

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 261**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2009 PCT/US2009/056240**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2010 WO10028373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2009 E 09812382 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2331711**

54 Título: **Procedimientos de diagnóstico de cáncer y de determinación de la supervivencia global y la supervivencia sin enfermedad de pacientes con cáncer**

30 Prioridad:

05.09.2008 US 94726 P
12.12.2008 US 122130 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.07.2017

73 Titular/es:

A & G PHARMACEUTICAL, INC. (100.0%)
9130 Red Branch Road
Columbia, MD 21045, US

72 Inventor/es:

SERRERO, GINETTE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 624 261 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

Procedimientos de diagnóstico de cáncer y de determinación de la supervivencia global y la supervivencia sin enfermedad de pacientes con cáncer

Antecedentes de la invención

5 Campo de la invención

La solicitud se refiere de manera general a procedimientos de diagnóstico y control, y a ensayos para el cáncer y kits que pueden usarse en tales procedimientos. Más en particular, la solicitud se refiere al uso de la expresión de GP88 para predecir la probabilidad de metástasis, la duración de la supervivencia sin enfermedad y la duración de la supervivencia global de los pacientes de cáncer y el resultado de las terapias contra el cáncer.

10 La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

Técnica relacionada

15 El cáncer de mama es la forma principal de cáncer en las mujeres y la segunda causa principal después del cáncer de pulmón de las muertes por cáncer en los Estados Unidos. En el mundo industrializado, aproximadamente una mujer de cada nueve puede esperar desarrollar cáncer de mama en su vida. En los Estados Unidos, la incidencia anual de cáncer de mama es de aproximadamente 180.000 nuevos casos y aproximadamente 48.000 muertes cada año (Parkin 1998; Apantaku 2000). Aproximadamente dos millones de mujeres que viven solo en Estados Unidos se han diagnosticado de cáncer de mama en algún momento de sus vidas. A pesar de las continuas mejoras en la comprensión de la enfermedad, el cáncer de mama ha permanecido en gran medida resistente a la intervención médica. La mayoría de las iniciativas clínicas se centran en el diagnóstico precoz, seguido de formas las convencionales de intervención, en particular, la cirugía, la radiación, la supresión hormonal, y la quimioterapia. Tales intervenciones tienen un éxito limitado, particularmente en pacientes en los que el tumor ha experimentado metástasis. Existe la apremiante necesidad de mejorar el arsenal de herramientas de diagnóstico y los procedimientos disponibles para proporcionar información más precisa y más eficaz que permita un tratamiento satisfactorio de la manera menos invasiva posible. Específicamente, los marcadores que pueden identificar 20 pacientes con muy bajo riesgo de reaparición de la enfermedad, metástasis, y muerte tras la cirugía inicial, reducirían la extensión del exceso de tratamiento con regímenes complementarios caros y potencialmente tóxicos. La presente solicitud satisface esa necesidad proporcionando nuevos procedimientos y marcadores para controlar el cáncer de mama.

25 Entre el amplio grupo de pacientes de cáncer de mama con tumores localizados y sin metástasis detectable en los ganglios linfáticos próximos, muchos se curarán mediante cirugía debido a que los tumores no han metastatizado en los tejidos circundantes y en los ganglios linfáticos. Sin embargo, otros tienen una enfermedad metastásica oculta y podrían beneficiarse de la radiación complementaria o de una terapia antihormonal adyuvante o quimioterapia. Existe una necesidad de marcadores de diagnóstico para discriminar entre tumores con bajo riesgo de metástasis metastásica y aquellos con un riesgo más alto. Los marcadores tumorales que denotan un bajo riesgo de enfermedad metastásica pueden afectar de forma directa a la decisión terapéutica sobre usar la radioterapia complementaria, o la terapia hormonal adyuvante o quimioterapia. Además, tales marcadores tumorales también pueden afectar la recomendación del cirujano sobre si elegir una cirugía conservadora de mama o una mastectomía.

Diagnóstico del cáncer de mama

30 El diagnóstico definitivo de todos los tipos de enfermedad de mama es a base de una evaluación histológica de muestras de tejido usando el microscopio óptico. Los criterios histológicos usados para definir la mayoría de las lesiones de mama son tradicionales pero, sin embargo, son bastante reproducibles para la identificación de cánceres de mama totalmente invasivos. Los logros recientes incluyen la identificación de un pequeño número de biomarcadores basados en tejidos que son útiles para predecir el resultado clínico y la respuesta a la terapia (por ejemplo, fracción de fase S, receptores de estrógeno y progesterona, c- erbB-2) y el descubrimiento de genes (BRCA-1 y BRC A-2) asociados con el riesgo familiar de cánceres de mama (Dahiya y Deng, 1998; Fitzgibbons, Page y col. 2000).

35 La base molecular del cáncer aún se está determinando. En el cáncer de mama, los receptores para estrógeno y progesterona se relacionan con el estado de diferenciación de las células del epitelio mamario y, en determinados casos, tienen un valor pronóstico para el resultado de la enfermedad. Se sabe que el estrógeno es un estimulador principal para el crecimiento de células de cáncer de mama humano positivas para receptores de estrógeno (RE) *in vivo* e *in vitro*. Aunque para el establecimiento y proliferación de tumores de mama inicialmente se requiere estrógeno, el desarrollo de tumores independientes de estrógeno durante el transcurso del cáncer de mama es indicativo de un mal pronóstico. Se ha postulado que el efecto mitogénico del estrógeno en el cáncer de mama está mediado, al menos en parte, por factores de crecimiento, incluyendo factores de crecimiento regulados por estrógeno. Así pues, la identificación y caracterización de genes sensibles a estrógenos, en particular, de genes que codifican factores de crecimiento, contribuye a la comprensión de los efectos del estrógeno en células de cáncer de mama.

Sin embargo, el diagnóstico del cáncer de mama aún requiere algún tipo de procedimiento de biopsia. Además, los procedimientos de diagnóstico y pronóstico actuales no pueden distinguir de forma absoluta los cánceres de mama que se pueden tratar solo mediante cirugía de aquellos es probable que reaparezcan o que ya tienen metástasis debido al proceso de metástasis. Como resultado, al menos el 50 por ciento de los pacientes con cáncer de mama se tratan con alguna forma de terapia adyuvante. Además, los procedimientos disponibles son inadecuados para predecir la respuesta de los cánceres de mama a tipos específicos de terapias adyuvantes.

Las decisiones sobre el tratamiento para los individuos aquejados de cáncer de mama se basan con frecuencia en el número de ganglios linfáticos axilares implicados en la enfermedad, el estado del receptor de estrógeno y del receptor de progesterona (RP), el tamaño del tumor primario y la fase de la enfermedad en el momento del diagnóstico (Tandon, Clark y col. 1989). Sin embargo, incluso con esta diversidad de factores, actualmente no es posible predecir de manera precisa el transcurso de la enfermedad. Existe claramente una necesidad de identificar nuevos marcadores para separar pacientes con buen pronóstico, quienes podrían no necesitar una terapia complementaria más allá de la extracción quirúrgica del tumor de mama maligno, de aquellos cuyo cáncer es más probable que reaparezca y que podrían beneficiarse de formas de tratamiento adicionales y más exhaustivas.

Sigue habiendo deficiencias en la técnica con respecto a la identificación de marcadores vinculados a la progresión del cáncer de mama, al desarrollo de procedimientos de diagnóstico para controlar la progresión de la enfermedad y al desarrollo de procedimientos y composiciones terapéuticos para tratar las enfermedades y cánceres de mama. La identificación de marcadores que se expresan o activan de forma diferencial en el cáncer de mama sería de una importancia considerable en el desarrollo de un procedimiento rápido y económico para mejorar el diagnóstico del cáncer de mama, y para predecir el comportamiento del tumor con respecto al pronóstico del paciente y la sensibilidad a opciones terapéuticas individuales.

GP88

La glucoproteína de 88 kDa factor de crecimiento derivado de células PC de (PCDGF, sigla del inglés *PC cell-derived growth factor*) es un factor de crecimiento autocrino, aislado en primer lugar de las células PC de teratoma de ratón altamente tumorigénicas. En la técnica, el PCDGF también se conoce como GP88, precursor de granulina-epitelina (GEP, sigla del inglés *granulin-epithelin precursor*), precursor de la granulina, progranulina, precursor de la epitelina, proepitelina (PEPI) y acrogranina (denominado en lo sucesivo como GP88), es el miembro más grande de la familia de la granulina/epitelina de los moduladores de crecimiento de polipéptidos ricos en cisteína. Se ha descrito que GP88 estimula la proliferación y supervivencia de varios tipos celulares de origen mesenquimatoso y epitelial mediante la estimulación de las rutas de la MAP quinasa, la PI-3 quinasa y la FAK quinasa. De forma interesante, la expresión aumentada de GP88 se encontró en varias líneas celulares de cáncer y/o tejidos tumorales que incluyen el cáncer de mama, cáncer de ovario, carcinoma de células renales, mieloma múltiple y glioblastoma.

En células de cáncer de mama, se ha demostrado que GP88 desempeña un papel crítico en la tumorigénesis. La expresión aumentada de GP88 se correlaciona de forma positiva con la adquisición de un crecimiento independiente de estrógenos, resistencia al tamoxifeno y tumorigenicidad. La inhibición de la expresión de GP88 mediante la transfección de ADNc antisentido en células MDA-MB-468 dio como resultado una inhibición completa del crecimiento tumoral en ratones desnudos. Además, se ha demostrado que GP88 previene el efecto apoptótico del tamoxifeno en células de cáncer de mama positivas para el receptor de estrógeno. Los estudios patológicos en biopsias de carcinoma de mama revelaron que GP88 se expresaba en el 80 % de los carcinomas ductales invasivos en correlación con marcadores de mal pronóstico tales como la clasificación del tumor, la expresión de p53 y el índice Ki67, mientras que las lesiones benignas eran principalmente negativas. Además, los estudios patológicos en tumores de ovario indicaron que GP88 se expresaba de forma elevada en tumores de ovario epiteliales invasivos, cuando se comparaban con tumores con bajo potencial maligno. Estos estudios demuestran que GP88 desempeña un papel en la invasión además de estimular la proliferación de células tumorales.

Las granulinas/epitelinas ("grn/epi") son polipéptidos de 6 kDa y pertenecen a una nueva familia de polipéptidos ricos en cisteínas dobles. La patente de Estados Unidos n.º 5.416.192 (Shoyab y col.) se dirige a las epitelinas de 6 kDa, en particular, la epitelina 1 y la epitelina 2. De acuerdo con Shoyab, ambas epitelinas están codificadas por un precursor común de 63,5 kDa, que se procesa en formas más pequeñas tan pronto como se sintetiza, de manera que los únicos productos naturales que se hallan en las muestras biológicas son las formas de 6 kDa. GP88 es el precursor de la epitelina, y Shoyab y col. explican que GP88 es biológicamente inactivo.

Al contrario de las enseñanzas de Shoyab y col., el laboratorio de los presentes inventores ha demostrado que el precursor no siempre se procesa tan pronto como se sintetiza. Los estudios han demostrado que el precursor (es decir, GP88) se secreta, de hecho, como una glucoproteína de 88 kDa con un resto de carbohidrato de 20 kDa unido en N. El análisis de la secuencia N-terminal de GP88 indica que GP88 comienza en el aminoácido 17 del precursor grn/epi, lo que demuestra que los primeros 17 aminoácidos de la secuencia de la proteína, deducida a partir del ADNc precursor, se corresponden con un péptido señal compatible con el direccionamiento para la localización en la membrana o para la secreción. Al contrario de las enseñanzas de Shoyab y col., GP88 es biológicamente activo y tiene una actividad promotora del crecimiento, en particular como un factor de crecimiento autocrino para las células productoras.

