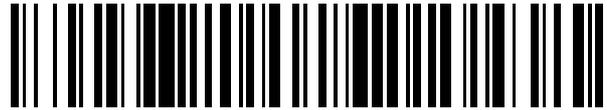


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 089**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 09806059 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2015 EP 2389450**

54 Título: **Métodos para determinar un pronóstico de supervivencia para una paciente con cáncer de mama**

30 Prioridad:

**23.01.2009 NO 20090358**  
**09.06.2009 WO PCT/NO2009/000214**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**18.09.2015**

73 Titular/es:

**BERGEN TEKNOLOGIOVERFORING AS (100.0%)**  
**Thormohlensgate 51**  
**5006 Bergen, NO**

72 Inventor/es:

**PENDINO, FREDERIC;**  
**LILLEHAUG, JOHAN R.;**  
**ALOYSIUS, THOMAS y**  
**KNAPPSKOG, STIAN**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 546 089 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).

**MÉTODOS PARA DETERMINAR UN PRONÓSTICO DE SUPERVIVENCIA PARA UNA PACIENTE CON CÁNCER DE MAMA**

**DESCRIPCIÓN**

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar un pronóstico de supervivencia para una paciente con cáncer de mama.

10 **Antecedentes de la invención**

La identificación de genes específicamente desregulados en células tumorales podría sacar a la luz nuevos supresores tumorales y oncogenes con posibles aplicaciones clínicas en diagnóstico, pronóstico y terapéutica. En la solicitud PCT en tramitación junto con la presente del solicitante, PCT/NO09/000214 se describe un nuevo gen de retinoides diana, CXXC5, que codifica para un factor nuclear que se ha caracterizado funcionalmente por primera vez y se denominó RINF (factor nuclear inducible por retinoides).

15 Esos datos indican que RINF (CXXC5) desempeña un papel esencial durante la hematopoyesis humana *in vitro*. En efecto, estudios de expresión y experimentos de silenciamiento génico demuestran ambos la implicación de RINF durante la diferenciación terminal de células de leucemia mieloide (líneas celulares NB4 y HL60), pero también durante la mielopoyesis de células progenitoras hematopoyéticas normales (células CD34+ de médula ósea). De acuerdo con su papel esencial durante la diferenciación mieloide terminal y su localización en el cromosoma 5q31.3, una región delecionada a menudo en la leucemia mieloide (leucemia mieloide aguda y mielodisplasia), también se

20 ha sugerido RINF como candidato a supresor tumoral prometedor en ese locus en algunos tumores malignos mieloides.

CXXC5 / RINF se conoce a partir de Katoh Masuko *et al.*, Internat. J. Oncol. vol. 25, 2004, págs. 1193-1199. Este documento menciona que CXXC5 es un parólogo de CXXC4, y perteneciente a una familia de proteínas implicadas en carcinogénesis y diferenciación. Sin embargo, no se da a conocer el uso de CXXC5 en la provisión de un pronóstico de una paciente con cáncer de mama.

25

También se conocen ejemplos para el uso de un gen marcador de diagnóstico para cáncer. Por ejemplo, Rochefort *et al.*, Cancer Metastasis, vol. 9, 1990, págs. 321-331 dan a conocer catepsina D como marcador de diagnóstico para cáncer de mama. Sin embargo, de nuevo no se da a conocer el uso de CXXC5 en la provisión de un pronóstico de una paciente con cáncer de mama.

30

Dado que la expresión de RINF no se limita al tejido hematopoyético y también puede estar implicada en el desarrollo y/o la homeostasis de otros tejidos, se ha investigado la expresión de RINF en algunos tumores sólidos derivados de diferentes tejidos.

35

Se ha mostrado en la solicitud PCT en tramitación junto con la presente del solicitante, PCT/NO09/000214 que este gen podría tener una expresión desregulada en algunos tejidos malignos en comparación con sus tejidos normales de origen. En efecto, se examinó la expresión de ARNm de RINF en muestras de tumor sólido de pacientes que presentan cáncer de mama, y la expresión de RINF era significativamente mayor en tumores de mama en comparación con controles de tejidos de mama normales.

40

**Sumario de la invención**

Se ha encontrado ahora sorprendentemente que el nivel de expresión de CXXC5 se correlaciona con la supervivencia de pacientes con cáncer de mama.

Por tanto, la presente invención se refiere a métodos para determinar el pronóstico de supervivencia.

55 **Descripción detallada de la invención**

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar un pronóstico de supervivencia para una paciente con cáncer de mama según la reivindicación 1. El método comprende:

60 (a) determinar una medida para el nivel de expresión de CXXC5 en un tumor, o una biopsia tumoral o muestra que contiene células neoplásicas de dicha paciente,

(b) clasificar dicha paciente como perteneciente o bien a un primer grupo o bien a un segundo grupo de pacientes, en el que dicho primer grupo de pacientes tiene niveles de expresión de CXXC5 menores que dicho segundo grupo de pacientes, y en el que el primer grupo de pacientes se clasifica como que tiene una probabilidad aumentada de supervivencia en comparación con dicho segundo grupo de pacientes.

65

En una realización preferida, dicha medida para el nivel de expresión de CXXC5 se determina mediante la cuantificación de la expresión de ARNm que codifica para una proteína RINF, o una cuantificación de un ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2.

5 En una realización preferida, el nivel de expresión de RINF se determina mediante RT-PCR cuantitativa. La RT-PCR cuantitativa puede usar sondas de hidrólisis que seleccionan como diana SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 para determinar la expresión de CXXC5, y preferiblemente dicha RT-PCR usa cebadores que amplifican los exones 3 y 4, o los exones 1 y 2 de SEQ ID NO 3.

