGF-beta superfamily, growth/differentiation factor-15/macrophage-inhibiting cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in adult rat tissues. *Cell Tissue Res* 297(1): 103-110.
5. Fairlie WD., *et al.* (1999) MIC-1 is a novel TGF-beta superfamily cytokine associated with macrophage activation. *J Leukoc Biol* 65(1): 2-5.
6. Bauskin AR., *et al.* (2006) Role of macrophage inhibitory cytokine-1 in tumourigenesis and diagnosis of cancer. *Cancer Res* 66(10): 4983-4986.
7. Welsh JB., *et al.* (2003) Large-scale delineation of secreted protein biomarkers overexpressed in cancer tissue and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(6): 3410-3415.
8. Brown DA., *et al.* (2006) Measurement of serum levels of macrophage inhibitory cytokine 1 combined with prostatespecific antigen improves prostate cancer diagnosis. *Clin Cancer Res* 12(1): 89-96.
9. Li PX., *et al.*, (2000) Placental transforming growth factor-beta is a downstream mediator of the growth arrest and apoptotic response of tumour cells to DNA damage and p53 overexpression. *J Biol Chem* 275(26): 20127-20135.
10. Kannan K., *et al.* (2000) Profile of gene expression regulated by induced p53; connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* 470(1). 77-82.
11. Tan M., *et al.*, (2000) PTGF-beta, a type beta transforming growth factor (TGF-beta) superfamily member, is a p53 target gene that inhibits tumour cell growth via TGF-beta signalling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(1): 109-114.
12. Schraudenbach P. y Bermejo CE. (2007) Management of the complications of radical prostatectomy. *Curr Urol Rep* 8(3):197-202.
13. Johansson JE., *et al.* (2004) Natural history of early, localized prostate cancer. *Jama* 291(22): 2713-2719.

14. Albertsen PC., *et al.* (2005) 20-year outcomes following conservative management of clinically localized prostate cancer. *Jama*; 293(17): 2095-2101.
- 5 15. Bill-Axelson A., *et al.* (2005) Radical prostatectomy versus watchful waiting in early prostate cancer. *N Engl J Med* 352(19): 1977-1984.
16. Fall K., *et al.* (2007) Prostate-specific antigen levels as a predictor of lethal prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*;99(7): 526-532.
- 10 17. Albertoni M., *et al.* (2002) Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene*; 21(27): 4212-4219.
18. Baek SJ., *et al.* (2001) Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumourigenic activities. *Mol Pharmacol* 59(4): 901-908.
- 15 19. Ferrari N., *et al.* (2005) The transforming growth factor-beta family members bone morphogenetic protein-2 and macrophage inhibitory cytokine-1 as mediators of the antiangiogenic activity of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Clin Cancer Res.* 11(12): 4610-4619.
- 20 20. Lee DH. *et al.* (2003) Macrophage inhibitory cytokine-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by upregulating the urokinase-type plasminogen activator system. *Cancer Res.* 63(15): 4648-4655.
21. Lichtenstein, P. *et al.* (2002) The Swedish Twin Registry: a unique resource for clinical, epidemiological and genetic studies. *J. Intern. Med.* 252, 184-205.
- 25 22. McCleam, G. E. *et al.* (1997) Substantial genetic influence on cognitive abilities in twins 80 or more years old. *Science* 276, 1560-1563.
- 30 23. Finkel, D. *et al.* (2005) The longitudinal relationship between processing speed and cognitive ability: genetic and environmental influences. *Behav Genet* 35, 535-549.
24. Bakaysa, S. L. *et al.* (2007) Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging Cell* 6, 769-774.
- 35 25. Altman, D. G. & Bland, J. M. (2003) Interaction revisited: the difference between two estimates. *BMJ* 326, 219
26. Simm, A. *et al.* (2008) A. Potential biomarkers of ageing. *Biol. Chem.* 389, 257-265
- 40 27. Johnen, H. *et al.* (2007). Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1. *Nat. Med.* 13, 1333-1340
28. Kempf, T *et al.* (2007) Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 50, 1054-1060
- 45 29. Brown, DA *et al.* (2003) MIC-1 serum level and genotype: associations with progress and prognosis of colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 9:2642-2650.
30. Bauskin *et al.* (2005) The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: Role in Determining Prostate Cancer Outcome. *Cancer Res* 65(6) 2330-2336
- 50 31. Gonen, M. and Heller, G. (2005) Concordance probability and discriminative power of proportional hazards regression. *Biometrika* 92: 965-970
- 55 32. Gray RJ. (2001) *Paquete cmprsk* [serie en línea] Boston: Department of Biostatistical Science, Dana-Farber Cancer Institute. Accessed at <http://biowww.dfci.harvard.edu/~gray> el 17 de octubre de 2008