Sigue existiendo una necesidad en la técnica de marcadores vinculados a la progresión de los cánceres (por ejemplo, cánceres de mama y de pulmón) y de procedimientos de diagnóstico para predecir la progresión de la enfermedad a base de tales marcadores. Estas necesidades y otras se satisfacen mediante la presente solicitud.

Sumario de la invención

5 La invención es tal como se expone en las reivindicaciones.

Los inventores han descubierto que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una probabilidad de metástasis aumentada, una supervivencia global disminuida y una supervivencia sin enfermedad disminuida, de pacientes aquejados de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama y de pulmón). Esta asociación fue particularmente fuerte para los cánceres de mama negativos para receptores de estrógeno (RE-), positivos para receptores de estrógeno y negativos para ganglios linfáticos (RE+/GL-), y positivos para receptores de estrógeno y positivos para ganglios linfáticos (RE+/GL+). Tal asociación no se conocía antes del descubrimiento de los inventores. Los inventores demuestran que la presencia de la expresión elevada de GP88 en cáncer de mama humano (en particular, un carcinoma ductal invasivo) se asocia con una alta probabilidad aumentada de metástasis, una supervivencia sin enfermedad y global disminuida, y, por lo tanto, que la expresión de GP88 es un marcador nuevo y novedoso de pronóstico de la progresión del cáncer de mama. Los niveles elevados de la expresión de GP88 en el(los) tumor(es) primario(s) de las pacientes es un fuerte factor pronóstico positivo.

Los inventores demuestran que la presencia de una expresión elevada de GP88 en cáncer de pulmón humano (en particular, en el carcinoma de pulmón no microcítico(CPNMNSCLC)), se asocia con una probabilidad aumentada de metástasis, una supervivencia sin enfermedad y global disminuida, y, por lo tanto, la expresión de GP88 es un marcador nuevo y novedoso de pronóstico de la progresión del cáncer de pulmón. Los niveles elevados de la expresión de GP88 en el(los) tumor(es) primario(s) de las pacientes es un fuerte factor pronóstico positivo.

Los niveles de expresión de GP88 se pueden analizar usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, con anticuerpos u otras composiciones que tengan la capacidad de unirse a GP88 (por ejemplo, ligandos, etc.). Así pues, el análisis de la expresión de GP88 añade un nuevo nivel de información a los marcadores actuales de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama y de pulmón) y es un marcador molecular/bioquímico de pronóstico fiable para el cáncer en muestras de pacientes aquejados de cáncer. De forma adicional, el control de los niveles de expresión de GP88 es predictivo del resultado de las estrategias terapéuticas eficaces para pacientes con cáncer de mama.

En conformidad con la presente divulgación, se proporcionan procedimientos para el pronóstico de la duración de la supervivencia sin enfermedad o global en un paciente que padece cáncer. En un aspecto de la divulgación, se ha descubierto que los elevados niveles de expresión de GP88 muestran una correlación inesperada y sorprendentemente elevada con la duración disminuida de la supervivencia sin enfermedad y/o global.

Así pues, la presente divulgación proporciona de forma ventajosa un avance significativo en el tratamiento del cáncer debido a que la temprana identificación de pacientes en riesgo de reaparición de tumor o de metástasis permitirá un tratamiento agresivo temprano, con un potencial de supervivencia significativamente potenciado.

Como alternativa, la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir la duración de la supervivencia sin enfermedad y global; predecir la supervivencia sin progresión, predecir la supervivencia sin episodios, predecir el riesgo de una supervivencia sin enfermedad o global disminuida, predecir la probabilidad de recuperación de un paciente que padece cáncer; predecir la probabilidad de reaparición del cáncer y/o de metástasis en un individuo que tiene un tumor canceroso; predecir el riesgo de reaparición del cáncer, procedimientos para explorar a un paciente que padece cáncer, para determinar el riesgo de metástasis tumoral; procedimientos para determinar el curso adecuado de un tratamiento para un paciente que padece cáncer; procedimientos para controlar la eficacia de un curso de tratamiento para un paciente que padece cáncer y kits para su uso en la práctica de los procedimientos desvelados.

45 La invención proporciona procedimientos para controlar la eficacia de un curso de tratamiento tal como se expone en las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra las curvas de Kaplan-Meier que se generaron para los pacientes RE- tras una clasificación de pronóstico basada en la tinción con anticuerpo anti-GP88.

50 La Fig. 2 muestra las curvas de Kaplan-Meier que se generaron para los pacientes RE+/GL- tras una clasificación de pronóstico de la supervivencia sin enfermedad basada en la tinción con anticuerpo anti-GP88.

La FIG. 3 muestra las curvas de Kaplan-Meier que se generaron para los pacientes RE+/GL- tras una clasificación de pronóstico de la supervivencia global basada en la tinción con anticuerpo anti-GP88.

La Fig. 4 muestra las curvas de Kaplan-Meier que se generaron para los pacientes RE+/GL+ tras una

clasificación de pronóstico de la supervivencia sin enfermedad basada en la tinción con anticuerpo anti-GP88.

La FIG. 5 muestra las curvas de Kaplan-Meier que se generaron para los pacientes RE+/GL+ tras una clasificación de pronóstico de la supervivencia global basada en la tinción con anticuerpo anti-GP88.

5 La FIG. 6 muestra la detección inmunohistoquímica de diversos niveles de expresión de GP88 en tejido normal y de cáncer de mama usando un anticuerpo anti-GP88.

La FIG. 7 es un gráfico que muestra la densidad óptica (eje y) de muestras que contienen cantidades conocidas de GP88 (eje x). El gráfico puede usarse como una referencia para determinar la concentración de GP88 en una muestra de fluido biológico tal como suero sanguíneo.

10 La FIG. 8 muestra el nivel en circulación de GP88 para pacientes de cáncer de mama (Ptes. de CM) que no tienen evidencia de enfermedad y que tienen enfermedad progresiva.

La FIG. 9 muestra el nivel de GP88 para pacientes de cáncer de mama con enfermedad de fase temprana (fase 2) que no tienen evidencia de enfermedad.

La FIG. 10 muestra el nivel de GP88 cuando los pacientes que tienen una enfermedad de fase temprana recaen hasta la fase 4 (enfermedad metastásica).

15 La FIG. 11 muestra que el mantenimiento de un nivel de GP88 elevado durante varias semanas conduce a una disminución de la supervivencia de (A) el paciente 1 y (B) el paciente 2.

Las FIG. 12A-C muestran la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos deducida de GP88 de ratón.

La Figura 13A muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc de GP88 humana.

La Figura 13B muestra la secuencia de aminoácidos de GP88 humana.

20 La Figura 14 muestra las puntuaciones de la tinción de GP88 en tejido incluido en parafina, fijado con formalina (IPFF) de biopsia de cáncer de pulmón no microcítico, ajustadas para la supervivencia sin enfermedad (SSE), lo que revela que la expresión de GP88 aumentada se correlaciona con una SSE disminuida. El análisis por Biostat mostró una fuerte relación entre GP88 y la recidiva ($p=0,0091$).

25 La FIG. 15 muestra las puntuaciones de la tinción de GP88 en tejido IPFF de biopsia de CPNM de Fase1 y Fase 2, ajustadas para la supervivencia global (SG). El análisis por Biostat reveló una fuerte relación entre GP88 y la muerte ($p=0,0038$). Cada unidad de aumento de GP88 se asocia con un aumento del riesgo de muerte del 65 % al 83 %.

Descripción detallada de la invención

30 En conformidad con la presente divulgación, se proporcionan procedimientos para el pronóstico de un paciente aquejado de cáncer, que comprenden determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

En un aspecto, el procedimiento puede comprender poner en contacto dicha muestra biológica con una composición que se une a GP88.

35 En otro aspecto, el procedimiento puede comprender adicionalmente comparar los niveles de expresión de GP88 en dicha muestra biológica con un patrón y proporcionar de este modo un pronóstico asociado con dichos niveles de expresión de GP88 determinados.

Por ejemplo, en un aspecto de la divulgación, se ha descubierto que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con pacientes que tienen una duración disminuida de la supervivencia.

40 Por ejemplo, en una realización de la invención, se ha descubierto que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con pacientes que tienen una duración disminuida de la supervivencia global.

En otra realización, se ha descubierto que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con pacientes que tienen una duración disminuida de la supervivencia sin enfermedad.

En una realización de la invención, se ha descubierto que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con pacientes que tienen una duración disminuida de la supervivencia sin progresión.

45 En otra realización, se ha descubierto que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con pacientes que tienen una duración disminuida de la supervivencia sin episodios.

Los niveles de expresión de GP88 pueden utilizarse como el único factor para la valoración del estado de la enfermedad, o junto con los factores adicionales, que incluyen, en el caso ilustrativo del cáncer de mama, el estado

de los ganglios linfáticos, el estado de los receptores de estrógeno y similares.

Los procedimientos desvelados son útiles en el pronóstico de individuos con enfermedades neoplásicas, incluyendo tanto tumores sólidos como cánceres hematopoyéticos. Las enfermedades neoplásicas ejemplares incluyen carcinomas, tales como adenocarcinomas y melanomas; y sarcomas, tales como diversas leucemias o linfomas. Son de particular interés los cánceres de mama, de hígado, de riñón, de testículo, cerebral, de ovario, de piel, de pulmón, de próstata, de tiroides, de páncreas, de cuello de útero, colorrectal, de estómago, de intestino, de vejiga, hematopoyético (linfoide y mieloide), gastrointestinal (por ejemplo, de colon), del tracto genitourinario (por ejemplo, renal, de células uroteliales), uterino, de cabeza y cuello y nasofaríngeo; en particular el cáncer de mama, de forma más particular carcinoma ductal invasivo. Aún otros ejemplos adicionales de tumores incluyen tumores benignos que incluyen, pero sin limitación, hemangiomas, neuromas acústicos, neurofibromas, tracomias y granulomas piogénicos; otras neoplasias tales como la mayoría de los cánceres rectales, carcinoma de las células renales, carcinoma del pulmón no microcítico, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. Aún otros ejemplos adicionales de tumores incluyen: fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, liomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinoma de colon, carcinomas del sistema genitourinario, carcinoma escamoso, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello de útero, carcinomas del sistema endocrino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma del pulmón no microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

"Pronóstico", tal como se usa en la presente solicitud, significa la probabilidad de recuperación de una enfermedad o la predicción del probable desarrollo o resultado de una enfermedad, incluyendo, pero sin limitación, predecir la duración de la supervivencia global, la duración de la supervivencia sin enfermedad, la supervivencia sin progresión, la supervivencia sin episodios, la probabilidad de reaparición del cáncer en un paciente y la probabilidad de metástasis tumoral.

