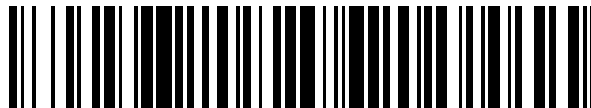


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 544 882**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010 E 10752447 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 2459748**

54 Título: **Determinación del riesgo de metástasis distante en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio I-IIIa, tratados quirúrgicamente**

30 Prioridad:

30.07.2009 PL 38868109

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

04.09.2015

73 Titular/es:

**GDANSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY (33.3%)
Marii Skłodowskiej-Curie 3a
80-210 Gdansk, PL;
SKRZYPSKI, MARCIN (33.3%) y
JASSEM, JACEK (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SKRZYPSKI, MARCIN y
JASSEM, JACEK**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 544 882 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

Determinación del riesgo de metástasis distante en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio I-IIIa, tratados quirúrgicamente.

Campo de la invención y la esencia

5 La presente invención se encuentra dentro del área general de la genética médica y en los campos de la biotecnología y la oncología. Más específicamente, se refiere al método de determinación del riesgo de metástasis distante y la determinación del pronóstico en los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, tratados quirúrgicamente (NSCLC) en estadio I-IIIa. El riesgo de recaída y el pronóstico se establecen relacionando la expresión de los microARN en la muestra de tejido del tumor primario con los valores de expresión de referencia de los microARN enumerados (en un modelo de predicción de reincidencia distante). En este modelo, las expresiones de microARN particulares se correlacionan bien con el alto o bajo riesgo de metástasis distante y por lo tanto con el pronóstico del paciente.

Antecedentes

15 El cáncer de pulmón es la causa más común de mortalidad por cáncer, tanto en hombres como en mujeres. Anualmente, existen 20,000 nuevos casos en Polonia, el 80% de los cuales son diagnosticados con NSCLC. En Polonia y en varios otros países de Europa, el cáncer de pulmón de células escamosas es el tipo histológico más frecuente entre los pacientes tratados quirúrgicamente.

20 En las primeras etapas, la cirugía (lobectomía o neumonectomía) es el tratamiento de elección, sin embargo, incluso en este grupo los resultados del tratamiento no son satisfactorios, con aproximadamente sólo el 50% de los pacientes que sobreviven 5 años.

25 El patrón más común de fracaso del tratamiento después de la cirugía es la diseminación del tumor. Un número de ensayos clínicos prospectivos mostró que la adición de quimioterapia mejora en promedio la supervivencia global de los pacientes en aproximadamente un 5%. En números absolutos, este beneficio sólo en Polonia se traduce en 150 pacientes salvados adicionalmente cada año. Sin embargo, para lograr este aumento 3,000 pacientes deben recibir quimioterapia postoperatoria, mientras que sólo el 50% de ellos desarrollará reincidencia de la enfermedad.

30 En la actualidad, el único criterio de selección aprobado para el tratamiento adyuvante es el estadio de la enfermedad evaluado patológicamente. Los estudios prospectivos aleatorizados han demostrado el beneficio de la quimioterapia adyuvante en pacientes con NSCLC en estadio II y III. Sin embargo, si se examinan estos grupos, resulta que alrededor del 40% del estadio II y el 25% en estadio III de los pacientes no son recurrentes y por lo tanto no necesitan ningún tipo de tratamiento postoperatorio.

35 Por otro lado, el riesgo de metástasis distante en pacientes en estadio I, que actualmente no reciben quimioterapia adyuvante es tan alto como el 30%. Por lo tanto, esta categoría de pacientes aparentemente incluye subgrupos de pacientes con alto riesgo de recaída que podrían beneficiarse de la quimioterapia postoperatoria. Sin embargo, los métodos disponibles actualmente no permiten la identificación de estos subgrupos. De hecho, la evolución de los pacientes tratados quirúrgicamente es difícil de predecir basándose en las variables clínicas y patológicas, tales como estadio, el tipo histológico, el sexo o la edad. Los pacientes con exactamente las mismas características pueden variar en relación con el riesgo de metástasis y el pronóstico.