10 Preferiblemente, los cebadores para la detección de SEQ ID NO 1 ó 2 son

5'-tccgctgctctggagaag-3', 5'-cacacgagcagtgacattgc-3' y

15 6-FAM-aacccaaagctgccctctcc-BBQ.

Cebadores para la detección de rpP2 son

5'-atgctgctacgtcgcc-3', 5'-ttaatcaaaaaggccaaatcccat-3' y

20 Cy5-agctgaatggaaaaacattgaagagctc-BBQ.

El nivel de expresión de CXXC5 puede determinarse basándose en la expresión relativa de CXXC5 normalizada con respecto a la expresión del gen rpP2.

25 Preferiblemente, la amplificación por PCR se lleva a cabo mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, y luego las muestras se hacen pasar por 44 ciclos de las siguientes condiciones: desnaturalización durante 10 segundos a 95°C y elongación durante 20 segundos a 55°C.

30 En una realización adicional, el nivel de expresión de CXXC5 se determina de manera inmunoquímica basándose en un anticuerpo. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, y es más preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, dicho anticuerpo interacciona con un epítipo de una proteína o secuencia de proteína de SEQ ID NO 3, y más preferiblemente dicho anticuerpo interacciona con los aminoácidos 45-48 de SEQ ID NO 3.

35 En una realización adicional, la expresión de CXXC5 se mide mediante un alineamiento de ADN o ARN.

Se identifica un método que comprende además una etapa (c);

40 (c) clasificar dicha paciente como perteneciente o bien a un primer grupo o bien a un segundo grupo de pacientes, en el que dicho primer grupo de pacientes que tiene niveles de expresión de CXXC5 menores que el nivel de referencia se clasifica como que tiene una probabilidad aumentada de supervivencia en comparación con dicho segundo grupo de pacientes que tiene niveles de expresión de CXXC5 mayores que el nivel de referencia.

45 Un aspecto adicional se refiere a un método para monitorizar la eficacia de un ciclo de tratamiento para una paciente con cáncer de mama, en el que dicho método comprende:

(a) determinar a nivel de expresión de CXXC5 en una muestra biológica de dicha paciente antes del tratamiento, y

50 (b) determinar el nivel de expresión de CXXC5 en una muestra que contiene células neoplásicas de dicha paciente tras el tratamiento, mediante lo cual la comparación del nivel de expresión de CXXC5 antes del tratamiento con el nivel de expresión de CXXC5 tras el tratamiento indica la eficacia de dicho tratamiento, en el que una disminución en el nivel de expresión de RINF tras el tratamiento indica que el tratamiento es eficaz frente a dicho cáncer de mama.

55 Otro aspecto se refiere a un uso según cualquiera de las reivindicaciones de método, en el que se usa al menos un elemento de detección para CXXC5 en un kit para determinar un pronóstico de supervivencia para una paciente con cáncer de mama.

60 Un aspecto adicional se refiere a un kit para determinar un pronóstico de supervivencia para una paciente con cáncer de mama, caracterizado porque dicho kit comprende compuestos que pueden detectar el nivel de expresión de CXXC5 en una muestra biológica.

A continuación se indican realizaciones preferibles para los aspectos anteriores (independientemente para cada aspecto):

65 - dicha muestra biológica es un tumor, o una biopsia tumoral o muestra que contiene células neoplásicas.

- dicha medida para el nivel de expresión de CXXC5 se determina mediante la cuantificación de la expresión de ARNm que codifica para una proteína CXXC5, o una cuantificación de un ácido nucleico que comprende la secuencia de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, o un fragmento funcional o variante del mismo, o una secuencia de ADN aislada funcionalmente equivalente que puede hibridarse con el mismo.

5 - el nivel de expresión de CXXC5 con relación a dicho nivel de referencia se usa para determinado un ciclo de tratamiento apropiado para dicha paciente.

10 - el nivel de expresión de CXXC5 se determina mediante RT-PCR cuantitativa. Más preferiblemente, dicha RT-PCR cuantitativa usa sondas de hidrólisis que seleccionan como diana SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2 para determinar la expresión de RINF, y más preferiblemente dicha RT-PCR usa cebadores que amplifican los exones 3 y 4, o los exones 1 y 2 de SEQ ID NO 3.

15 - el nivel de expresión de CXXC5 se determina basándose en la expresión relativa de CXXC5 normalizada con respecto a la expresión del gen rpP2.

- los cebadores para la detección de SEQ ID NO 1 ó 2 son

20 5'-tccgctgctctggagaag-3', 5'-cacacgagcagtgacattgc-3' y  
6-FAM-aacccaagctgccctctcc-BBQ.

- los cebadores para la detección de rpP2 son

25 5'-atgcgctacgtcgcc-3', 5'-ttaatcaaaaaggccaaatcccat-3' y  
Cy5-agctgaatggaaaaacattgaagacgtc-BBQ.

30 - la amplificación por PCR se lleva a cabo mediante una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, y luego las muestras se hacen pasar por 44 ciclos de las siguientes condiciones: desnaturalización durante 10 segundos a 95°C y elongación durante 20 segundos a 55°C.

35 - el nivel de expresión de CXXC5 se determina de manera inmunoquímica basándose en un anticuerpo. Dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, y es más preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Preferiblemente, dicho anticuerpo interacciona con un epítipo de una proteína o secuencia de proteína de SEQ ID NO 3, y más preferiblemente dicho anticuerpo interacciona con los aminoácidos 45-48 de SEQ ID NO 3.

- la expresión de CXXC5 se mide mediante un alineamiento de ADN, ARN o proteína.

#### 40 **Definiciones**

Pronóstico es un término médico para describir el desenlace más probable de una enfermedad. En este caso, un buen "pronóstico de supervivencia" se correlaciona con supervivencia en una alta tasa de las pacientes y "mal pronóstico de supervivencia" se correlaciona con supervivencia en una baja tasa del grupo de pacientes.