La frase "supervivencia global" es bien conocida para un experto en la materia y se refiere al destino del paciente tras su diagnóstico, a pesar de la posibilidad de que el motivo de muerte de un paciente no se deba directamente a los efectos del cáncer. La frase "supervivencia sin enfermedad" es bien conocida para un experto en la materia y significa vivir sin enfermedad controlada. Por ejemplo, si la expresión de GP88 se usa para diagnosticar o controlar el cáncer de mama, la supervivencia sin enfermedad significaría sin cáncer de mama detectable. La frase "probabilidad de recuperación" es bien conocida para un experto en la materia y se refiere a la probabilidad de desaparición del tumor o la ausencia de reaparición del tumor, lo que da como resultado la recuperación del paciente posterior a un diagnóstico de cáncer, en el que la probabilidad se determina de acuerdo con el procedimiento de la invención. La frase "probabilidad de reaparición" es bien conocida para un experto en la materia y se refiere a la probabilidad de reaparición del tumor o metástasis en un paciente posterior a un diagnóstico de cáncer, en el que la probabilidad se determina de acuerdo con el procedimiento de la invención. La frase "supervivencia sin episodios" es bien conocida para un experto en la materia y significa vivir sin la aparición de un grupo particular de episodios definidos (por ejemplo, la progresión del cáncer) tras una acción en particular (por ejemplo, el tratamiento). La frase "supervivencia sin progresión" es bien conocida para un experto en la materia y se refiere a la duración de tiempo durante y después del tratamiento en que un paciente está viviendo con una enfermedad que no empeora, y puede usarse en un estudio o ensayo clínico para ayudar a averiguar cómo de bien está funcionando un tratamiento. El término "metástasis" es bien conocido para un experto en la materia y se refiere al crecimiento de un tumor canceroso en un órgano o en una parte del cuerpo, que no está conectada de forma directa al órgano del tumor canceroso original. Se entenderá que metástasis incluye la micrometástasis, que es la presencia de una cantidad indetectable de células cancerosas en un órgano o en una parte del cuerpo que no está directamente conectada al órgano del tumor canceroso original. Por lo tanto, la presente divulgación contempla un procedimiento para determinar el riesgo de crecimiento adicional de uno o más tumores cancerosos en un órgano o en una parte del cuerpo que no está directamente conectada al órgano del tumor canceroso original.

Tal como se usa en el presente documento, la frase "muestra biológica" abarca una diversidad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto y útiles en el procedimiento de la invención. Las muestras biológicas pueden incluir, pero sin limitación, muestras de tejido sólido, muestras de tejido líquido, fluidos biológicos, aspirados, células y fragmentos de células. Los ejemplos específicos de muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, muestras de tejido sólido obtenidas mediante extracción quirúrgica, una muestra de ensayo patológica, una muestra archivada o una muestra de ensayo de biopsia, cultivos de tejido o células obtenidas de los mismos, y la progenie de las mismas, y cortes o frotis preparados a partir de cualquiera de estas fuentes. Los ejemplos no limitantes son muestras obtenidas a partir de tejido mamario, ganglios linfáticos y tumores de mama. Las muestras biológicas también incluyen cualquier material obtenido del cuerpo de un animal vertebrado, que incluyen, pero sin limitación, sangre, líquido cefalorraquídeo, suero, plasma, orina, aspirado del pezón, aspirado con aguja fina, lavados de tejido tales como el lavado ductal, saliva, esputo, fluido ascítico, de hígado, de riñón, de mama, óseo, de médula ósea, de testículo, de cerebro, de ovario, de piel, de pulmón, de próstata, de tiroides, de páncreas, de cuello de útero, de estómago, de

intestino, colorrectal, de cerebro, de vejiga, de colon, uterino, semen, linfa, exudado vaginal, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, de cabeza y cuello, tumores nasofaríngeos, líquido amniótico, leche materna, esputo o tensioactivo pulmonar, orina, materia fecal y otras muestras líquidas de origen biológico, y pueden referirse a las células o a fragmentos de células suspendidos en las mismas, o al medio líquido y sus solutos. Toda, o una parte, de la muestra biológica puede tener un nivel de expresión de GP88 característico de uno o más estados de enfermedad.

Tal como se usa en el presente documento, un "patrón" es una referencia que sirve como una base para la comparación de otros datos. Un patrón puede incluir una muestra biológica, fotografías o fotomicrografías de muestras biológicas, o intervalos normales (por ejemplo, dentro del intervalo de los individuos sanos) que derivan de un análisis de muestras biológicas. Por ejemplo, los patrones pueden incluir tejido normal y/o canceroso, tejido sin cáncer o una muestra patológica archivada que contiene expresión de la proteína GP88 en diversos niveles para su uso como control positivo, y tejido tumoral u otros tejidos que no muestran niveles de expresión de GP88 como muestras de control negativo, una fotografía o fotomicrografías, o intervalos normales derivados de dichas muestras. Por ejemplo, las fotografías en la Figura 6 se pueden considerar como patrones. Tales patrones pueden usarse en los procedimientos, incluyendo, pero sin limitación, para predecir la duración de la supervivencia sin enfermedad y la global, predecir la supervivencia sin progresión, predecir el riesgo de una supervivencia sin enfermedad o global disminuida, predecir la probabilidad de recuperación de un paciente que padece cáncer, predecir la probabilidad de reaparición del cáncer y/o la metástasis en un individuo que tiene un tumor canceroso, predecir el riesgo de reaparición del cáncer, procedimientos para explorar a un paciente que padece cáncer, para determinar el riesgo de metástasis tumoral, procedimientos para determinar el curso adecuado de tratamiento para un paciente que padece cáncer y procedimientos para controlar la eficacia de un curso de tratamiento para un paciente que padece cáncer.

Una "composición que se une a GP88" puede incluir cualquier agente, incluyendo, pero sin limitación, ligandos, anticuerpos anti-GP88 o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que tengan la capacidad de unirse de forma específica a GP88. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente que se une a (o tiene la capacidad de unirse a) GP88", se refiere a cualquier molécula que se une de forma específica a GP88 o a un fragmento de polipéptido de la misma, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, y detecta de este modo los niveles de expresión de GP88. Preferentemente, tales agentes se marcan para la detección usando procedimientos bien conocidos para los expertos en la materia. Los ejemplos de marcadores incluyen, pero sin limitación, radiomarcadores, cromóforos, fluoróforos, enzimas, restos de unión (por ejemplo, biotina) y similares.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tanto monoclonales como policlonales, pueden utilizarse como composición que se une a GP88 que se une a la proteína GP88 o a un fragmento polipeptídico de la misma. También se contempla en el presente documento como composición que se une a GP88 cualquier mutante de proteínas que se unen de forma específica a GP88, ya sea mediante delección (como se ejemplifica anteriormente), adición (por ejemplo, adición de un dominio GST o de un dominio GFP) o modificación de la secuencia (por ejemplo, mutagénesis dirigida), y similares.

Los ejemplos de anticuerpos anti-GP88 que pueden usarse para medir la concentración de GP88 en una muestra de fluido biológico pueden producirse a partir de líneas celulares de hibridoma, que incluyen, pero sin limitación, la línea celular de hibridoma 6B3 (número de referencia de ATCC PTA-5262), la línea celular de hibridoma 6B2 (número de referencia de ATCC PTA-5261), la línea celular de hibridoma 6CI 2 (número de referencia de ATCC PTA-5597), la línea celular de hibridoma 5B4 (número de referencia de ATCC PTA5260), la línea celular de hibridoma 5G6 (número de referencia de ATCC PTA-5595), la línea celular de hibridoma 4DI (número de referencia de ATCC PTA-5593), la línea celular de hibridoma 3F8 (número de referencia de ATCC PTA-5591), la línea celular de hibridoma 3F5 (número de referencia de ATCC PTA-5259), la línea celular de hibridoma 3F4 (número de referencia de ATCC PTA-5590), 3G2 (número de referencia de ATCC PTA-5592), la línea celular de hibridoma 2A5 (número de referencia de ATCC PTA-5589) y 4F10 (número de referencia de ATCC PTA-8763). Todas las restricciones impuestas por el depositante sobre la disponibilidad al público del material depositado se eliminarán de forma irrevocable al conceder la patente. En una realización de la invención, se usa como el anticuerpo primario en inmunohistoquímica y en ELISA de tipo sándwich el anticuerpo monoclonal 6B3 para GP88, que produce la línea celular de hibridoma (número de ATCC PTA-5262).

El término anticuerpo en el presente documento incluye, pero sin limitación, anticuerpos policlonales humanos y no humanos, anticuerpos monoclonales (Acm) humanos y no humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos anti-idiotipo (Ac anti-Id) y anticuerpos humanizados.

También se entiende que el término anticuerpo incluye tanto moléculas intactas como fragmentos de las mismas, tales como, por ejemplo, Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, Fd, Fd', Fv y scFv, anticuerpos monocatenarios (naturales o recombinantes) que tiene la capacidad de unirse al antígeno. El anticuerpo o componente de unión a antígeno puede estar en solución o unido a un soporte (placa, perlas, perlas magnéticas, etc.).

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser útiles en técnicas de inmunofluorescencia que emplean un anticuerpo marcado con fluorescencia (véase a continuación) con detección con microscopía de fluorescencia, citometría de flujo, o fluorométrica. La reacción de los anticuerpos y polipéptidos de la presente invención se puede detectar mediante procedimientos de inmunoensayo bien conocidos en la técnica. Los anticuerpos de la presente

invención se pueden emplear de forma histológica en microscopía óptica, en la formación de imágenes, en inmunofluorescencia o en microscopía inmunoelectrónica, para la detección *in situ* de la proteína GP88 en muestras de tejido o en biopsias. La detección *in situ* se puede lograr mediante la extracción de una muestra de ensayo histológica de un paciente y aplicando el anticuerpo marcado de forma apropiada de la presente invención.

- 5 La muestra biológica se puede tratar con un soporte de fase sólida o un vehículo tal como nitrocelulosa u otro soporte sólido que tenga la capacidad de inmovilizar las células o partículas de células o proteínas solubles. El soporte puede entonces lavarse, seguido de un tratamiento con el anticuerpo anti-GP88 marcado de manera detectable. Esto va seguido de un lavado del soporte para eliminar el anticuerpo que no se ha unido. La cantidad de marcador unido sobre dicho soporte puede detectarse después por medios convencionales. Por soporte de fase
10 sólida se entiende cualquier soporte que tenga la capacidad de unir antígeno o anticuerpos tales como, pero sin limitación, vidrio, polipropileno poliestireno, nylon, celulosa modificada o poliacrilamida. Como alternativa, el antígeno puede estar en solución y el anticuerpo está unido al soporte (placa, perlas, perlas magnéticas, etc.).

- 15 La actividad de unión de un lote dado de anticuerpo a la proteína GP88 se puede determinar de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los expertos en la materia serán capaces de determinar condiciones de ensayo óptimas y operativas para cada determinación empleando la experimentación rutinaria.

- En un aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para el pronóstico de una o más enfermedades caracterizadas por, o asociada(s) con, una expresión diferencial (por ejemplo, anormalmente alta y/o anormalmente baja) de GP88. Las enfermedades en las que el nivel de expresión de GP88 es alto (o elevado) incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de endometrio, etc.; y las enfermedades
20 en las que el nivel de expresión de GP88 es bajo incluyen, pero sin limitación, trastornos neurodegenerativos que comprenden: determinar el nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con un patrón y predecir de este modo un pronóstico asociado con dicho nivel de expresión de GP88.

- Un aspecto preferente de la divulgación proporciona procedimientos para predecir la duración de la supervivencia sin enfermedad de un paciente que padece una o más enfermedades caracterizadas por, o asociadas con, una expresión diferencial (por ejemplo, anormalmente alta y/o anormalmente baja) de GP88, que comprenden: determinar el nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos, o indicativos de una mayor o menor duración de la supervivencia sin enfermedad, y predecir de este modo la duración de la supervivencia sin enfermedad asociada con dicho nivel de
25 expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una duración disminuida de la supervivencia sin enfermedad.