33. Gray, R. J. (1988) A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk. *Ann Stat*, 16: 1141-1154, 1988

5 34. Sobin, L.H. and Wittekind, Ch. (eds) (2002) *TNM Classification of Malignant Tumours*, 6th edition. John Wiley & Sons, Hoboken, Nueva Jersey, Estados Unidos de América

35. Documento WO 01/81928

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de pronóstico de la supervivencia global de un sujeto aparentemente sano, comprendiendo el método detectar una cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba de dicho sujeto, en el que la cantidad elevada de MIC-1 está asociada con una probabilidad aumentada de muerte del sujeto.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba predice una probabilidad aumentada de muerte por cualquier causa distinta de accidente o infortunio.
- 15 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que la cantidad elevada de MIC-1 predice una probabilidad aumentada de muerte del sujeto en el plazo de un periodo de 10 años desde la toma de la muestra corporal de prueba.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra corporal de prueba es una muestra de suero.
- 20 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método comprende detectar una cantidad elevada de MIC-1 que es $> 1,3$ ng/ml.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la cantidad elevada de MIC-1 en la muestra corporal de prueba se detecta mediante:
- (i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y
- 25 (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) de sujeto(s) normal(es).
- 30 7. Método según la reivindicación 6, en el que el/los sujeto(s) normal(es) es/son de edad coincidente en el plazo de 5 años de la edad del sujeto del que se ha tomado la muestra corporal de prueba relevante.
8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cantidad elevada de MIC-1 en una muestra corporal de prueba es un aumento de la cantidad de MIC-1 dentro de un sujeto detectada usando medición en serie mediante:
- 35 (i) determinar la cantidad de MIC-1 presente en dicha muestra corporal de prueba; y
- (ii) comparar dicha cantidad de MIC-1 frente a una cantidad o un intervalo de cantidades de MIC-1 presente en muestra(s) corporal(es) comparativa(s) tomada(s) del mismo sujeto en un punto de tiempo anterior.
- 40 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que el método comprende detectar un aumento de la cantidad de MIC-1 de $>0,6$ ng/ml.
- 45 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sujeto tiene más de 35 años de edad.