#### 45 **Sección experimental**

##### Materiales y métodos

#### 50 RT-PCR cuantitativa de RINF (CXXC5)

Se llevó a cabo la síntesis de ADNc de primera hebra (RT) partiendo de ARN total (1 µg) en un volumen de 20 µl usando cebadores de oligo-dT con transcriptasa inversa Transcriptor (Roche, n.º de cat. 05 531 287 001) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron PCR cuantitativas usando sondas de hidrólisis específicas que seleccionan como diana el gen CXXC5 en una máquina Light Cycler 480 (Roche) según las instrucciones del fabricante del kit Lightcycler® 480 ProbesMaster (n.º de cat. 04 707 494 001). Se normalizaron las expresiones relativas de ARNm con respecto a la expresión génica de rpP2 en una reacción de dúplex bicolor. Se diseñaron cebadores para la detección de CXXC5 (5'-tccgctgctctggagaag-3', 5'-cacacgagcagtgacattgc-3' y 6FAM-aacccaagctgccctctcc-BBQ) y rpP2 (5'-atgcgctacgtcgcc-3', 5'-ttaatcaaaaaggccaaatcccat-3' y Cy5-agctgaatggaaaaacattgaagacgtc-BBQ), para usarse en las mismas condiciones de amplificación por PCR en tiempo real. Tras la desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, se hicieron pasar muestras por 44 ciclos de las siguientes condiciones: desnaturalización durante 10 segundos a 95°C y elongación durante 20 segundos a 55°C.

65 Análisis de la expresión de ARNm de CXXC5 en dos conjuntos de datos de microalineamientos y análisis de correlación con el desenlace clínico de pacientes con cáncer de mama.

Se descargaron dos conjuntos de datos de microalineamientos independientes (Affymetrix GeneChip Human Genome HG-U133B), realizados por Pawitan *et al.* (n=159 muestras de pacientes) y Miller *et al.* (n=251 muestras de pacientes), del sitio web de Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con número de registro GSE1456 y GSE3494. Para cada conjunto de datos, se normalizaron todos los datos sin procesar usando RMA con el software Expression Console de Affymetrix. Entonces se calculó la expresión de ARNm de CXXC5 como la intensidad media de los 3 conjuntos de sondas que seleccionan como diana CXXC5 (222996\_s\_at, 224516\_s\_at y 233955\_x\_at). Entonces se agruparon los pacientes en tres grupos según su intensidad media de CXXC5 (expresión alta, intermedia o baja de CXXC5) usando el agrupamiento de K medias (KMC) basándose en la distancia euclídea. Entonces se correlacionaron los grupos de paciente con alto o bajo contenido de ARNm de CXXC5 (RINF) con los desenlaces clínicos referentes a la supervivencia, a lo que se accedió también a través del sitio web de Gene Expression Omnibus. Se realizaron las curvas de Kaplan-Meier (para el análisis de la supervivencia) y la prueba de rangos logarítmicos usando el programa estadístico SPSS 15.0.

#### Detección de RINF por anticuerpo

También puede determinarse la expresión de RINF mediante un enfoque con anticuerpo. Se llevó a cabo la inmunotransferencia de tipo Western tal como se describió previamente por Wu YL, Dudognon C, Nguyen E, *et al.* Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths. *J Cell Sci.* 2006; 119:2797-2806. Se produjo anticuerpo específico de péptido policlonal de conejo personalizado contra RINF por Biogenes GmBH. El péptido inmunogénico corresponde a los aminoácidos 45-58 de la proteína RINF. Se confirmó la especificidad del anticuerpo mediante inhibición competitiva de la señal de la inmunotransferencia de tipo Western mediante la adición del péptido inmunogénico a la disolución de anticuerpo primario. Brevemente, se incubaron inmunotransferencias con anticuerpo primario contra RINF (anticuerpo policlonal), y luego con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa apropiado. Se realizó la detección de la proteína usando un sistema de detección quimioluminiscente (Amersham Pharmacia Biotech).

#### Kit

Para los estudios de expresión del gen/proteína mencionados anteriormente, RINF, puede usarse cualquier método para detectar cuantitativamente el producto amplificado, incluyendo por ejemplo usar cualquier colorantes fluorescentes o sondas marcadas y métodos convencionales.

Normalmente se lleva a cabo la cuantificación de una muestra que contiene un número desconocido de secuencias diana con referencia a una "curva patrón" generada a partir de una serie de amplificaciones de muestras que contienen la secuencia diana en un intervalo de cantidad conocida. Se usa la curva patrón para calcular un número de copias de entrada a partir de la señal generada durante una amplificación. Por tanto, se estima el número de copias desconocido de secuencias diana en la muestra de interés usando la curva patrón calculando el número de copias que se determinó previamente para producir una señal igual a la observada. Entonces se calcula la concentración de la secuencia diana en la muestra a partir del número de copias de entrada y el tamaño de muestra, que se determina antes de la reacción.

Las estimaciones cuantitativas pueden ser sensibles a la variabilidad en o bien el tamaño de muestra de entrada o bien en la eficiencia de la reacción. Puede eliminarse el efecto de la variabilidad entre reacciones del tamaño de muestra de entrada sobre la concentración de RINF calculada usando un gen de control.

Se selecciona un gen de control que proporciona una medida independiente de la cantidad de ARN en la muestra. Se ajusta la concentración calculada del ARNm de RINF basándose en la medida independiente de la muestra.