- Un aspecto preferente de la divulgación proporciona procedimientos para predecir la duración de la supervivencia global de un paciente que padece una o más enfermedades caracterizadas por, o asociadas con, una expresión diferencial (por ejemplo, anormalmente alta y/o anormalmente baja) de GP88, que comprenden: determinar el nivel
35 de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos, o indicativos de una mayor o menor duración de la supervivencia sin enfermedad, y predecir de este modo la duración de la supervivencia sin enfermedad asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una duración disminuida de la supervivencia global.

- Un aspecto preferente de la divulgación proporciona procedimientos para predecir la probabilidad de reaparición de una o más enfermedades caracterizadas por, o asociadas con, una expresión diferencial (por ejemplo, anormalmente alta y/o anormalmente baja) de GP88, que comprenden: determinar el nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor probabilidad de reaparición de dicha enfermedad, y predecir de este modo la
40 probabilidad de reaparición de dicha enfermedad asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una probabilidad disminuida de reaparición de dicha enfermedad.

- Un aspecto preferente de la divulgación proporciona procedimientos para predecir la duración de la supervivencia sin progresión de un paciente que padece una o más enfermedades caracterizadas por, o asociadas con, una expresión diferencial (por ejemplo, anormalmente alta y/o anormalmente baja) de GP88, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dichos niveles con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor duración de la supervivencia sin enfermedad, y predecir de este modo la duración de la supervivencia sin progresión asociada con dicho nivel de
50 expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una supervivencia sin progresión.

- Un aspecto preferente de la divulgación proporciona procedimientos para predecir la duración de la supervivencia sin enfermedad de un paciente que padece cáncer, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dichos niveles con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor duración de la supervivencia sin enfermedad, y predecir de este modo la

duración de la supervivencia sin enfermedad asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una duración disminuida de la supervivencia sin enfermedad.

5 Otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para predecir la duración de la supervivencia global de un paciente que padece cáncer, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicha muestra, comparar dichos niveles con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor duración de la supervivencia global, y predecir de este modo la duración de la supervivencia global asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una duración disminuida de la supervivencia global.

10 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir la probabilidad de recuperación de un paciente aquejado de cáncer, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicha muestra, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor probabilidad de recuperación, y predecir de este modo la probabilidad de recuperación asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una probabilidad disminuida de recuperación.

15 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir la supervivencia sin progresión de un paciente de cáncer, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor supervivencia sin progresión; y predecir de este modo la supervivencia sin progresión asociada con dicho nivel de expresión de la proteína GP88, en la que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una supervivencia sin progresión disminuida de dicho paciente.

20 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona predecir el riesgo de una supervivencia sin enfermedad disminuida de un paciente de cáncer, que comprende: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de un mayor o menor riesgo de una supervivencia sin enfermedad disminuida; y predecir de este modo el riesgo de una supervivencia sin enfermedad reducida asociada con dicho nivel de expresión de la proteína GP88.

25 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona predecir el riesgo de una supervivencia global reducida de un paciente de cáncer, que comprende: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dichos nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de un mayor o menor riesgo de una supervivencia global disminuida; y predecir de este modo el riesgo de disminución de una supervivencia global disminuida asociado con dicho nivel de expresión de la proteína GP88.

30 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir la probabilidad de recuperación de un paciente, que comprenden: determinar el nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicha muestra, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor probabilidad de recuperación del cáncer, y predecir de este modo la probabilidad de recuperación asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en los que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una probabilidad disminuida de recuperación de dicho paciente.

35 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir la probabilidad de reaparición del cáncer en un paciente, que comprenden: determinar el nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicha muestra, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor probabilidad de reaparición del cáncer, y predecir de este modo la probabilidad de reaparición del cáncer asociada con dicho nivel de expresión de GP88, en los que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una probabilidad disminuida de reaparición del cáncer.

40 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir la probabilidad de metástasis del cáncer en un paciente, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de una mayor o menor probabilidad de metástasis del cáncer; y predecir de este modo la probabilidad de metástasis del cáncer asociada con dicho nivel de expresión de la proteína GP88, en los que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con una probabilidad aumentada de metástasis del cáncer en un paciente.

45 Otro aspecto de la presente divulgación proporciona procedimientos para predecir el riesgo de reaparición del cáncer en un paciente, que comprenden: determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparar dicho nivel con patrones indicativos de individuos sanos o indicativos de un mayor o menor riesgo de reaparición del cáncer; y predecir de este modo el riesgo de reaparición del cáncer asociado con dicho nivel de expresión de la proteína GP88, en los que los niveles elevados de expresión de GP88 se asocian con un riesgo aumentado de reaparición del cáncer en un paciente.

50 En una realización de la invención, se proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de un curso de tratamiento para un paciente que padece un carcinoma de pulmón no microcítico. Este procedimiento comprende: a) determinar un primer nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica de dicho paciente antes de dicho tratamiento y b) determinar posteriormente un segundo nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica de

dicho paciente durante dicho tratamiento. La comparación de dicho primer nivel de expresión de GP88 con dicho segundo nivel de expresión de GP88 indicará entonces la eficacia de dicho tratamiento, en el que un nivel elevado de GP88 en la segunda muestra, en comparación con la primera muestra, indica un tratamiento no eficaz.

5 Otro aspecto de la divulgación proporciona un procedimiento para explorar a un paciente aquejado de cáncer, para determinar el riesgo de reaparición del tumor o la metástasis tumoral. El procedimiento comprende determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, comparando dicho nivel con un patrón. Un paciente en el que se ha descubierto que tiene niveles elevados de GP88, con respecto a un patrón, se clasifica como que es más probable de padezca una reaparición del tumor o metástasis tumoral.

10 Un aspecto adicional preferente de la divulgación proporciona un procedimiento para determinar el curso adecuado de un tratamiento para un paciente que padece cáncer. Este procedimiento comprende determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de un paciente. Después, se identifica un primer grupo de pacientes como que tienen bajos niveles de expresión de una GP88, cuyo grupo de pacientes puede necesitar un tratamiento adecuado para pacientes que tienen una mayor posibilidad de supervivencia o un tiempo aumentado para la reaparición del tumor o la metástasis. El procedimiento además comprende identificar un segundo grupo de
15 pacientes como que tienen niveles elevados de expresión de una GP88, cuyo grupo de pacientes puede necesitar un tratamiento adecuado para pacientes que tienen una menor posibilidad de supervivencia y como que es más probable que padezcan una reaparición del tumor o metástasis.

20 En otro aspecto más de la divulgación, se proporcionan procedimientos para la determinación de niveles de expresión de GP88 en una etapa temprana del desarrollo del tumor. Los expertos en la materia conocen las diversas etapas del desarrollo tumoral, tal como se ejemplifica en Markman 1997, Basic Cancer Medicine, por ejemplo.

25 La divulgación también se dirige a un procedimiento para determinar la eficacia de la cirugía conservadora de la mama (mastectomía parcial) para el tratamiento de un cáncer de mama sin afectación ganglionar que comprende: a) obtener una muestra biológica de un individuo que necesite una cirugía conservadora de mama, b) medir los niveles de expresión de GP88 en dicha muestra biológica y c) comparar dichos niveles con los de un patrón, para predecir la sensibilidad de dicho cáncer de mama a la cirugía conservadora de mama.

Otro aspecto de la divulgación proporciona procedimientos para el pronóstico de un paciente con cáncer, que comprenden: a) obtener una muestra biológica de un individuo que necesite un pronóstico; b) determinar el nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente; c) puntuar dicha muestra para los niveles de expresión de GP88 y d) comparar dicha puntuación con la obtenida de una muestra control (o patrón).

30 La divulgación también se dirige a un procedimiento para determinar el efecto de un tratamiento antiestrogénico que comprende: a) obtener una muestra biológica de un individuo que necesite tratamiento antiestrogénico, b) medir los niveles de expresión de GP88 en dicha muestra biológica y c) comparar dichos niveles con un patrón para predecir la sensibilidad al tratamiento antiestrogénico. Este procedimiento puede comprender además una etapa de determinación del curso adecuado del tratamiento para tal paciente, de acuerdo con los procedimientos enumerados
35 anteriormente.

40 Tal como se usa en el presente documento, "terapia antiestrogénica" se refiere a la administración de una composición de antiestrógenos con el fin de prevenir o tratar el crecimiento tumoral. Los ejemplos de antiestrógenos incluyen antagonistas de los receptores de estrógenos o MSRE (sigla de: moduladores selectivos de receptores de estrógeno) (tamoxifeno y raloxifeno). Otras composiciones de antiestrógenos incluyen, inhibidores de la aromatasa (por ejemplo, Arimidex® (anastrozol), Femera®) y reguladores negativos del receptores de estrógeno (por ejemplo, Faslodex®). Los efectos antiestrogénicos del tamoxifeno pueden referirse a su capacidad para competir con estrógenos por los sitios de unión en tejidos diana. Otros antiestrógenos, tales como los inhibidores de la aromatasa, inhiben o reducen la cantidad de estrógeno disponible.

La divulgación también se dirige a un procedimiento para explorar compuestos que comprende:

45 a) obtener compuestos a explorar por su capacidad de afectar de forma positiva o de forma negativamente la expresión de GP88; b) poner en contacto una muestra biológica relevante con dicho compuesto y c) determinar el efecto de dicho compuesto en los niveles de expresión de GP88 en dicha muestra biológica. Preferentemente, el efecto de dicho compuesto se puede determinar mediante la unión de un anticuerpo a GP88 para dicha muestra, con respecto a un patrón.

50 Determinación de los niveles de expresión de GP88

La determinación de la expresión de GP88 se puede realizar mediante uno o más procedimientos conocidos por un experto en la materia. Por ejemplo, los niveles de expresión de GP88 se pueden determinar mediante la detección de (a) un polipéptido GP88, (b) ARNm que codifica una proteína GP88, (c) una porción de ADN que constituye un gen de GP88, o (d) cualquier combinación de los mismos.

55 Por ejemplo, los niveles de expresión de GP88 se pueden detectar midiendo los niveles de la proteína GP88 usando las composiciones que se unen a GP88. La detección de los niveles de proteína GP88 se puede llevar a cabo

usando cualquiera de los procedimientos conocidos por un experto en la materia, que incluyen, pero sin limitación, procedimientos de quimioluminiscencia, detección mediante tinción histoquímica o bioquímica (es decir, ensayos inmunohistoquímicos), análisis por transferencia de Western, citometría de flujo, inmunoprecipitación (o el equivalente de los mismos para los agentes que no son anticuerpos), medición de la absorbancia de la resonancia de plasmón, y similares. En una realización de la invención, el procedimiento para detectar los niveles de la proteína GP88 es un inmunoensayo (tal como un ELISA), que incluye el uso de al menos un anticuerpo. En otra realización más de la invención, se puede llevar a cabo mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-GP88, la tinción de GP88 en una muestra de tejido, por ejemplo, cortes de tejido incluidos en parafina, fijados con formalina, y determinando la expresión de GP88.

Por ejemplo, se realizó una realización de la invención usando el kit de IHQ Oncostain 88™, que usa un anticuerpo monoclonal de ratón primario, un anticuerpo anti-IgG de ratón secundario, un bloqueante de la peroxidasa para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena y un sustrato cromogénico. La medición del polipéptido que codifica un gen de GP88 puede incluir mediciones de fragmentos del polipéptido, en las que los fragmentos surgen a partir de variantes transcripcionales o traduccionales del gen o, de forma alternativa, los polipéptidos de distintos tamaños surgen como resultado de modificaciones postraduccionales que incluyen la proteólisis de una porción mayor de un polipéptido de GP88.