40 Los resultados de la investigación sobre marcadores moleculares sugieren que la evaluación de la transcripción puede constituir un buen marcador de pronóstico en el cáncer de pulmón. Los perfiles de expresión génica (evaluación de la abundancia de ARNm) se relacionó con el riesgo individual de diseminación de la enfermedad (Bhattacharjee et al. "Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses". Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 13790-13795).

Parece que el uso de la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-PCR) es la técnica más apropiada para el pronóstico basado en el análisis de la expresión génica en tejido tumoral.

45 Endoh et al., en una publicación titulada "Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction" (J Clin Oncol 2004; 22: 811-819) describe una técnica que permite la cuantificación de la expresión génica en las células cancerosas. Los resultados de numerosos estudios basados en esta técnica pueden en última instancia conducir a la modificación de la clasificación histológica de cáncer de pulmón, así como proporcionar nuevos criterios moleculares para refinar el estadio de esta neoplasia.

50

Anteriormente presentamos el método para evaluar el riesgo de recaída distante y el pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón de células escamosas mediante la evaluación de la expresión génica con RT-PCR (Skrzypski et al. "Three-gene expression signature predicts survival in early-stage squamous cell carcinoma of the lung". Clin Cancer Res 2008; 14: 4794-4799).

5 Simultáneamente a los estudios sobre el papel de pronóstico de la expresión génica (evaluación del ARNm), en los últimos años una nueva clase de moléculas: microARN ha atraído la atención como un potencial marcador de pronóstico.

10 Estas moléculas son importantes en muchos procesos celulares, tales como la embriogénesis, proliferación y diferenciación de las células, la apoptosis y la oncogénesis (revisado por Earspn et al. "MicroRNAs in development and disease". Clin. Genetics 2008; 74: 296-306).

15 Los microARN son cadenas cortas de ARN (19-23 nucleótidos) que regulan la expresión génica a través de la inhibición de la traducción del ARNm. Este efecto está mediado por el enlace entre microARN y secuencias diana en las moléculas de ARNm en las regiones UTR. Dada la permisividad en el enlace entre estas moléculas, lo que permite la complementariedad imperfecta, un microARN puede controlar la expresión de cientos o miles de moléculas de ARNm y por lo tanto los genes.

El potencial de pronóstico de la evaluación de la expresión de microARN en tumores primarios ha sido investigado en muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón. En una publicación por Yu et al. "MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer" (Cancer Cell 2008; 13: 48-57), los autores identificaron un perfil que consiste en 5 microARN, que es altamente predictivo de pronóstico en pacientes con NSCLC en estadios I-III A.

20 En la actualidad, se conocen algunos métodos moleculares para establecer el pronóstico en pacientes con NSCLC en estadio I-III A que se sometieron a tratamiento quirúrgico. Estos métodos, en principio, incluyen: (i) obtener una muestra de tejido del tumor primario, (ii) aislamiento del ARN, (iii) transcripción inversa del microARN o ARNm en ADNc, y (iv) establecimiento de la cantidad de microARN o ARNm en el tumor primario. Por último, el valor de la expresión de ARNm o microARN se refirió a los valores de expresión de referencia en un modelo de predicción de
25 reincidencia de la enfermedad, por lo que ciertos valores de expresión se correlacionan con un alto y con un cierto bajo riesgo de reincidencia.

30 En este documento, se presenta un método que permite la determinación del riesgo de metástasis distante y el pronóstico temprano de NSCLC (estadio I-III A). Este método se basa en la evaluación de la expresión en el tejido de tumor primario de varios micro-ARN (enumerados a continuación). NSCLC particular demuestra la expresión diferencial de los microARN enumerados, que determina diferentes cursos clínicos de la enfermedad, más específicamente una propensión variada para formar metástasis distante. El método consiste en la adquisición de una muestra de tejido del tumor primario (fijada en formalina o congelado) del que se extrae el ARN, además de la retrotranscripción de ARN en ADN complementario (ADNc) y su cuantificación con el uso del método de PCR cuantitativa. El valor de la expresión de microARN medida en el tejido del tumor primario se refiere a los valores de
35 referencia de expresión de microARN enumerados en la Tabla 1 (por encima o por debajo del valor de corte de prueba). Estos valores se correlacionan con el riesgo alto y bajo de metástasis distante. Esto a su vez permite la asignación de los pacientes a los grupos con alto o bajo riesgo de reincidencia distante.