La variabilidad en la eficiencia de amplificación entre las reacciones usadas para generar la curva patrón y la reacción usada para someter a ensayo la muestra de interés puede afectar a la aplicabilidad de la curva patrón. Llevar a cabo las reacciones usadas para generar la curva patrón de manera simultánea a la reacción usada para someter a ensayo la muestra de interés, usando la misma "mezcla madre" de reactivos de amplificación, y, preferiblemente, en pocillos adyacentes en el mismo ciclador térmico, minimizará la variación en la eficiencia entre reacciones. Alternativamente, puede usarse un patrón térmico para ajustar los resultados para tener en cuenta la variación en la eficiencia de amplificación.

Puede eliminarse el efecto de la variabilidad entre reacciones de la eficiencia de reacción entre las reacciones usadas para generar la curva patrón y la reacción usada para someter a ensayo la muestra de interés usando una muestra de interés y se amplifica con patrón interno. El patrón interno se añade a la reacción en un número de copias conocido y se amplifica conjuntamente junto con la diana de ARNm de RINF. La señal generada a partir de la cantidad conocida del patrón interno proporciona una indicación de la eficiencia de reacción global que puede usarse para ajustar la diferencia de estimación en el número de copias para tener en cuenta la diferencia en las eficiencias de reacción.

El patrón interno es una secuencia de nucleótidos que contiene los mismos sitios de unión a cebador presentes en la diana de manera que se amplifica por el mismo par de cebadores, pero puede distinguirse de la secuencia diana o

bien por su longitud o bien, preferiblemente, por la presencia de una secuencia interna única. El patrón interno se incluye en amplificaciones de número de copias conocido de la muestra de interés y se amplifica con aproximadamente la misma eficiencia que la secuencia diana. Cualquier cambio en la señal generada mediante la amplificación del patrón interno con relación a la señal esperada a partir de la curva patrón refleja un cambio en la eficiencia de reacción global y se usa para ajustar la estimación del número de copias de secuencia diana de manera correspondiente.

Un aspecto se refiere a kits que comprenden componentes útiles para poner en práctica el presente método: un kit útil puede contener cebadores de oligonucleótidos y, opcionalmente, sondas específicas para las regiones diana del ARNm de RINF descrito. Otros componentes opcionales del kit incluyen, por ejemplos, cualquier producto patrón conocido por los científicos expertos en el campo para la amplificación mediante RT-PCR cuantitativa como agentes para catalizar la síntesis de extensión de cebadores (enzimas, tampón), los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), ácidos nucleicos como patrón interno, un ARN de referencia (control positivo), ácido nucleico de control no amplificado (control negativo), tampones apropiados para reacciones de hibridación o PCR e instrucciones para llevar a cabo el presente método.

Otro kit, u otro componente en el mismo kit, puede contener el gen SYBR, cebadores de oligonucleótidos y, opcionalmente, específicos para las regiones diana de RINF. Otros componentes del kit incluyen, nucleótidos trifosfato sustrato, patrón interno, agentes para catalizar la síntesis de extensión de cebadores, control positivo y control negativo.

Los ejemplos de la presente invención presentados en el presente documento se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y no para limitar el alcance de la invención.

## Resultados

A continuación se describirán adicionalmente la invención y los resultados de los experimentos que condujeron a la invención, con referencia a las siguientes figuras:

La figura 1 muestra el análisis de Kaplan-Meier que representa la supervivencia acumulada de pacientes que presentan cáncer de mama (n=159) en el que se clasificó la expresión de ARNm de RINF como alta o baja según el método de agrupamiento de K medias (agrupamiento de K medias de 3 grupos). Se extrajeron todos los datos de expresión genómica y supervivencia del estudio de Pawitan *et al.* a partir de conjuntos de datos de microalineamientos públicos (HG-U133B de Affymetrix), y son accesibles en línea en el sitio web de Gene Expression Omnibus usando el número de registro GSE1456. Luego se correlacionó la intensidad media de los 3 conjuntos de sondas que seleccionan como diana la expresión de ARNm de CXXC5 con los desenlaces de supervivencia. El análisis de supervivencia muestra que una alta expresión de ARNm de RINF se asoció con una peor supervivencia.

La figura 2 muestra el análisis de Kaplan-Meier que representa la supervivencia acumulada de pacientes que presentan cáncer de mama (n=251) en el que se clasificó la expresión de ARNm de RINF como alta o baja según el método de agrupamiento de K medias (agrupamiento de K medias de 3 grupos). Se extrajeron todos los datos de expresión genómica y supervivencia del estudio de Miller *et al.* a partir de conjuntos de datos de microalineamientos públicos (HG-U133B de Affymetrix), y son accesibles en línea en el sitio web de Gene Expression Omnibus usando el número de registro GSE3494. Luego se correlacionó la intensidad media de los 3 conjuntos de sondas que seleccionan como diana la expresión de ARNm de CXXC5 con los desenlaces de supervivencia. El análisis de supervivencia muestra que una alta expresión de ARNm de RINF se asoció con una peor supervivencia.

## Resultados experimentales

Los inventores han encontrado ahora que existe una correlación entre el nivel relativo de expresión de RINF y el pronóstico de supervivencia. Se muestran estos resultados en las figuras 1 y 2.

La cuantificación del nivel relativo de ARNm de RINF en tumores de pacientes con cáncer de mama puede ayudar a los médicos a determinar si un tumor tiene o no buen o mal pronóstico, así como si es probable que sea satisfactorio un determinado tratamiento.

Estos resultados demuestran que la cuantificación de la expresión de ARNm de RINF podría ser un factor pronóstico significativo de la supervivencia de pacientes y la progresión de cáncer.

En efecto, extrayendo los datos de expresión de ARNm de CXXC5 de dos estudios de microalineamientos independiente disponibles en bases de datos públicas, y tratando de correlacionarlos con el desenlace clínico, se ha sometido a prueba y se ha demostrado por primera vez una fuerte correlación entre una alta expresión de ARNm de RINF y una baja tasa de supervivencia para pacientes que presentan cáncer de mama.