FIGURA 1

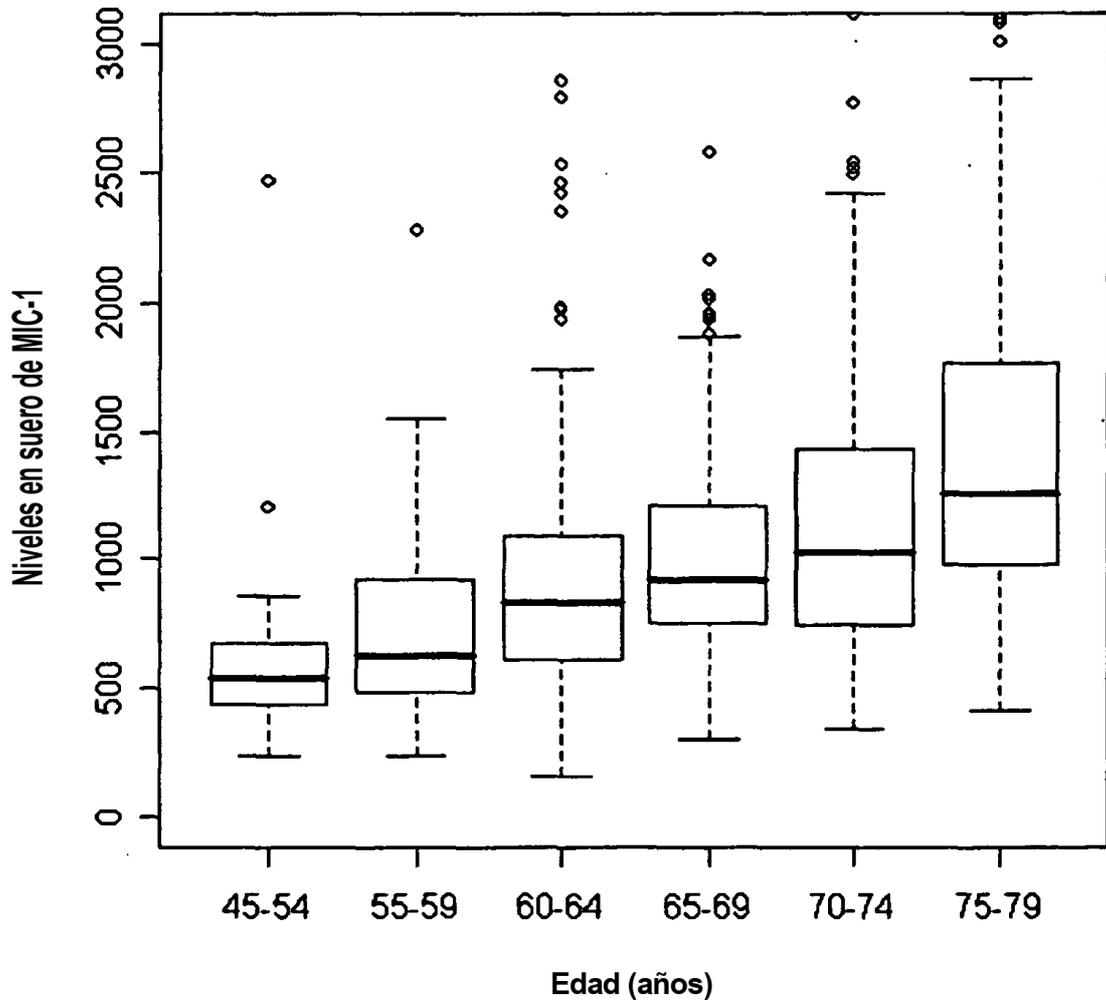


FIGURA 2

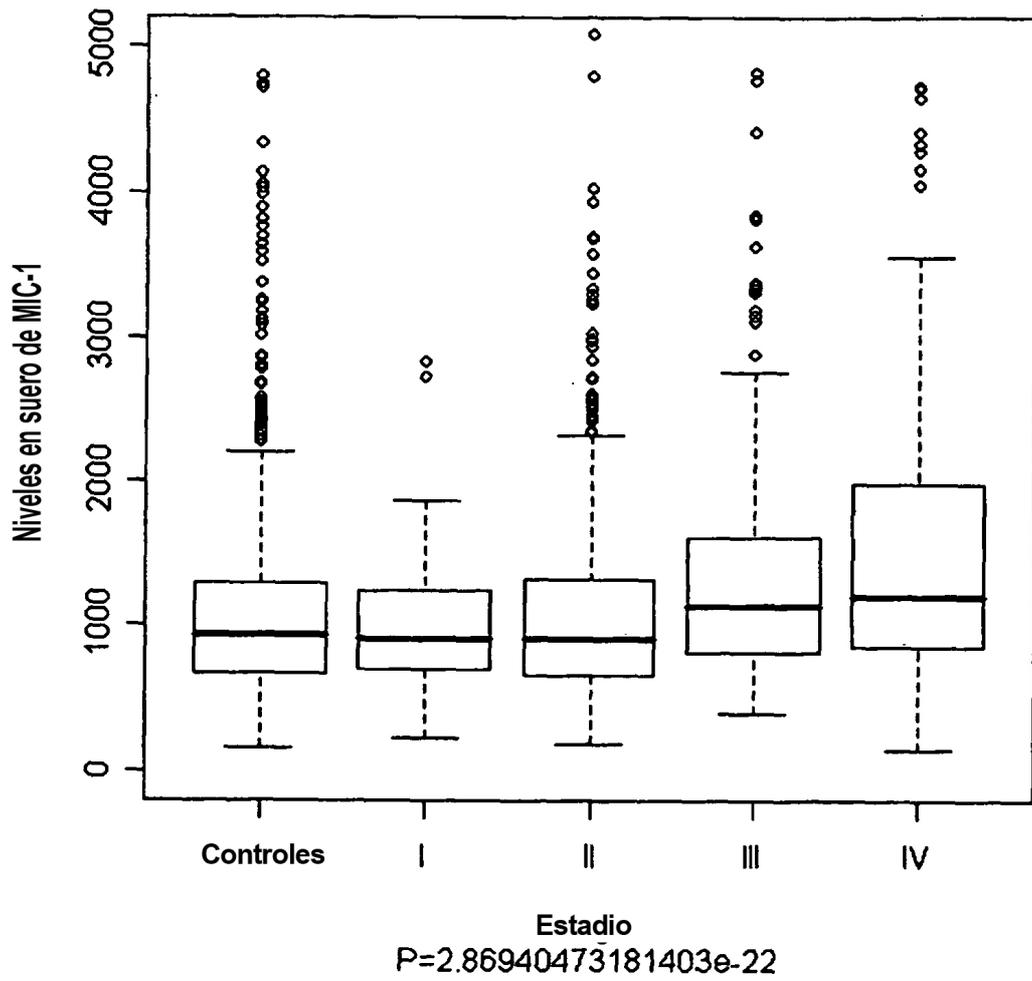
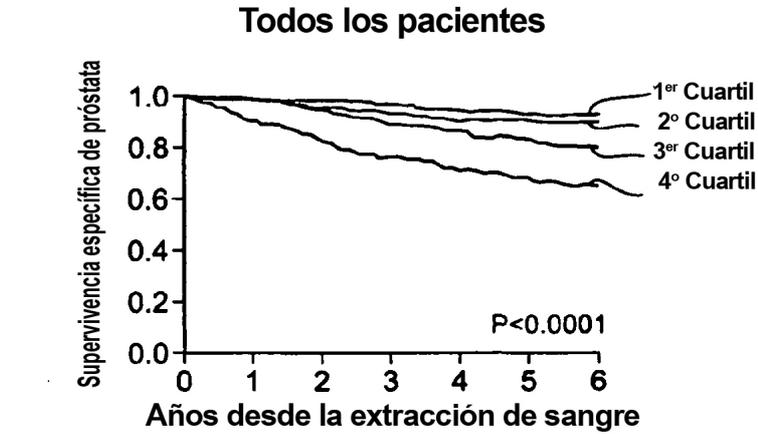


FIGURA 3

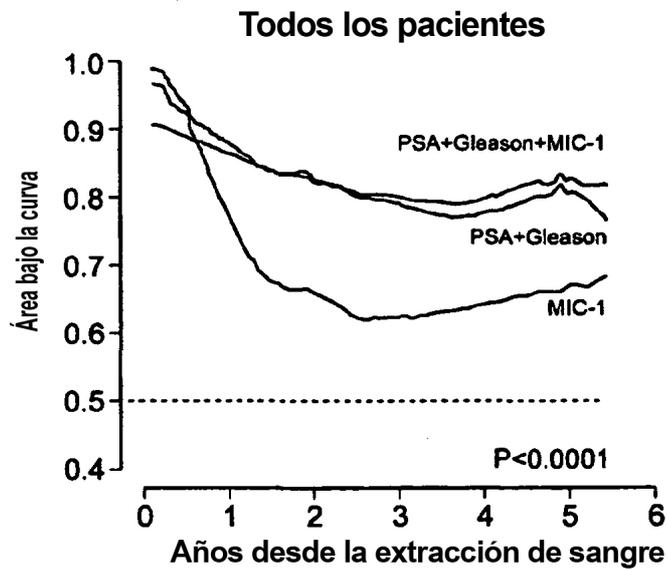
A



N.º en riesgo

1 ^{er} Cuartil	345	345	340	327	318	91	3
2 ^o Cuartil	345	342	329	319	308	104	1
3 ^{er} Cuartil	345	339	323	301	281	108	1
4 ^o Cuartil	345	307	268	236	210	85	2