Tabla 1

Símbolo	nombre de microARN	Secuencia de microARN
A	hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU
B	hsa-miR-101*	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU
C	hsa-miR-192*	CUGCCAAUUC CAUAGGUCACAG
D	hsa-miR-10a	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG
E	E hsa-miR-874	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA
F	hsa-miR-10b*	CAGAUUCGAUUCUAGGGGAAUA
G	hsa-miR-532-3p	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA

H	hsa-miR-622	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC
I	hsa-miR-508-3p	UGAUUGUAGCCUUUUGGAGUAGA
J	hsa-miR-221	AGCUACAUGUCUGCUGGGUUU
K	hsa-miR-340*	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC
L	hsa-miR-10a*	CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA
M	hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU
N	hsa-miR-519e	AAGUGCCUCCUUUAGAGUGUU
O	hsa-miR-103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
P	hsa-miR-149	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCC
R	hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU
S	hsa-miR-92a-1*	AGGUUGGGAUCCGGUUGCAAUGCU
T	hsa-miR-660	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG
W	hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUCC
Y	hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU
Z	hsa-miR-654-3p	UAUGUCUGCUGACCAUCACCUU

Un método ejemplar y preferido para establecer el pronóstico individual del paciente y el riesgo de reincidencia de NSCLC se refiere a un modelo en el que la puntuación de riesgo (RS) se calcula basándose en los niveles de expresión en el tumor primario de al menos dos microARN enumerados en la Tabla 1.

$$RS = \text{micro ARN A} + \text{micro ARN B} + \dots + \text{micro ARN Z}$$

5

micro ARN A ... Z - valor de riesgo parcial

en donde el valor de RS se calcula sumando los "valores parciales de riesgo" incurridos de las expresiones del microARN que conforman una puntuación de riesgo dado. Los valores parciales de riesgo se expresan como valores numéricos y se atribuyen según el modelo de predicción de la reincidencia en el que una expresión por encima o por debajo del valor de corte de prueba para un microARN determinado resulta ya sea en un valor de riesgo parcial alto (preferiblemente "1") o bajo (preferiblemente "0").

10

La realización del método mencionado anteriormente comprende todo el kit necesario para llevar a cabo la evaluación de la expresión de microARN. Dicho kit contiene al menos: (i) los reactivos para llevar a cabo la transcripción inversa de las moléculas de microARN en ADNc (cebadores específicos, la transcriptasa inversa, soluciones reguladoras y otros reactivos); (ii) un conjunto de cebadores para llevar a cabo la reacción de PCR cuantitativa (por lo menos un cebador se hibrida con al menos un fragmento de la secuencia de ADNc correspondiente para la molécula de microARN de la lista descrita en la reivindicación 1, polimerasa, soluciones reguladoras y otros reactivos).

15

La aplicación de la invención permitirá la evaluación del riesgo individual de reincidencia en pacientes con NSCLC y proporcionará una herramienta precisa para la selección de pacientes particulares a terapias adyuvantes en función de su riesgo individual. Sólo los pacientes con alto riesgo de reincidencia se pueden administrar con quimioterapia adyuvante, mientras que los pacientes de bajo riesgo podrían ahorrarse el tratamiento adicional. Como resultado final, se pueden esperar resultados del tratamiento mejorado, así como reducción de la toxicidad y los costes del tratamiento.

20

La invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

25

Ejemplo 1

5 El ARN total que contiene microARN fue aislado de tejido tumoral con Mini Kit miRNeasy (50) (Qiagen) 217004. La concentración y la calidad del ARN se evaluaron con RNA Lab Chip (Bianalyzer Agilent 2100). Posteriormente, el ARN fue retrotranscrito a ADNc (reacción RT) con el kit TaqMan microARN RT 4366596 - Applied Biosystems con el uso de cebadores tallo-bucle específicos, específicos para microARN (MegaPlex RT Cat. no. 4401091 Applied Biosystems), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

10 El microARN (ADNc resultante de la reacción RT) se cuantificó con la reacción de PCR cuantitativa utilizando pares de cebadores específicos y las sondas TaqMan fluorescentes y polimerasa con actividad 5' nucleasa en tarjetas microfluídicas (TaqMan Low Density Arrays - Part Number 4400238 Applied Biosystems) en condiciones de reacción del ciclador HT 7900 (Applied Biosystems), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems).