La detección de los niveles de los ARNm que codifican GP88 también puede servir como un indicador de la expresión de GP88. Se conocen bien en la técnica los procedimientos usados para detectar los niveles de ARNm e incluyen la detección de la hibridación o amplificación con el ARNm que codifica GP88. Esta detección se puede llevar a cabo mediante el análisis del ARNm, tanto *in vitro* como *in situ* (por ejemplo, en una muestra de tejido), usando uno de los procedimientos conocidos para un experto en la materia, tal y como se ejemplifica en Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1999); en la patente de Estados Unidos n.º 5.882.864; y similares. Un ARNm de GP88 detectado será cualquier transcrito de ARN de un gen GP88, o un fragmento del mismo.

25 Clasificación de pacientes

Los pacientes se pueden clasificar comparando los niveles de expresión de GP88 en la muestra biológica obtenida de un paciente con un patrón. Por ejemplo, tras medir el nivel de expresión de GP88 en la muestra, el nivel medido se compara con un patrón. El patrón es un nivel de expresión de GP88 usado para evaluar el nivel de expresión de GP88 en la muestra biológica de un paciente. Por ejemplo, en una realización, cuando los niveles de expresión de GP88 en la muestra del paciente son mayores que los del patrón, se considerará que la muestra del paciente tiene niveles elevados de expresión de GP88. Por el contrario, en otra realización, cuando los niveles de expresión de GP88 en la muestra del paciente son menores que los del patrón, se considerará que la muestra tiene niveles bajos de expresión de GP88.

En otra realización, a los pacientes se les puede asignar una "puntuación" asociada con la expresión de GP88 en una muestra biológica dada. Se puede "puntuar" una muestra durante el diagnóstico o control de un cáncer de mama. La puntuación se puede determinar mediante los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica. En una realización, a los niveles elevados de expresión de GP88 en una muestra biológica se les da una mayor puntuación en comparación con los bajos niveles de expresión de GP88, a los que se les da una puntuación comparativamente menor. La puntuación también se puede determinar mediante un examen visual de las muestras mediante inmunohistoquímica. En otra realización, una puntuación más cuantitativa implica determinar dos o más parámetros, por ejemplo (i) la intensidad de la tinción y (ii) la proporción de células teñidas ("positivas") que se han muestreado. A base de estos múltiples parámetros se pueden asignar puntuaciones que reflejen niveles crecientes de tinción positiva.

Así pues, en una realización, se puede comparar una puntuación asociada con los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica obtenida de un paciente con la puntuación asociada con los niveles de expresión de GP88 en el patrón o con células que no tengan niveles de expresión de GP88 bajos o elevados usadas como control. Tal comparación puede proporcionar una base para un mejor pronóstico del paciente. Por ejemplo, en una realización, los procedimientos de la invención pueden puntuar los niveles de expresión de GP88 usando una escala de 0 a 3+, en la que 0 es negativo (expresión de GP88 que no se puede detectar), 1+ y 2+ se asocian con una tinción débil y débil a moderada, respectivamente, y 3+ se asocia con una tinción de alta intensidad, en más del 10 % de las células tumorales; y en la que una baja puntuación indica un mejor pronóstico de los pacientes.

El pronóstico de los pacientes que expresan diversos niveles de GP88 se puede llevar a cabo usando análisis de única variable o análisis de múltiples variables. Estos procedimientos determinan la probabilidad de una correlación entre una o más variables y un dado resultado. En una realización, los procedimientos determinarán la probabilidad de una correlación entre los niveles de expresión de GP88 (o los niveles de expresión de GP88 acoplados con otra variable) y la supervivencia sin enfermedad o global de los pacientes de cáncer. Para llevar a cabo estos análisis se puede usar uno cualquiera de la pluralidad de procedimientos conocidos para los expertos en la materia. Un ejemplo de análisis de variable única es el procedimiento de Kaplan-Meier o la prueba de rangos logarítmicos. Un ejemplo de análisis de múltiples variables es el modelo de regresión de riesgo proporcional de Cox. Los procedimientos de la invención pueden comprender además el análisis de los niveles de expresión de GP88 junto con marcadores

adicionales de cáncer de mama. La relación proporcional de Cox proporciona una relación de riesgo o un riesgo para la supervivencia sin enfermedad y global para un paciente con un nivel de expresión de GP88 variable.

El análisis de la supervivencia usando los procedimientos de Kaplan y Meier es la técnica estadística recomendada para su uso en ensayos de cáncer. Se aplica analizando la distribución de los tiempos de supervivencia de los pacientes tras su inclusión en un estudio. El análisis expresa esto en términos de la proporción de pacientes aún vivos hasta un tiempo dado después de su inclusión. En términos gráficos, una representación de la proporción de pacientes que sobreviven frente al del tiempo tiene un descenso característico (a menudo exponencial), indicando la inclinación de la curva la eficacia del tratamiento que se está investigando. Cuanto menos pronunciada sea la curva de supervivencia, más eficaz será el tratamiento. El análisis de Kaplan-Meier se puede usar para analizar la significancia estadística de las diferencias entre las curvas de supervivencia asociadas a dos tratamientos diferentes.

En una realización, después de que se han determinado los niveles de expresión de GP88 en la muestra obtenida de un paciente y se han comparado con el patrón, se clasifica entonces al paciente en un grupo que tiene una determinada probabilidad de supervivencia sin enfermedad o global. Después, se evalúa la probabilidad de supervivencia sin enfermedad o global para el paciente a base de la probabilidad de supervivencia sin enfermedad o global para los pacientes en ese grupo. Por ejemplo, se puede determinar que la muestra biológica obtenida de un paciente tiene niveles elevados de expresión de GP88 con respecto al patrón. Después, este paciente podría clasificarse en un grupo de pacientes que tienen niveles elevados de expresión de GP88. Ya que, en conformidad con la presente invención, se ha descubierto que hay una duración disminuida de la supervivencia sin enfermedad o global para el grupo de pacientes que expresan niveles elevados de GP88, se considera que el paciente específico aquejado de cáncer tiene una duración disminuida de la supervivencia sin enfermedad o global.

Kits

La presente divulgación proporciona un kit para determinar los niveles de expresión de GP88 en la muestra biológica. Tal kit comprenderá un reactivo para detectar el ARNm que codifica GP88, el polipéptido GP88 o cualquier combinación o fragmento de los mismos. El reactivo comprenderá una o más moléculas que tengan la capacidad de unirse específicamente a una secuencia de ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica GP88 o al polipéptido GP88.

El kit puede comprender uno o más reactivos de ácido nucleico para la detección del ARNm que codifica GP 88 (ya sea sentido como antisentido). El uno o más reactivos de ácido nucleico se pueden usar para la hibridación y/o amplificación del ARNm que codifica GP88. El kit puede comprender uno o más parejas de cebadores para amplificar el ARNm que codifica GP88. El kit puede comprender adicionalmente muestras del ARNm total obtenido de tejido en diversos estados fisiológicos, tales como, por ejemplo, normal y de tumor con metástasis progresiva, para usarlos como controles. El kit también puede comprender tampones, bases nucleotídicas y otras composiciones a utilizar en reacciones de hibridación y/o amplificación. Cada solución o composición puede estar contenida en un vial o frasco, y todos los viales se mantienen en estrecho confinamiento en una caja para la venta comercial. Otra realización de la presente invención abarca un kit para su uso en la detección del ARNm que codifica GP88 en una muestra biológica, que comprende sondas de oligonucleótido eficaces para unirse con alta afinidad *in vitro* o *in situ* al ARNm que codifica GP88, y envases para cada una de estas sondas.

En una realización adicional, la divulgación abarca un kit para su uso en la determinación del nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica que comprende uno o más agentes, tales como, por ejemplo, uno o más anticuerpos, específicos para uno o más polipéptidos GP88, o fragmentos. En una realización particular, el kit comprenderá uno o más agentes y uno o más marcadores de ácido nucleico, en el que los agentes y los marcadores de ácido nucleico se modifican en una manera apropiada para llevar a cabo ensayos de inmunorreacción en cadena de la polimerasa.

Un aspecto preferente de la divulgación se dirige a un kit para determinar los niveles de expresión de GP88 en una muestra biológica de mamífero, en el que dichos niveles de expresión de GP88 son un indicador del pronóstico del cáncer de mama, comprendiendo dicho kit: a) un anticuerpo que se une específicamente a GP88 o a un fragmento de unión a antígeno del mismo, b) un reactivo útil para detectar el grado de interacción entre dicho anticuerpo y GP88; c) un reactivo o solución útil para la recuperación del antígeno y d) muestras de control positivo y/o negativo. Dicho anticuerpo se puede enlazar de forma directa a un reactivo indicador, en el que dicho reactivo indicador se selecciona del grupo que consiste en reactivos fluorescentes, colorimétricos, de inmunoperoxidasa e isotópicos. Como alternativa, el kit puede incluir adicionalmente un segundo anticuerpo indicador enlazado a un reactivo indicador, en el que dicho reactivo indicador se selecciona del grupo que consiste en reactivos fluorescentes, colorimétricos, de inmunoperoxidasa e isotópicos.

En una realización, el kit contiene al menos un anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-GP88 6B3), al menos un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, anticuerpo policlonal anti-GP88 humano marcado con una enzima de detección tal como HRP) y a al menos un sustrato (por ejemplo, TMB). Como alternativa, los kits pueden contener anticuerpos secundarios radiomarcados en lugar del anticuerpo secundario marcado con una enzima. Los kits también pueden contener artículos desechables para llevar a cabo ensayos de detección (por ejemplo, placas de microtitulación, pipetas).

Debe entenderse que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o entorno específico, estará dentro de la capacidad de un experto en la materia, a la luz de las enseñanzas contenidas en el presente documento. La presente invención se ilustra de forma más completa mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

5 Expresión de GP88 en carcinoma ductal invasivo

La metodología actual se basa en la tinción de GP88 en lesiones de mama humana incluidas en parafina y fijadas con formalina, investigadas con variables patológicas clínicas. Se observó tinción citoplasmática de GP88 en carcinoma de mama, mientras que casi siempre fue negativa en epitelio benigno de mama. Se prepararon cortes de tejido de 4-6 micrómetros de 203 biopsias incluidas en parafina, fijadas con formalina. La tinción de GP88 se llevó a cabo mediante inmunohistoquímica usando un anticuerpo anti-GP88 humano, y la expresión de GP88 se examinó en tejidos normales, lesiones benignas, carcinomas ductales y lobulillares (Tabla 1; CDIS: carcinoma ductal *in situ*, CLIS: carcinoma infiltrante *in situ*, CLIS: carcinoma lobulillar *in situ*, CLI: carcinoma lobulillar infiltrante). Adicionalmente, se realizaron estudios de correlación de la expresión de GP88 en los IDC con la clasificación histológica, el índice de proliferación (Ki67), p53, RE y expresión de Her-2.