Según el conocimiento de los inventores, ningún estudio previo ha examinado la relación entre la expresión de

5 ARNm de RINF y el pronóstico de un paciente en su cáncer. Se sometió a prueba esta idea inventiva porque los inventores fueron los primeros en observar que este gen estaba desregulado en tipos de células cancerosas. Sin embargo, y de manera importante, estos resultados no eran obvios porque muchos genes que se mostró que estaban desregulados en el cáncer no tienen ningún valor predictivo hacia la supervivencia de un paciente o la respuesta a terapia. Esto es un área de investigación importante en el cáncer porque hay pocos datos para ayudar a los médicos a elegir qué tratamiento es el mejor para esos pacientes o para determinar cuando está justificado un cambio de tratamiento.

10 Puede medirse el nivel de ARNm de RINF en el tumor, o biopsia tumoral, extraído en el momento de la cirugía usando el kit y los métodos según la presente invención.

15 Potencialmente, esta herramienta podría ser útil en la clínica para que médicos clínicos tomen decisiones sobre si un tratamiento es útil. El objetivo final es continuar con un tratamiento eficaz, pero ahorrarles a los pacientes los efectos secundarios de un tratamiento que está condenado al fracaso.

20 También se observó que la sobreexpresión de RINF no está relacionada significativamente con una peor tasa de supervivencia en melanoma, así que esto no es una correlación que pueda esperarse a partir de simplemente un nivel desregulado de RINF. Además, la sobreexpresión de CXXC5 en tumor maligno puede parecer algo contradictorio con lo que se encontró previamente en AML, en la que la expresión reducida está relacionada con el fenotipo maligno.

25 Conjuntamente, la idea de que la expresión de ARNm de RINF es un factor pronóstico es completamente novedosa y no obvia y no se ha mostrado ni descrito nunca previamente.

25 Organización solicitante

Calle:

30 Ciudad:

Estado:

País:

35 Código postal:

Número de teléfono:

40 Número de fax:

Dirección de correo electrónico:

<110> Nombre de la organización: AS Bergen Teknologioverføring AS

45 Proyecto de solicitud

<120> Título: Métodos para pronóstico de supervivencia de cáncer de mama

<130> Referencia de expediente de sol.: P11828PC01/P12129NO00

<140> Número de sol. actual:

50 <141> Fecha de presentación actual: \_\_-\_\_-\_\_

Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*

55 <400> Cadena de secuencia pre.:

gttttgcccgg	cagcccccg	gcagcgttca	tagctcctgc	ccgggcgggc	gcgcggcggc	60
ggcggcagag	gcggctgagc	ctgagcgggg	atgtagaggc	ggcggcagca	gaggcggcac	120
tggcggcaag	agcagacgcc	cgagccgagc	gagaagagcg	gcagagcctt	atccccctgaa	180
gccgggcccc	gcgtcccagc	cctgcccagc	ccgcgcccag	ccatgcgcgc	cgctgtctga	240
gtccgggccc	cgcacgctga	gccctccgcc	cgcgagccgc	gctcagctcg	ggggtgatta	300
gttgcttttt	gttgcttttt	aatttgggcc	gcggggaggg	ggaggagggg	cagggtgctgc	360
aggctcccc	ccctccccgc	ctcgggcccag	ccgcggcggc	gcgactcggg	ctccggacc	420
gggactgct	ggcggctgga	gcggagcgca	ccgcggcggg	ggtgcccaga	gcggagcgca	480
gctcccctgcc	ccgccccctc	ccctcggcct	cgcggcgagc	gcggcggtgg	cggttggac	540
gactcggaga	gccggttcgg	tgcgcgggccg	gggcccggagt	tcgctgcaag	tcggcggaaa	600
gtttggtctgc	gcgggttccc	ccgaagtcca	gagtgaagac	atttccacct	ggacacctga	660
ccatgtgcct	gccctgagca	gcgaggccca	ccaggcatct	ctggtgtggg	cagcagggcc	720
aggctcctggt	ctgtggacc	tcggcagttg	gcaggctccc	tctgcagtgg	ggtctgggccc	780
tcggccccac	catgtcgagc	ctcggcggtg	gctcccagga	tgccggcggc	agtagcagca	840
gcagcaccaa	tggcagcggg	ggcagtggca	gcagtggccc	aaaggcagga	gcagcagaca	900
agagtgcagt	ggtggctgcc	gccgcaccag	cctcagtggc	agatgacaca	ccaccccccg	960
agcgtcggaa	caagagcggg	atcatcagtg	agccccctcaa	caagagcctg	cgccgctccc	1020
gcccgcctctc	ccactactct	tcttttgga	gcagtgggtg	tagtggcggg	ggcagcatga	1080
tgggcggaga	gtctgctgac	aaggccactg	cggtcgcagc	cgctgcctcc	ctgttggcca	1140
atgggcatga	cctggcggcg	gcatggcg	tggacaaaag	caaccctacc	tcaaagcaca	1200
aaagtgggtgc	tgtggccagc	ctgctgagca	aggcagagcg	ggccacggag	ctggcagccc	1260
agggacagct	gacgtcgcag	cagtttgccg	agtccacaga	gatgctgaag	cgcggtggtgc	1320
aggagcatct	cccgtgatg	agcgaggcgg	gtgctggcct	gcctgacatg	gaggctgtgg	1380
cagggtgccga	agccctcaat	ggccagtccg	acttccccta	cctgggcgct	ttccccatca	1440
accaggcct	cttcattatg	acccggcag	gtgtgttctt	ggccgagagc	gcgctgcaca	1500
tggcgggccc	ggctgagtac	ccatgacagg	gagagctggc	ctctgccatc	agctccggca	1560
agaagaagcg	gaaacgctgc	ggcatgtgcg	cgccctgccc	gcggcgcac	aactgcgagc	1620
agtgacagag	ttgtaggaat	cgaaagactg	gccatcagat	ttgcaaattc	agaaaatgtg	1680
aggaactcaa	aaagaagcct	tccgctgctc	tggagaaggt	gatgcttccg	acgggagccg	1740
ccttccggtg	gtttcagtga	cgccggcggg	acccaaagct	gccctctccg	tgcaatgtca	1800
ctgctcgtgt	ggtctccagc	aagggttccg	ggcgaagaca	aacggatgca	cccgtcttta	1860
gaacaaaaaa	tattctctca	cagatttcat	tcctgttttt	atataatata	tttttgttgt	1920
cgtttaaca	tctccacgct	cctagcataa	aaagaaaaag	aaaaaaattt	aaactgcttt	1980
ttcggaaagaa	caacaacaaa	aaagaggtaa	agacgaatct	ataaagtacc	gagacttccc	2040
gggcaaagaa	tggacaatca	gtttccttcc	tgtgtcgatg	tcgatgttgt	ctgtgcagga	2100
gatgcagttt	ttgtgtagag	aatgtaaatt	ttctgtaacc	ttttgaaatc	tagttactaa	2160
taagcactac	tgtaatttag	cacagtttaa	ctccaccctc	atttaaactt	cctttgattc	2220
tttccgacca	tgaaatagtg	catagtttgc	ctggagaatc	cactcacggt	cataaagaga	2280
atgttgatgg	cgccgtgtag	aagccgctct	gtatccatcc	acgcgtgcag	agctgccagc	2340
agggagctca	cagaagggga	gggagcacca	ggccagctga	gctgcacca	cagttcccag	2400
actgggatcc	cccaccccaa	cagtgatttt	ggaaaaaaaa	atgaaagtcc	tgttcgttta	2460
tccattgcga	tctggggagc	cccattctcga	tatttccaat	cctggctact	tttcttagag	2520
aaaataagtc	ctttttttct	ggccttgcta	atggcaacag	aagaaagggc	ttctttgcgt	2580
ggtcccctgc	tggtgggggt	gggtccccag	ggggccccct	gcggcctggg	ccccctgcc	2640
cacggccagc	ttcctgctga	tgaacatgct	gtttgtattg	ttttaggaaa	ccaggctggt	2700
<b>ttgtgaataa</b>	<b>aacgaatgca</b>	<b>tgtttgtgtc</b>	<b>acgaaaaaaa</b>	<b>aaaaaaaaaa</b>	<b>aaaaaaaaaa</b>	<b>2760</b>
<b>aaaaaaaaaa</b>	<b>aaaaaaaaaa</b>					<b>2778</b>