Se obtuvieron los resultados de expresión en bruto (valores de Ct) a través del software SDS.2.1 (Applied Biosystems) y la expresión se normalizó contra de la expresión de ARN U6.

15 Los valores de expresión de microARN se correlacionan con la expresión de referencia en un modelo de predicción de riesgo (predicción de metástasis distante). En este método, ciertos valores corresponden a un alto riesgo de reincidencia, mientras que otros a menor riesgo de reincidencia. La expresión correspondiente a estos valores de referencia indica alto o bajo riesgo de reincidencia de la enfermedad en el paciente individual.

Tabla 2

Símbolo	nombre de microARN	secuencia de microARN	nivel de significación estadística (valor p)
A	hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU	0,0002
B	hsa-miR-101*	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU	0,005
C	hsa-miR-192*	CUGCCAAUUC CAUAGGUCACAG	0,011
D	hsa-miR-10a	UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG	0,025
E	hsa-miR-874	CUGCCCUGGCCCGAGGGACCGA	0,021
F	hsa-miR-10b*	CAGAUUCGAUUCUAGGGGAAUA	0,017
G	hsa-miR-532-3p	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	0,031
H	hsa-miR-622	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC	0,025
I	hsa-miR-508-3p	UGAUUGUAGCCUUUUGGAGUAGA	0,026
J	hsa-miR-221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUU	0,027
K	hsa-miR-340*	UCCGUCUCAGUUACUUUAUAGC	0,028
L	hsa-miR-10a*	CAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA	0,029
M	hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	0.05
N	hsa-miR-519e	AAGUGCCUCCUUUJAGAGUGUU	0,045
O	hsa-miR-103	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	0,032
P	hsa-miR-149	UCUGGCUCGGUGUCUUCACUCC	0,033
R	hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	0,038
S	hsa-miR-92a-1*	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU	0,041

T	hsa-miR-660	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG	0,042
W	hsa-miR-23a	AUCACAUUGCCAGGGAUUJCC	0,042
Y	hsa-miR-885-5p	UCCAUUACACUACCCUGCCUCU	0.05
Z	hsa-miR-654-3p	UAUGUCUGCUGACCAUCACCUU	0,048

Por ejemplo, en la Figura 1 están las curvas de probabilidad de supervivencia libre de metástasis (MFS) de acuerdo con la expresión alta vs. baja de microARN 221 (AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUU).

5 La diferencia entre la MFS en los grupos de alto y bajo riesgo (utilizando el percentil 40 de expresión 221 en todo el grupo de pacientes como un valor de corte) fue altamente significativa ($p = 0.011$). La baja expresión de microARN 221 estaba relacionada con el alto riesgo de reincidencia distante después del tratamiento quirúrgico (casi el 60% a los 5 años).

Otro ejemplo presenta curvas de probabilidad de MFS de acuerdo con expresión alta vs. baja de microARN 10b (UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU).

10 Véase la Fig. 2.

La diferencia entre la MFS media en los grupos de alto y bajo riesgo (utilizando el percentil 40 de la expresión de 10b en todo el grupo de pacientes como un valor de corte) fue altamente significativa ($p = 0.001$). La baja expresión de microARN 10b estaba relacionada con el alto riesgo de reincidencia distante, después del tratamiento quirúrgico (casi el 70% a los 5 años).

15 Otro ejemplo presenta curvas de probabilidad de MFS de acuerdo con expresión alta vs. baja de microARN de microARN 192 * CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG. Véase la Fig.3.