B

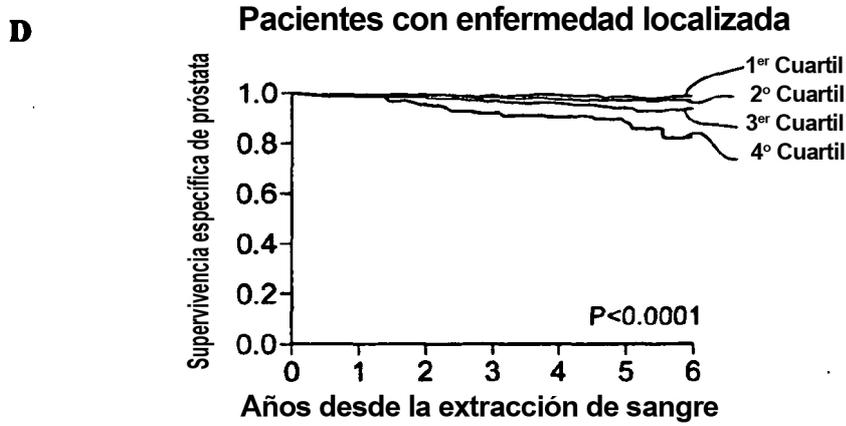


C

Todos los pacientes

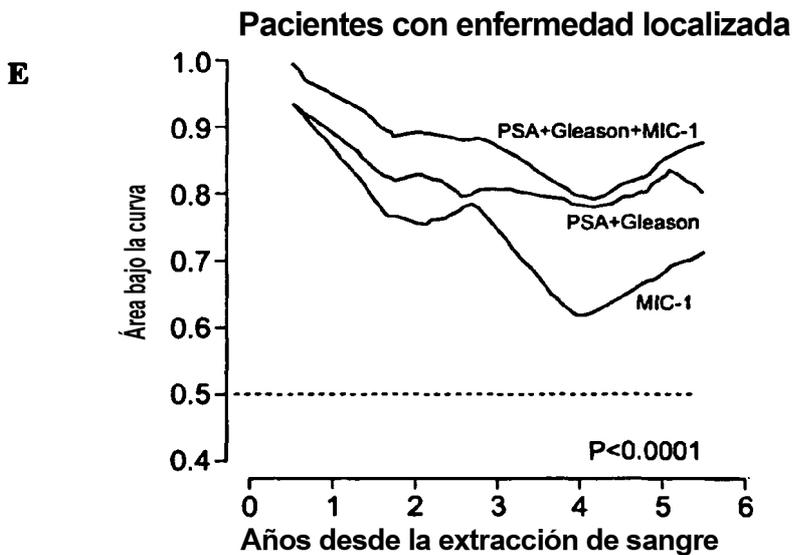
Factor de predicción	Concordancia global
MIC-1	0.70(0.65-0.73)
MIC-1+Gleason	0.82(0.80-0.85)
MIC-1+PSA+Gleason	0.84(0.82-0.86)

FIGURA 3



N.º en riesgo

1 ^{er} Cuartil	276	276	276	271	268	81	3
2 ^o Cuartil	233	233	230	228	223	75	1
3 ^{er} Cuartil	201	201	196	192	186	76	1
4 ^o Cuartil	187	183	173	159	148	68	1



Pacientes con enfermedad localizada

F

Factor de predicción	Concordancia global
MIC-1	0.72(0.65-0.78)
MIC-1+Gleason	0.81(0.76-0.89)
MIC-1+PSA+Gleason	0.86(0.81-0.91)