Tabla 1. Puntuación de la inmunotinción de GP88

Diagnóstico	N	0	1+	2+	3+
Benigno	26	25 (96 %)	1 (4 %)	0	0
CDIS	27	9 (33 %)	8 (30 %)	7 (26 %)	3 (11 %)
IDC	124	25 (20 %)	48 (39 %)	33 (27 %)	18 (15 %)
CLIS	12	11 (92 %)	1 (8 %)	0	0
CLI	17	8 (47%)	6 (35%)	3 (18%)	0

15 Se ha observado que GP88 se expresa tanto en los tumores RE+ como RE-, y se expresó de forma predominante en los IDC con una correlación con la clasificación histológica y con un índice de proliferación Ki67.

Ejemplo 2

Análisis de los niveles de expresión de GP88 en tejidos de cáncer de mama de RE-. Pacientes RE+/GL- y pacientes RE+/GL+

20 Diseño del estudio

El estudio clínico se llevó a cabo con 389 casos de cáncer de mama (véase por favor la Tabla 2 para las características de los sujetos consideradas en el estudio clínico), específicamente, muestras de tejido de carcinoma ductal invasivo almacenadas como bloques incluidos en parafina, fijados con formalina y obtenidos a partir de tres bancos de tejidos. Los criterios de inclusión son como sigue: año y edad en el momento del diagnóstico, características del tumor: receptores de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), clasificación del tumor, tamaño del tumor, estado ganglionar, estado en el último seguimiento, supervivencia global (SG), estado de recidiva, tiempo hasta la primera recidiva, tratamiento (RE+, tamoxifeno LNO). Los casos que se ajustan a los criterios de inclusión se extrajeron para preparar portaobjetos para el estudio.

Procedimientos de estudio

30 Para cada caso, el laboratorio de histología del sitio de procesamiento del banco cortó en ese momento cortes de tejido de 4 - 6 micrómetros en portaobjetos de microscopio cargados de forma positiva. El patólogo responsable de extraer los bloques examinó la adecuación del corte de los portaobjetos. La expresión de GP88 se determinó mediante la tinción de los portaobjetos con el kit Oncostain 88™ y se puntuó mediante patólogos certificados.

Materiales y procedimientos

35 El procedimiento actual se realizó usando el kit de IHQ Oncostain 88™, que usa un anticuerpo primario monoclonal de ratón, un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón, un bloqueante de la peroxidasa para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena y un sustrato cromogénico. El anticuerpo primario de ratón se une a GP88 humana expresada en el citoplasma de las células de carcinoma de mama. Esta etapa se siguió de la adición de un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa que se une al anticuerpo primario. El complejo específico anticuerpo primario-anticuerpo secundario se visualizó después con un sustrato cromogénico diluido de forma óptima, se contratiñó y se cubrió con un cubre objetos. Los resultados se interpretaron usando un microscopio óptico.

Resultados

Se analizó el patrón de tinción de las muestras de tejido y se categorizó (es decir, se puntuó) como se muestra en la Tabla 3. Se observaron los niveles de expresión de GP88 para la tinción citoplasmática en más del 10 % de las células tumorales. A la ausencia de tinción o tinción pálida observada en menos del 10 % de las células tumorales se le dio una puntuación de "0". A la tinción citoplasmática débil observada en más del 10 % de las células tumorales se les dio una puntuación de "1+", a una tinción citoplasmática de débil a moderada observada en más del 10 % de las células tumorales se le dio una puntuación de "2+" y a una tinción citoplasmática fuerte observada en más del 10 % de las células tumorales se le dio una puntuación de "3+". La Figura 6 muestra la reactividad del anti-GP88 con las biopsias de cáncer de mama incluidas en parafina, fijadas con formalina y el patrón de tinción, mediante un procedimiento de tinción inmunohistoquímica indirecto.

Los patrones de tinción obtenidos anteriormente se sometieron a interpretaciones adicionales para ayudar en la evaluación del pronóstico de tumores de mama (véase la Tabla 4, más adelante). Se categorizó una puntuación de menos de 3+ (es decir, 0, 1+ y 2+) como grupo de bajo riesgo de GP88 y se consideró que tiene un riesgo disminuido o menor de reaparición o muerte, y una puntuación de 3+ se categorizó como grupo de riesgo alto de GP88 y se consideró que tiene un riesgo aumentado o mayor de reaparición o muerte.

Plan y análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados lo llevó a cabo un bioestadístico. El plan de análisis estadístico se basó en la evaluación del rendimiento de la prueba por su capacidad para predecir la supervivencia sin enfermedad y/o la supervivencia global. Se diseñó para su uso la prueba de rangos logarítmicos para identificar parejas de grupos de diagnóstico y los modelos de riesgos proporcionales de Cox para la cuantificación del riesgo en poblaciones RE+ separadas por el estado de los ganglios linfáticos (véase la Tabla 5 a continuación; SG= supervivencia global, SSE = Supervivencia sin enfermedad, nGL = Negativos para ganglios linfáticos y pGL = positivos para ganglios linfáticos). Además, las funciones de supervivencia para la supervivencia global y sin enfermedad se determinaron mediante las curvas de Kaplan-Meier para el grupo GP88 3+ y GP88 < 3+ (GP88 0, 1 y 2+).

Entre los pacientes RE- GP88 mostró una asociación estadísticamente significativa con la mortalidad global (Figura 1). Los datos mostraron que los pacientes que tenían cánceres RE- que expresan un nivel elevado de GP88 (GP88 3+) tienen una menor probabilidad de supervivencia global que los cánceres RE- con una menor expresión de GP88 (GP88 0, 1 + o 2+).

La expresión elevada de GP88 (3+) es un indicador elevado estadísticamente significativo del riesgo de reaparición del tumor en la población RE+ / GL-, y se asocia de manera significativa con la mortalidad global. Un nivel elevado de expresión de GP88 (grupo de alto riesgo de GP88 con una puntuación de 3+ en la tinción citoplasmática) se asoció con una supervivencia sin enfermedad disminuida (Figura 2) y una supervivencia global disminuida (Figura 3).

La expresión elevada de GP88 (3+) también fue un indicador elevado estadísticamente significativo del riesgo de recidiva y de la mortalidad global en la población RE+ / GL+. Un nivel elevado de expresión de GP88 (grupo de alto riesgo de GP88 con una puntuación de 3+ en la tinción citoplasmática) se asoció con una supervivencia sin enfermedad disminuida (Figura 4) y una supervivencia global disminuida (Figura 5).

Tabla 4: Interpretación del patrón de tinción

Puntuación	GP88	Categoría de GP88	Interpretación
0	< 3+	Grupo de bajo riesgo de GP88	Riesgo disminuido (menor) de reaparición o muerte
1+			
2+			
3+	3+	Grupo de alto riesgo de GP88	Riesgo aumentado (mayor) de recidiva o muerte

Ejemplo 3

Análisis de los niveles de expresión de GP88 en fluidos biológicos obtenidos de pacientes de cáncer de mama

Las concentraciones de GP88 en muestras de suero humano se midieron por triplicado mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las muestras de GP88 patrón se prepararon a partir de GP88 recombinante en una solución de glicerol al 30% y PBS-leche al 1% a concentraciones de 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 3, 10 y 20 ng/ml. Se recubrieron pocillos de 100 microlitros en una placa de microtitulación con 10 microgramos por

mililitro de anticuerpo monoclonal 6B3 anti-GP88 humana (0,78 mg/ml de anticuerpo 6B3 en solución salina tamponada con fosfato (PBS)) y se incubaron toda una noche a 4°C. Los pocillos se lavaron con PBS seguido de la adición a cada pocillo de policlonal anti-PCDGF humano (fracción de IgG) a una concentración de 3 microgramos/ml a 37°C durante 1,5 horas. Los pocillos se lavaron con PBS antes de la adición a cada pocillo del anticuerpo de detección (cabra anti IgG de conejo - peroxidasa de rábano picante (HRP)). Se añadió TMB (sustrato) y se permitió la incubación con las muestras durante 1 hora. La densidad óptica de las muestras se determinó usando un lector espectrómetro de ELISA configurado a una longitud de onda de 620 nanómetros. La representación de la densidad óptica de las muestras de GP88 patrón (eje y) frente a la cantidad de GP88 en cada muestra (eje x) generó una curva patrón (Figura 7). La concentración de GP88 de las muestras desconocidas se determinó mediante la medición de la densidad óptica y usando la curva patrón (Figura 6), para determinar la concentración de GP88.

El nivel de GP88 en circulación se midió para los pacientes aquejados de cáncer de mama que no tenían evidencias de enfermedad y que tenían una enfermedad progresiva. Se observó (Figura 8) que el nivel de GP88 en el suero de los pacientes de cáncer de mama (Ptes. de CM) sin evidencias de enfermedad (de partida) está dentro del intervalo de los individuos sanos. Sin embargo, los Ptes. de CM con una enfermedad progresiva tienen niveles de GP88 en circulación significativamente más altos.

Los estudios además mostraron que los niveles en circulación de expresión de GP88 en pacientes de cáncer de mama que no tienen evidencia de enfermedad permanecen bajos y dentro del intervalo de los individuos sanos. Los niveles de expresión de GP88 se midieron (Figura 9) en pacientes sin evidencia de enfermedad durante un amplio período de tiempo (es decir, 4 años: de octubre de 2004 a abril de 2008, tal como se muestra en la Figura 9). Los resultados demostraron que los pacientes en una etapa temprana de la enfermedad (Fase 2) que no tenían evidencia de enfermedad mantuvieron estables los niveles de GP88 que están dentro del intervalo de los individuos sanos.

Se observaron niveles de GP88 en circulación para pacientes en la fase temprana (fase 2), que expresaron niveles elevados de GP88 que recayeron a la etapa 4 con el tiempo (aproximadamente, un año y medio: de enero de 2006 a mayo de 2007, en el presente caso). Los datos mostraron (Figura 10) que en las últimas etapas los pacientes expresaron de forma anómala niveles elevados de GP88.

Los niveles elevados de GP88 se asocian con pérdida de la supervivencia

Se midió el nivel de GP88 en el suero de dos pacientes que murieron de cáncer de mama usando el protocolo convencional de ELISA y se observó que el mantenimiento de unos niveles elevados de GP88 durante varias semanas conducía a una disminución de la supervivencia. Los dos pacientes finalizaron el estudio cuando se determinó que no tenían evidencia de enfermedad (NEE), en los que el nivel de GP88 era bajo y estaba dentro del intervalo de los individuos sanos (aproximadamente 20 unidades - 20 ng/ml). Sin embargo, con el tiempo, los niveles de GP88 alcanzaron de 160 a 200 unidades (160-200 ng/ml), momento en el cual el paciente 1 murió en una semana (Figura HA) y el paciente 2 murió en 3 semanas (Figura HB).

Se observaron resultados similares cuando el nivel de expresión de GP88 se midió en plasma de pacientes de cáncer de mama, es decir, se observaron niveles elevados de GP88 cuando se compararon con los individuos sanos.

Aunque la invención se ha descrito en referencia a realizaciones desveladas, deber entenderse que pueden realizarse diversas modificaciones sin alejarse del espíritu de la invención. En consecuencia, la invención está limitada solo por las siguientes reivindicaciones.

Ejemplo 4

Estudios para validar GP88 como un factor de pronóstico en cáncer de pulmón

Tal como se describe anteriormente en los materiales y procedimientos del Ejemplo 2, el examen de la expresión de GP88 en micromatrices de tejido usando el kit de IHQ Oncostain 88™ demostró la expresión de GP88 en tejido de cáncer de pulmón tanto de carcinoma escamoso como de adenocarcinoma y la ausencia de expresión de GP88 en tejidos humanos normales que incluyen tejido de pulmón normal humano (Tabla 5, a continuación).