5 <212> Tipo: ADN  
 <211> Longitud: 2778

Nombre de secuencia: rinf1  
 Descripción de secuencia:

10 Secuencia

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*  
 <400> Cadena de secuencia pre.:

15

atgtcgcgacc	tcggcgggtgg	ctcccaggat	gccggcggca	gtagcagcag	cagcaccaat	60
ggcagcggtg	gcagtggcag	cagtggccca	aaggcaggag	cagcagacaa	gagtgcagtg	120
gtggctgccg	ccgcaccagc	ctcagtggca	gatgacacac	cacccccca	gcgtcggaac	180
aagagcggta	tcatcagtga	gcccctcaac	aagagcctgc	gccgctccc	cccgtctctc	240
cactactctt	cttttggcag	cagtgggtgt	agtggcggtg	gcagcatgat	gggcggagag	300
tctgctgaca	aggccactgc	ggctgcagcc	gctgcctccc	tgttggccaa	tgggcatgac	360
ctggcggcgg	ccatggcggg	ggacaaaagc	aaccctacct	caaagcacia	aagtgggtgct	420
gtggccagcc	tgctgagcaa	ggcagagcgg	gccacggagc	tggcagccga	gggacagctg	480
acgctgcagc	agtttgcgca	gtccacagag	atgctgaagc	gcgtgggtgca	ggagcatctc	540
ccgctgatga	gcgaggcggg	tgctggcctg	cctgacatgg	aggctgtggc	aggtgccgaa	600
gccctcaatg	gccagctcca	cttcccctac	ctgggcgctt	tccccatcaa	cccaggcctc	660
ttcattatga	ccccggcagg	tgtgttcctg	gccgagagcg	cgctgcacat	ggcgggcctg	720
gctgagtacc	ccatgcaggg	agagctggcc	tctgccatca	gctccggcaa	gaagaagcgg	780
aaacgctgcg	gcatgtgcgc	gccctgccgg	cggcgcacat	actgcgagca	gtgcagcagt	840
tgtaggaatc	gaaagactgg	ccatcagatt	tgcaaatcca	gaaaatgtga	ggaactcaaa	900
aagaagcctt	ccgctgctct	ggagaagggtg	atgcttccga	cgggagccgc	cttccggtgg	960
tttcagtga						969

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 969

5

Nombre de secuencia: rinf2  
Descripción de secuencia:

Secuencia

10

<213> Nombre de organismo: *Homo sapiens*  
<400> Cadena de secuencia pre.:

MSSLGGGSQD	AGSSSSSTN	GSFGSSSGP	KAGAADKSAV	VAAAAPASVA	DDTPPPERRN	60
KSGIISEPLN	KSLRRSRPLS	HYSSFGSSGG	SGGSSMMGGE	SADKATAAAA	AASLLANGHD	120
LAAAMAVDKS	NPTSKHKSGA	VASLLSKAER	ATELAAEQQL	TLQQFAQSTE	MLKRVVQEHL	180
PLMSEAGAGL	PDMEAVAGAE	ALNGQSDFPY	LGAFPINPGL	FIMTPAGVFL	AESALHMAGL	240
AEYPMQGELA	SAISSGKKKR	KRCGMCAPCR	RRINCEQCSS	CRNRKTGHQI	CKFRKCEELK	300
KKPSAALEKV	MLPTGAARW	FQ				322