FIGURA 4

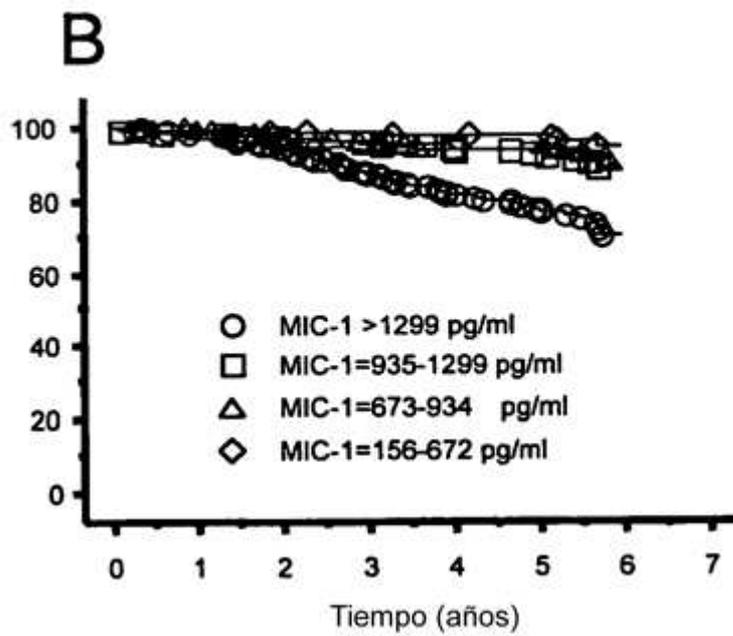
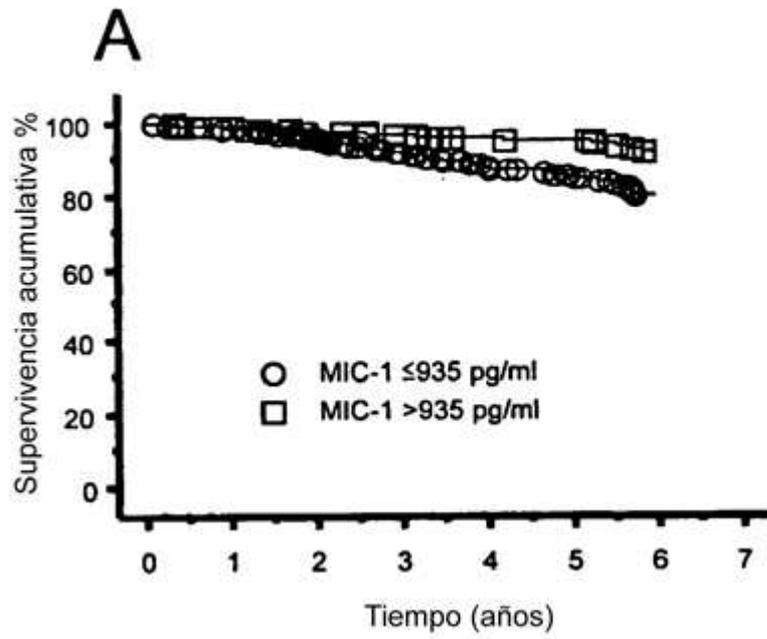