Tabla 5: Análisis de tinción de GP88 en tejidos normal y de carcinoma de pulmón					
Fuente de tejido para el análisis	Número total de casos	Puntuación (% del total)			
		0	1+	2+	3+
Carcinoma escamoso	28	8 (29 %)	9 (32 %)	5 (18 %)	6 (21 %)

(continuación)

Fuente de tejido para el análisis	Número total de casos	Puntuación (% del total)			
		0	1+	2+	3+
Adenocarcinoma	27	7 (26 %)	5 (19 %)	7 (26 %)	8 (30 %)
Pulmón normal	5	5 (100 %)	0	0	0

Análisis de los niveles de expresión de GP88 en tejidos de cáncer de pulmón

5 Para determinar si los niveles crecientes de GP 88 en tejido de cáncer de pulmón en la Fase I/II se correlacionan en pacientes de cáncer de pulmón con una supervivencia sin enfermedad (SSE) reducida, se calculó la expresión de GP88 en 85 casos de CPNM en fase I/II que se puede extirpar, provistos de datos clínicos y de resultados. El tejido se tiñó usando el kit de IHQ Oncostain 88™ y un patólogo certificado por la junta puntuó la tinción de GP88 de los portaobjetos teñidos resultantes para.

10 Tras el análisis de las puntuaciones de GP88 y de los datos de supervivencia usando las representaciones de Kaplan-Meier, se observó una disminución estadísticamente significativa en la SSE a medida que aumentaban los niveles de GP88. Esto se ensayó formalmente mediante un ajuste a un modelo de riesgo proporcional de Cox usando PROC PHREG de SAS, tratando el nivel de GP88 como un predictor de recidiva a intervalos de escala. Esto dio una asociación altamente significativa entre GP88 y la recidiva ($P = 0,0091$). El coeficiente de GP88 fue de 0,676, indicando que cada unidad de aumento en GP88 se corresponde aproximadamente con la duplicación del riesgo de recidiva (Figura 14).

15 La correlación de la expresión de GP88 con la supervivencia global en los mismos 85 casos demostró un aumento del 74 % del riesgo de morir para cada aumento en la puntuación de GP88 (Figura 15). Estos datos demuestran que, de manera similar al cáncer de mama, la expresión de GP88 se puede usar como un predictor de riesgo de recidiva en cáncer de pulmón, por ejemplo, en una fase temprana de CPNM.

Ejemplo 6

20 Análisis de los niveles de expresión de GP88 en fluidos biológicos obtenidos de pacientes de cáncer de pulmón

Se midieron las concentraciones de GP88 en muestras de suero humano obtenidas de pacientes de cáncer de pulmón y de pacientes sanos sin cáncer de pulmón mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Los datos se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 7. Comparación de los niveles séricos de GP88 en pacientes de cáncer de pulmón y en pacientes sanos sin cáncer de pulmón.

Tipo de paciente	Número de casos	Niveles séricos de GP88 (ng/ml)	
		Media	Intervalo
Sano	18	28,7 ± 4,25	16,6 - 38,2
Cáncer de pulmón	18	43,0 ± 10,6	28,5 - 73*
-2 pacientes progresaron después de la medición inicial, alcanzando 120 ng/ml			

25 Los datos mostrados en la Tabla 7 indican que la GP88 sérica se puede usar en el cáncer de pulmón como un indicador predictivo. Adicionalmente, el análisis de datos usando una representación de caja y bigote comparativo mostró una clara diferencia entre las muestras obtenidas de pacientes con cáncer de pulmón y de pacientes sanos sin cáncer de pulmón. La prueba de la suma de rangos de Wilcoxon confirma esta impresión visual, dando un valor de P aproximado de 0,0004.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de controla de la eficacia de un curso de tratamiento para un paciente que padece carcinoma de pulmón no microcítico que comprende:

5 determinar un primer nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica de dicho paciente antes de dicho tratamiento; y determinar posteriormente un segundo nivel de expresión de GP88 en una muestra biológica de dicho paciente durante dicho tratamiento,

10 en el que la determinación del nivel de expresión de GP88 comprende la puesta en contacto con una composición de unión a GP88, y comparar dicho primer nivel de expresión de GP88 con dicho segundo nivel de expresión de GP88 para indicar la eficacia de dicho tratamiento, en el que un nivel elevado de GP88 en la segunda muestra en comparación con la primera muestra indica un tratamiento ineficaz.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es una muestra de tejido sólido.

3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicha composición de unión a GP88 se selecciona de un anticuerpo anti-GP88 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

15 4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es policlonal o monoclonal.

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 4, en el que dicho fragmento de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en Fab, F(ab)₂, Fab', F(ab')₂, Fd, Fd', Fv y scFv.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es un anticuerpo humanizado o quimerizado.

20 7. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la muestra de tejido sólido es tejido pulmonar.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra es un fluido biológico.

9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que el fluido es suero, sangre, plasma, esputo pulmonar o tensioactivo pulmonar.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el fluido es suero.