20 La diferencia entre la MFS media en los grupos de alto y bajo riesgo (utilizando el percentil 40 de la expresión 10b en todo el grupo de pacientes como un valor de corte) fue altamente significativa ($p = 0.03$). La elevada expresión de microARN 192* estaba relacionada con el alto riesgo de reincidencia distante después del tratamiento quirúrgico (casi el 60% a los 5 años).

Todos los microARN que se enumeran en esta solicitud de patente están significativamente relacionados con MFS - los valores de p correspondientes se enumeran en la Tabla 2.

La alta expresión (i.e., mayor que la media de todo el grupo) de los siguientes microARN se relaciona con el alto riesgo de reincidencia de NSCLC, después del tratamiento quirúrgico: 92a, 192* y 622

25 La baja expresión de los siguientes microARN (i.e., inferior a la media en todo el grupo), se relaciona con el alto riesgo de reincidencia de NSCLC, después del tratamiento quirúrgico: 10b, 10b*, 10a, 23a, 101*, 103, 149, 221, 222, 340, 508, 519e, 532_3p, 532_5p, 654, 660, 874 y 885-5p.

30 Los puntos de corte establecidos en el nivel del valor de expresión medio o el valor de la expresión percentil 40 para un microARN dado son sólo a modo de ejemplo y de ninguna manera deben ser considerados como limitantes de la reivindicación en esta invención. Los valores de corte finales se determinarán después de realizar el análisis de la expresión de los microARN, mencionado anteriormente en una serie más grande de pacientes.

Ejemplo 2

El método es el mismo que en el ejemplo 1, en donde al menos 2 microARN o más se eligen de la lista de los 22 microARN para compensar un índice de riesgo que refleje el riesgo de reincidencia de constitución de microARN:

35 hsa-miR-532-5p

hsa-miR-92a-1*

hsa-miR-192*

hsa-miR-10b

El índice de Riesgo en este ejemplo toma la siguiente forma:

$$RS = \text{microARN } 532\text{-}5\text{p} + \text{microARN } 92\text{a} + \text{microARN}192 * + \text{microARN } 10\text{b}$$

5 Si la expresión del microARN es indicativa del alto riesgo de acuerdo con el modelo de riesgo de reincidencia, el "riesgo parcial" para un microARN dado toma el valor de "1"; si la expresión de un microARN dado fue indicativo del bajo riesgo de acuerdo con el modelo de riesgo de reincidencia del "riesgo parcial" toma el valor de "0". La escala de riesgo se calculó para cada paciente. A continuación, las curvas de MFS se generaron para los grupos de pacientes con valores de RS por encima y por debajo del valor de corte para RS (el percentil 60 del valor de RS en todo el grupo).

La probabilidad de la MFS se comparó entre los dos grupos.

10 Véase la Fig.4.

Ejemplo 3

El método es el mismo que en el ejemplo 1, en donde al menos 2 microARN o más se eligen de la lista de los 22 microARN para compensar un índice de riesgo que refleja el riesgo de reincidencia de constitución de microARN:

hsa-miR-101*-4395254

15 hsa-miR-532-5p-4380928

hsa-miR-222-4395387

hsa-miR-192*-4395383

hsa-miR-10b-4395329

20 En esta realización de la invención, los valores de "riesgo parcial" son ponderados adicionalmente por un factor de ponderación (en este caso, estos factores se derivaron del análisis de MFS multivariante).

$$RS = (-2,7 * MiR101) + (-0,6 * MiR222) + (-1,2 * MiR532-3p) + (0,78 * MiR192) + (-2 * MiR10b)$$

A continuación, las curvas de MFS se generaron para los grupos de pacientes con valores de RS por encima y por debajo del valor de corte para RS (el percentil 60 del valor de RS en todo el grupo).

La probabilidad de la MFS se comparó entre los dos grupos.

25 Véase la Fig.5.

Ejemplo 4.

30 El método análogo a los ejemplos 1-3, en donde se provee un kit específico (conjunto de reactivos) para llevar a cabo las etapas necesarias del método. El kit contiene todos los reactivos necesarios para aislar el microARN a partir de tejido tumoral y para llevar a cabo la transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa. Entre otros elementos esenciales, el kit contiene los cebadores específicamente, de los cuales al menos uno se hibrida con al menos una parte de los microARN enumerados que permiten reacción de transcripción inversa y los reactivos para la reacción cuantitativa en cadena de polímeros: cebadores que hibridan con al menos una parte de las secuencias de ADNc que corresponden a moléculas de microARN, enzimas y otros reactivos necesarios para reacción cuantitativa en cadena de polímeros.