FIGURA 5

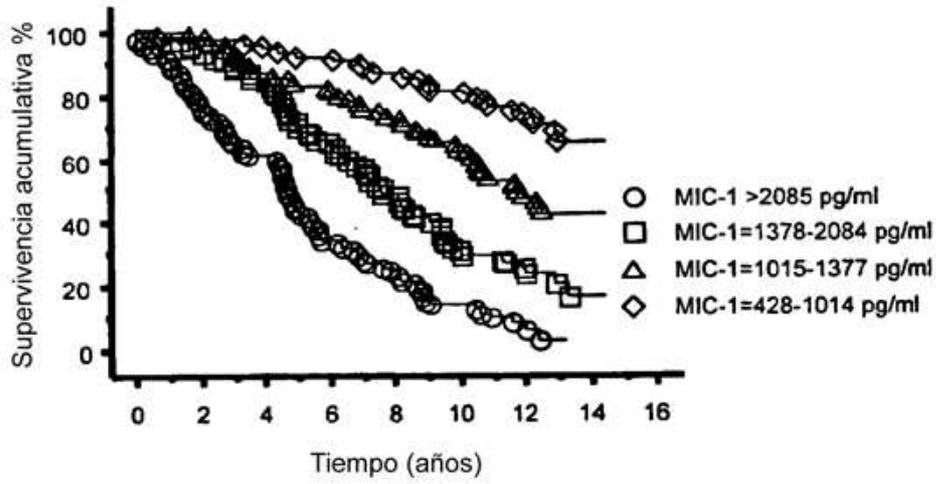


FIGURA 6

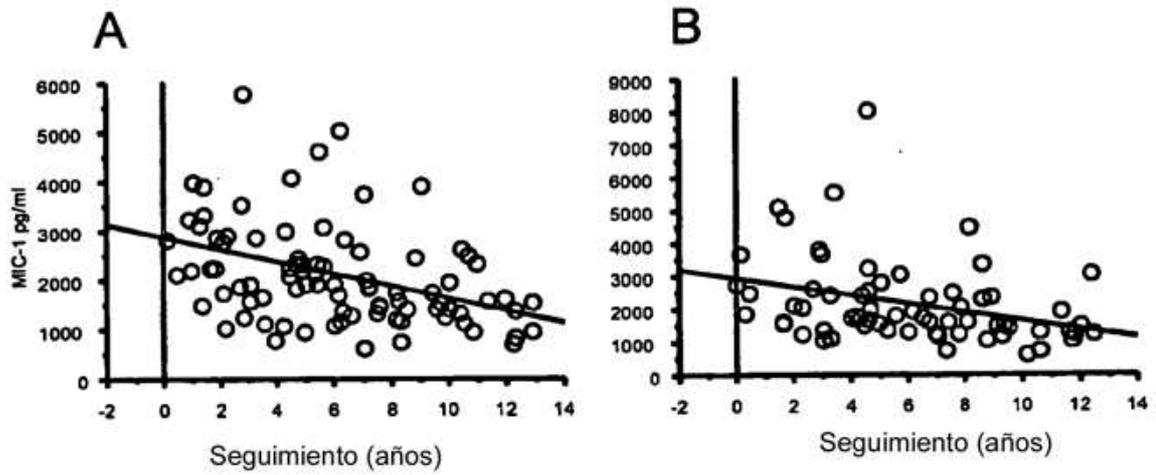
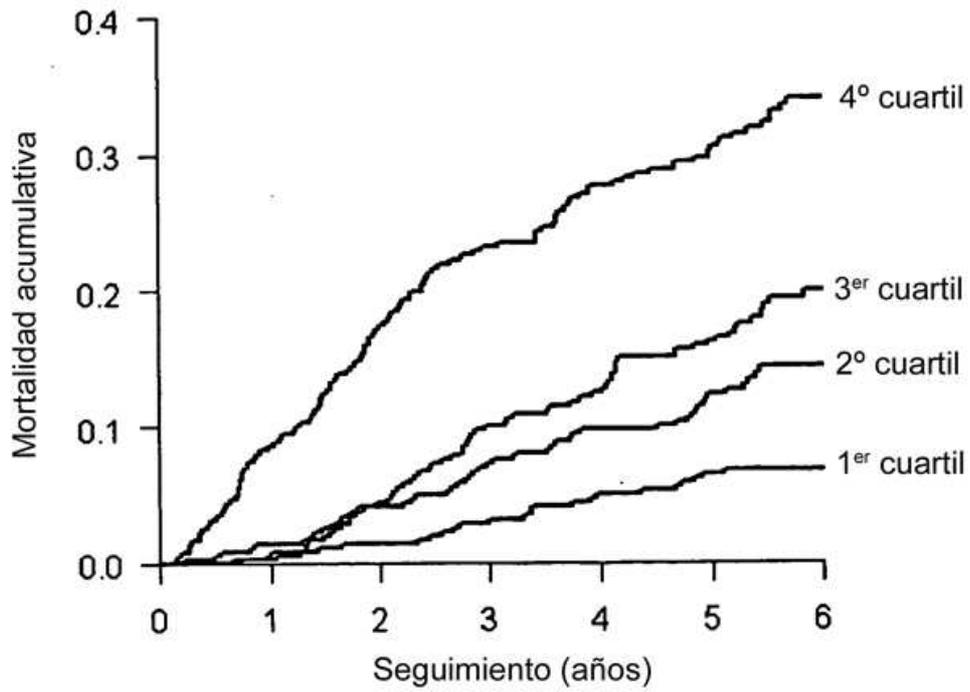


FIGURA 7



N.º en riesgo

1º cuartil	361	360	355	343	334	326	325
2º cuartil	360	356	342	329	318	303	298
3º cuartil	360	352	338	316	297	278	263
4º cuartil	361	321	277	245	218	322	303