15

<212> Tipo: PRT  
<211> Longitud: 322

20

Nombre de secuencia: RINF  
Descripción de secuencia:

Secuencia

25

<213> Nombre de organismo: Secuencia artificial  
<400> Cadena de secuencia pre.:

tccgctgctc tggagaag 18

30

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 18

Nombre de secuencia: Cebador 1 para la detección de cxxc5  
Descripción de secuencia:

35

Secuencia

<213> Nombre de organismo: Secuencia artificial  
<400> Cadena de secuencia pre.:

40

cacacgagca gtgacattgc 20

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 20

45

Nombre de secuencia: Cebador 2 para la detección de cxxc5

Descripción de secuencia:

Secuencia

5 <213> Nombre de organismo: Secuencia artificial  
<400> Cadena de secuencia pre.:

atgcgctacg tcgcc 15

10 <212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 15

Nombre de secuencia: Cebador 1 para la detección de rpP2  
Descripción de secuencia:

15

Secuencia

<213> Nombre de organismo: Secuencia artificial  
<400> Cadena de secuencia pre.:

20

ttaatcaaaa aggccaaatc ccat 24

<212> Tipo: ADN  
<211> Longitud: 24

25

Nombre de secuencia: Cebador 2 para la detección de rpP2  
Descripción de secuencia:

Secuencia

30

<213> Nombre de organismo: Secuencia artificial  
<400> Cadena de secuencia pre.:

aaccCAAagc tgcctctcc 20

35

<212> Tipo: ADN/ARN  
<211> Longitud: 20

Nombre de secuencia: Cebador 3 para la detección de cxxc5  
Descripción de secuencia:

40

Secuencia

<213> Nombre de organismo: Secuencia artificial  
<400> Cadena de secuencia pre.:

45

agctgaatg aaaaacatt gaagacgtc 29

50

<212> Tipo: ADN/ARN  
<211> Longitud: 29

Nombre de secuencia: cebador 3 para la detección de rpP2  
Descripción de secuencia:

55

**REIVINDICACIONES**

- 5
1. Método *in vitro* para determinar un pronóstico de supervivencia para una paciente con cáncer de mama, caracterizado porque dicho método comprende:
- (a) determinar una medida para el nivel de expresión de CXXC5 en un tumor o una biopsia tumoral o muestra que contiene células neoplásicas de dicha paciente,
- 10
- (b) clasificar dicha paciente como perteneciente o bien a un primer grupo o bien a un segundo grupo de pacientes, en el que dicho primer grupo de pacientes tiene niveles de expresión de CXXC5 menores que dicho segundo grupo de pacientes, y en el que el primer grupo de pacientes se clasifica como que tiene una probabilidad aumentada de supervivencia en comparación con dicho segundo grupo de pacientes.
- 15
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha medida para el nivel de expresión de CXXC5 se determina mediante la cuantificación de la expresión de ARNm que codifica para una proteína CXXC5.
3. Método según la reivindicación 2, en el que dicha medida para el nivel de expresión de CXXC5 se determina mediante la cuantificación de ARNm que comprende la secuencia de SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2.
- 20
4. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de CXXC5 se determina mediante RT-PCR cuantitativa.
- 25
5. Método según la reivindicación 4, en el que dicha RT-PCR usa cebadores que amplifican los exones 3 y 4, o los exones 1 y 2 de SEQ ID NO 3.
6. Método según la reivindicación 1, en el que el nivel de expresión de CXXC5 se determina de manera inmunoquímica mediante un anticuerpo.
- 30
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la expresión de CXXC5 se mide mediante un alineamiento de ADN o ARN.