35

REIVINDICACIONES

5 1. Un método de determinación del riesgo de metástasis distante en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio I-IIIa, tratados quirúrgicamente, en donde el microARN se extrae de una muestra de tejido del tumor primario, retrotranscrito en ADN complementario mediante transcripción inversa, la cantidad de al menos dos microARN incluyendo hsa-miR-10b de la Tabla 1, se examina con el uso del método de PCR cuantitativa y el valor de expresión de cada microARN se refiere a los correspondientes valores de expresión de referencia de microARN en un modelo de predicción de reincidencia de la enfermedad en el cual ciertos valores de expresión se correlacionan con el alto o bajo riesgo de metástasis distante como en la Tabla 1.

Tabla 1

	Nombre de MicroARN	Secuencia de microARN	MARCADOR: Nivel de expresión de microARN que indica un alto riesgo de metástasis distante
1	hsa-miR-10b	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGU	BAJO
2	hsa-miR-192*	CUGCCAAUUCUAGGUCACAG	ALTO
3	hsa-miR-222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	BAJO
4	hsa-miR-532-5p	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	BAJO
5	hsa-miR-101*	CAGUUAUCACAGUGCUGAUGCU	BAJO

10 2. Un método de la reivindicación 1, en donde el riesgo de metástasis distante se establece por medio de las puntuaciones de riesgo (RS), que se calculan en base a los niveles de expresión en el tumor primario de al menos dos microARN enumerados en la Tabla 1, en donde:

$$\mathbf{RS = \text{microARN 1} + \text{microARN 2} + \dots + \text{microARN 5}}$$

15 donde la expresión 'microARN N' (por ejemplo, microARN 192 *, etc.) - indica valor de riesgo parcial, y en donde el valor RS se calcula sumando los valores parciales de riesgo incurridos de la expresión de cada microARN que constituye una puntuación de riesgo dado, y en donde los valores parciales de riesgo se obtienen de acuerdo con el modelo de predicción de la reincidencia, en el cual un valor de alto riesgo se expresa como valor numérico "1", y un valor de bajo riesgo se expresa preferentemente en forma de valor numérico, preferiblemente "0".

20 3. Un método de las reivindicaciones 1-2, en donde se utiliza, todo el kit que comprende un conjunto de cebadores de los cuales al menos uno se hibrida con un fragmento del microARN examinado, que permite llevar a cabo la transcripción inversa y la reacción de PCR cuantitativa y preferiblemente comprende reactivos tales como soluciones reguladoras, enzimas y, posiblemente, otros reactivos para realizar la transcripción inversa y la reacción de PCR cuantitativa.

25

FIG. 1

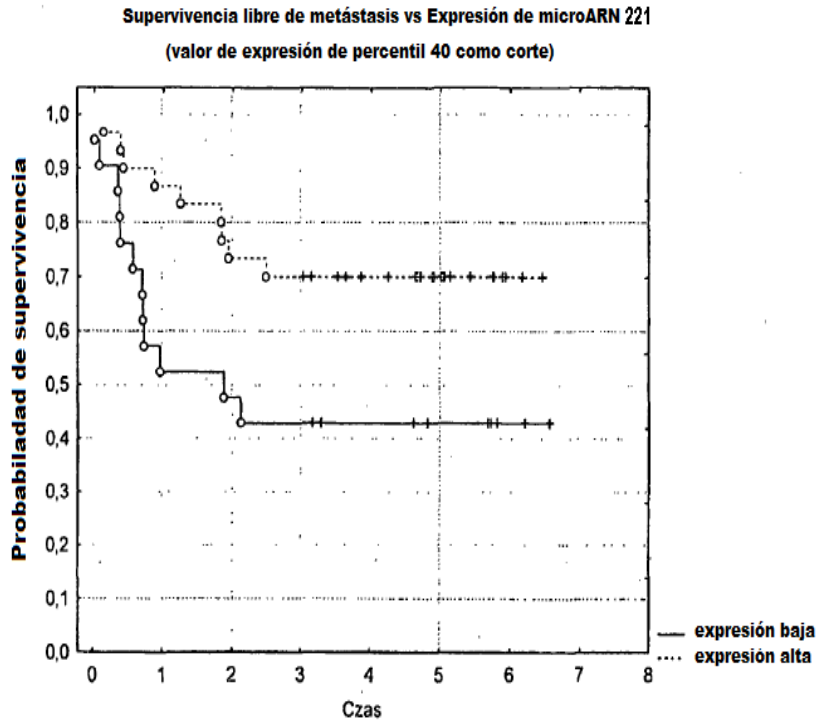


FIG. 2

Supervivencia libre de metástasis vs Expresión microARN 10b
(valor de expresión percentil 40 como corte)