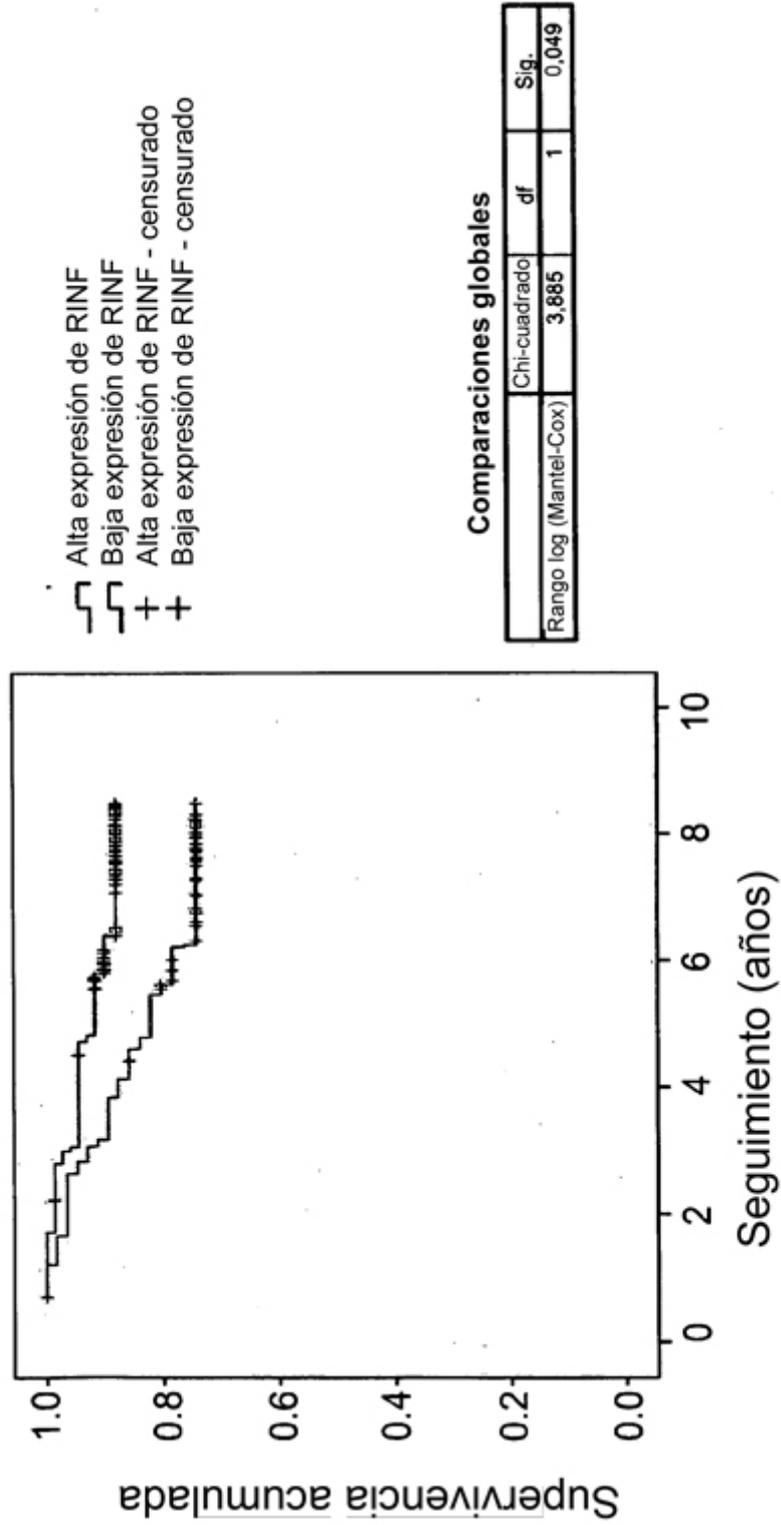


Figura 1

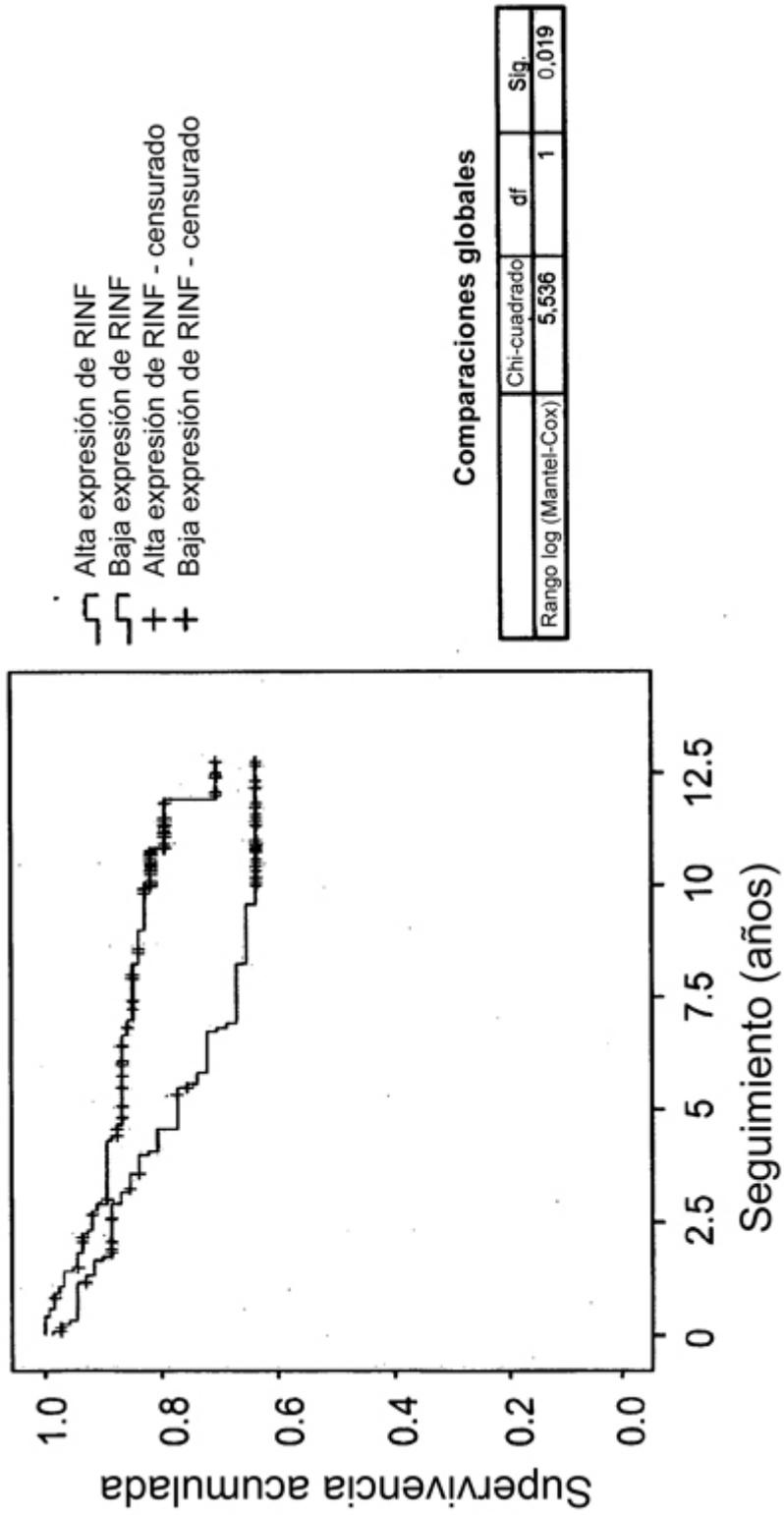


Figura 2