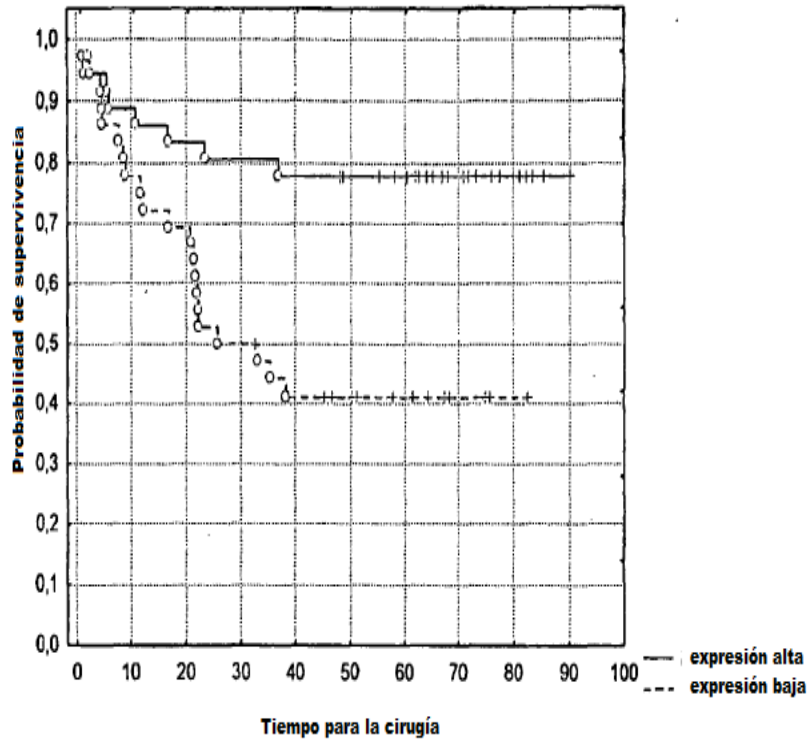


Fig. 3

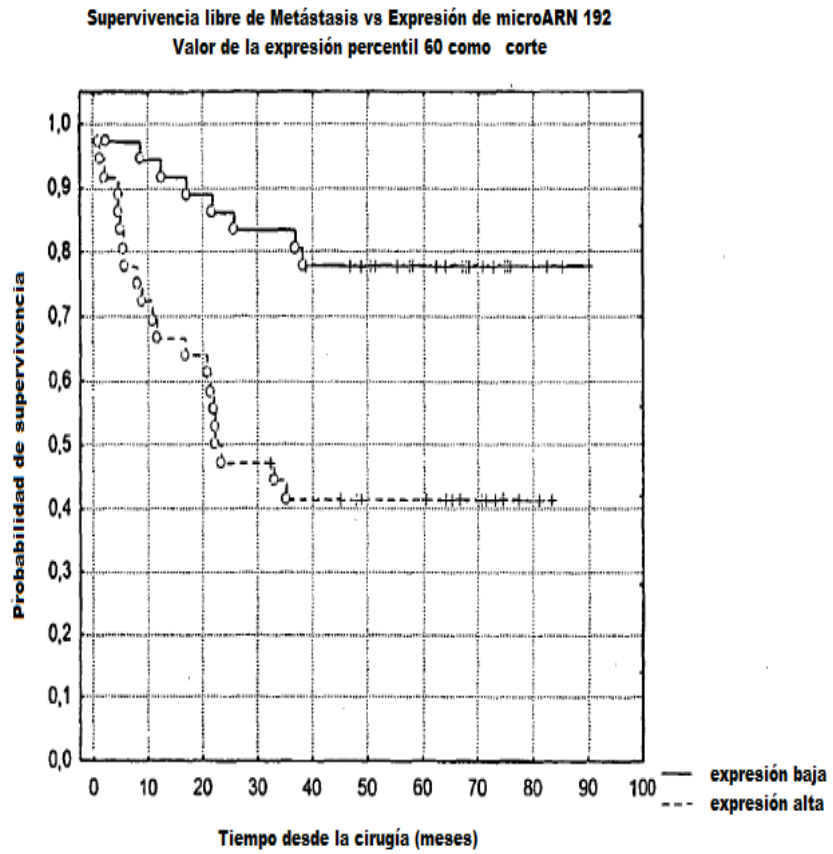


FIG. 4

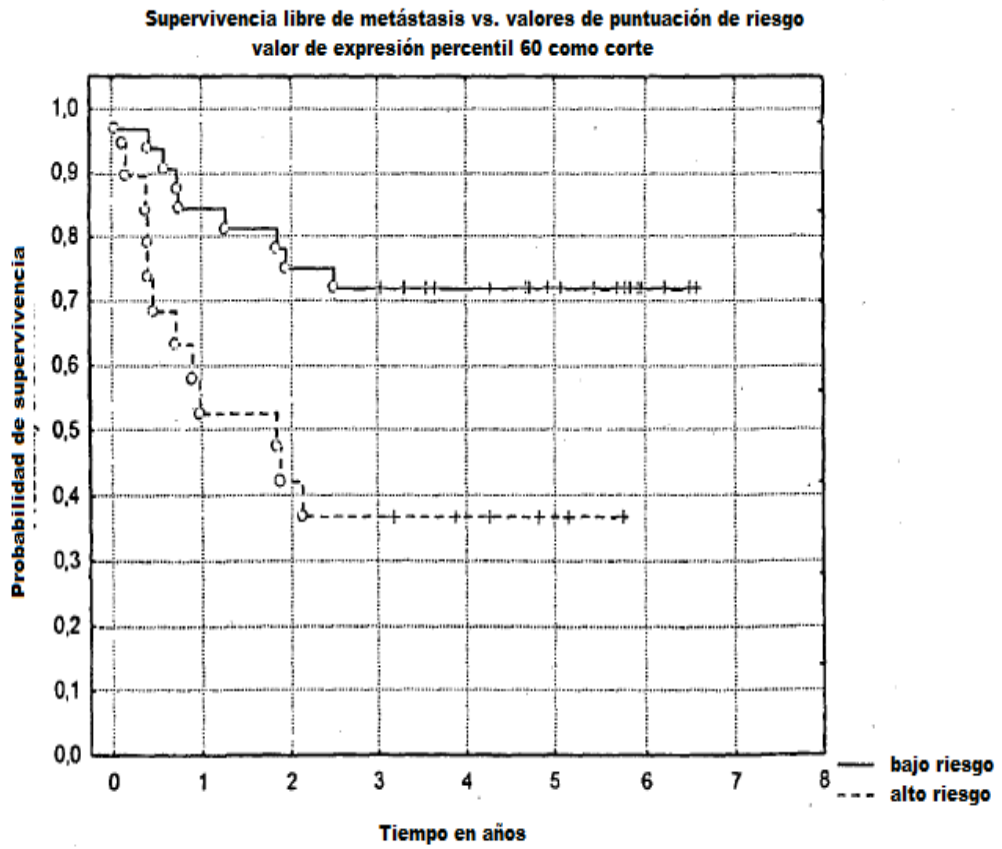


FIG. 5

Supervivencia libre de metástasis vs. valores de puntuación de riesgo
valor de expresión percentil 60 como corte