25

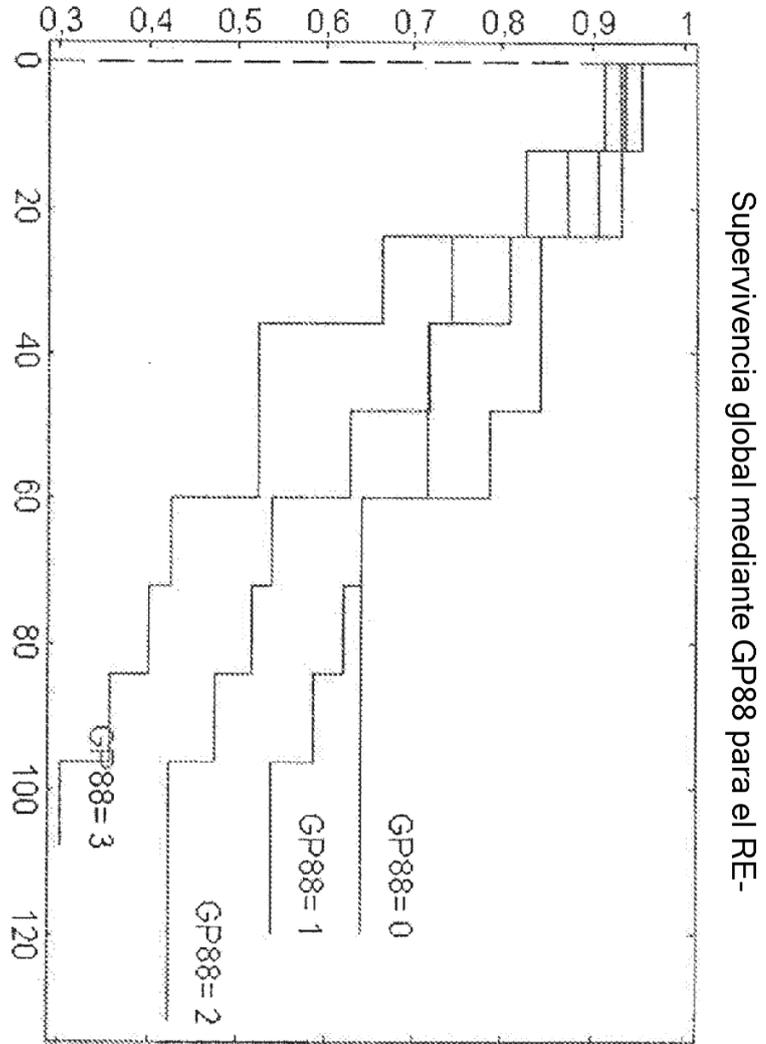


Figura 1

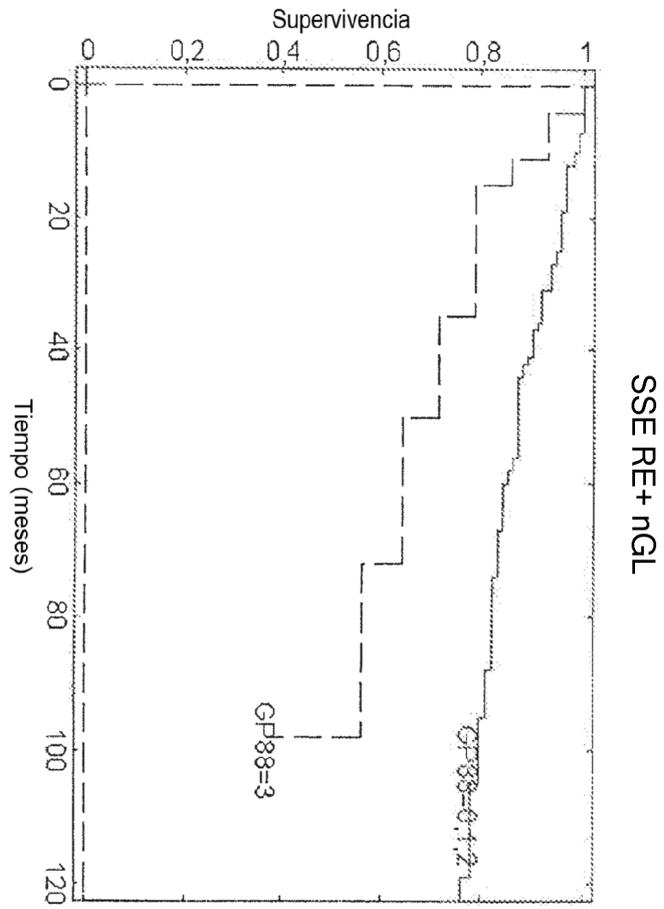


Figura 2

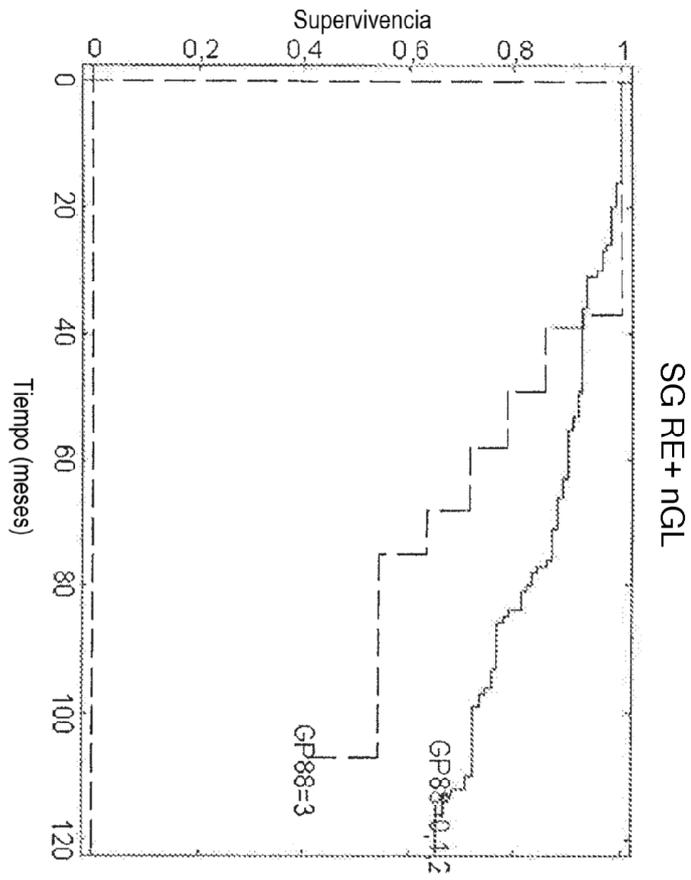


Figura 3

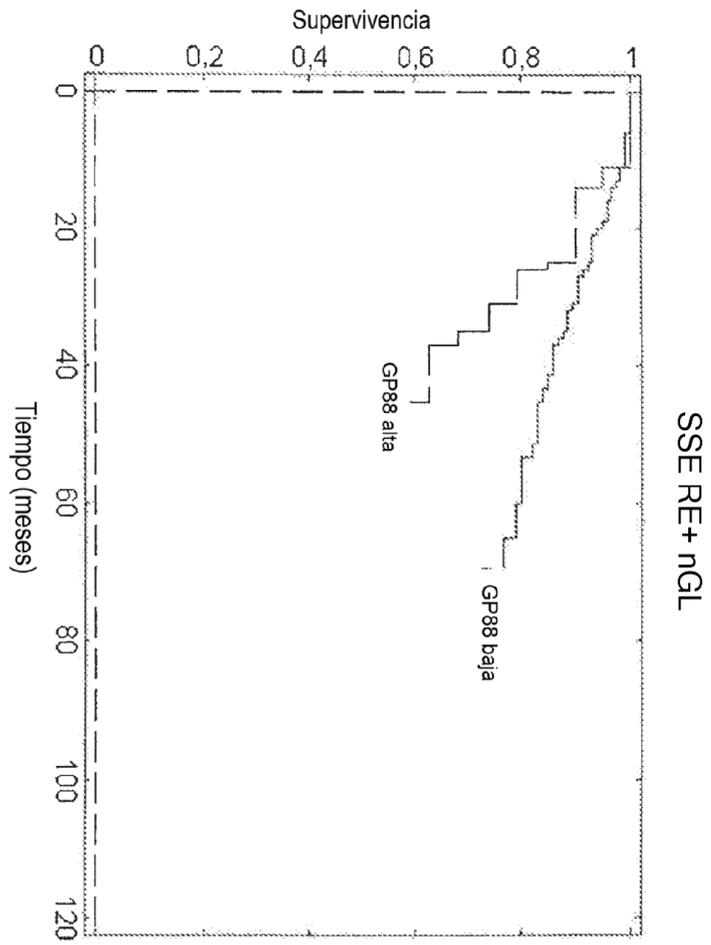


Figura 4

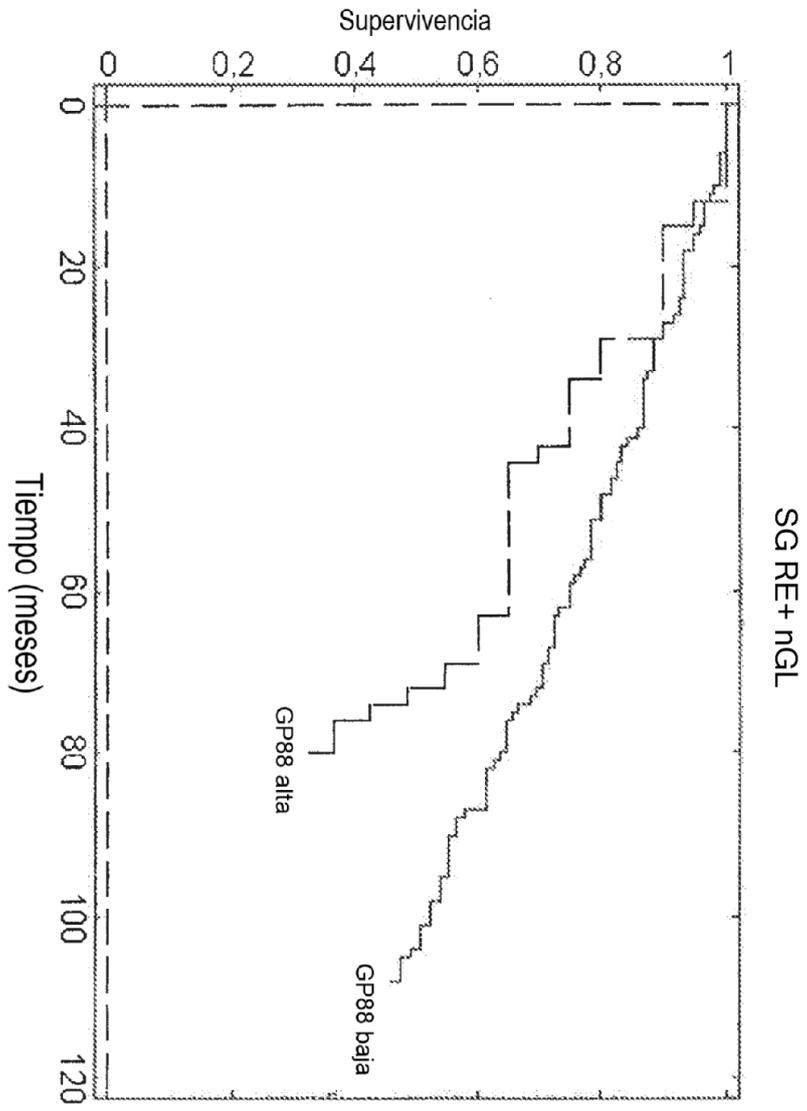


Figura 5

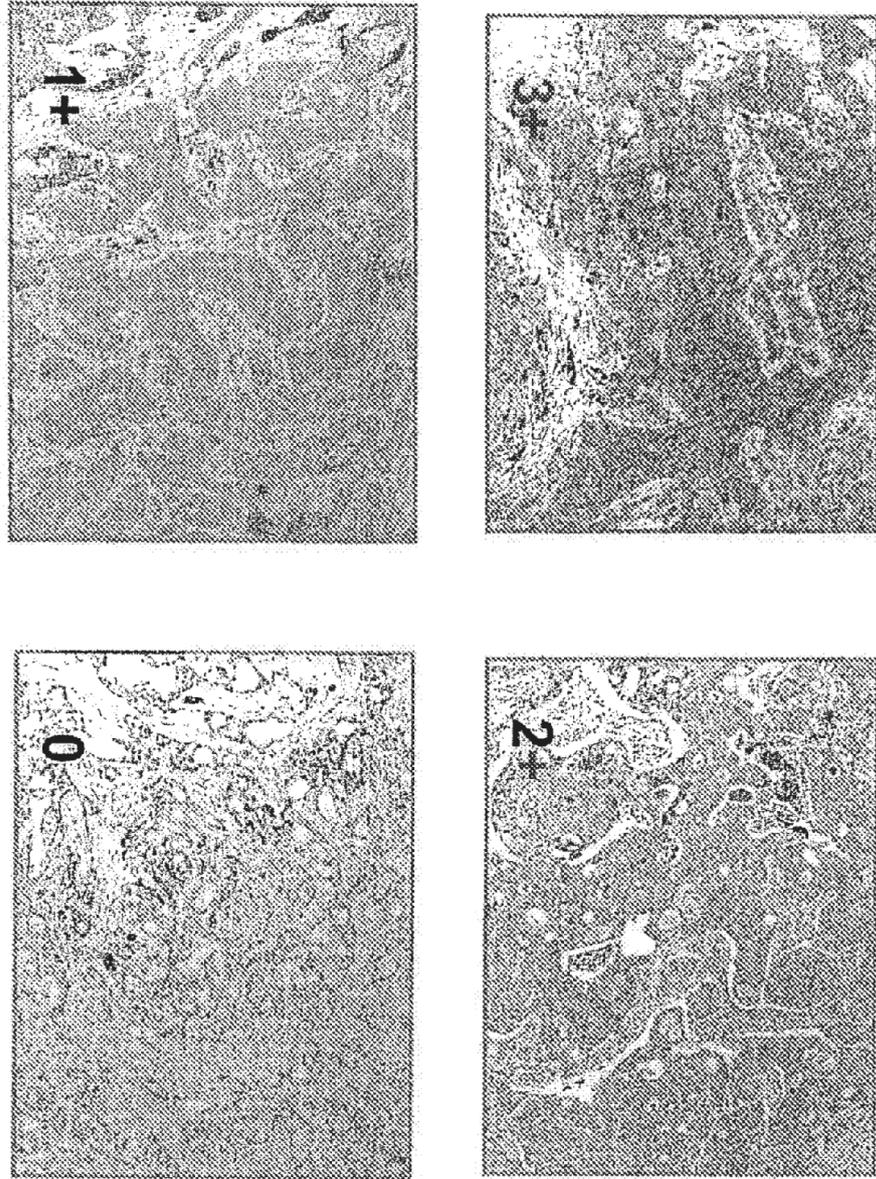


Figura 6

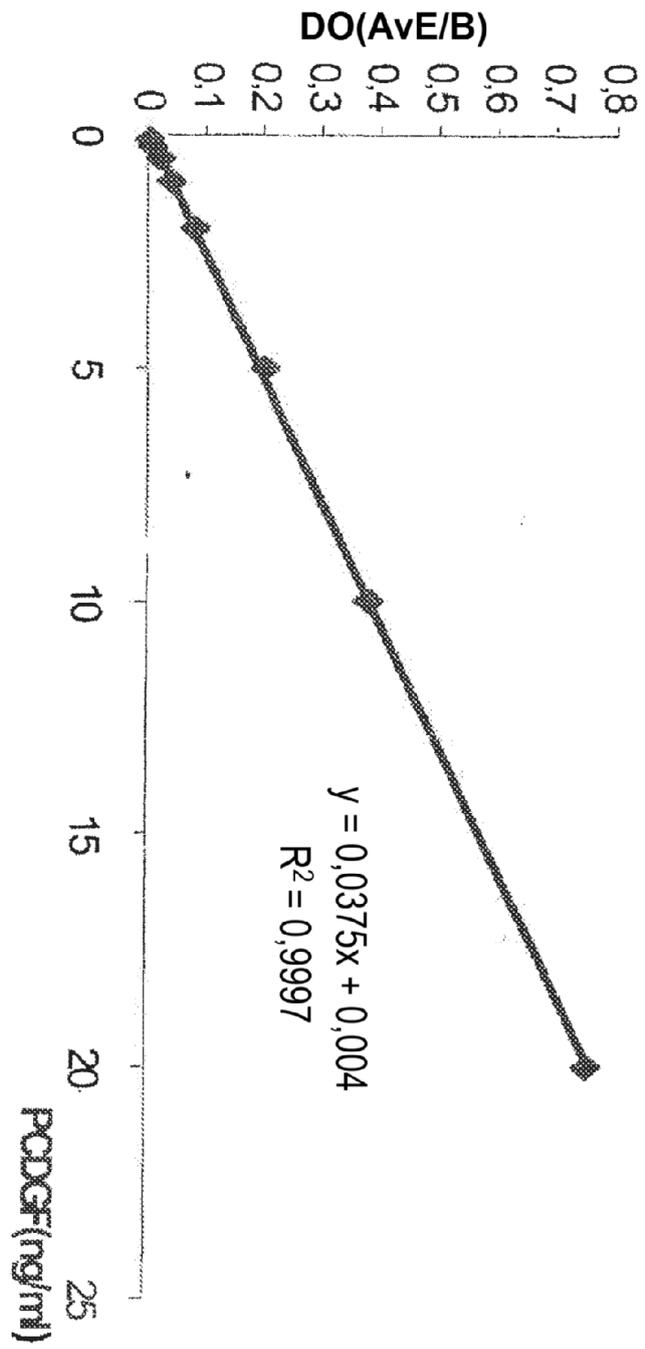


Figura 7

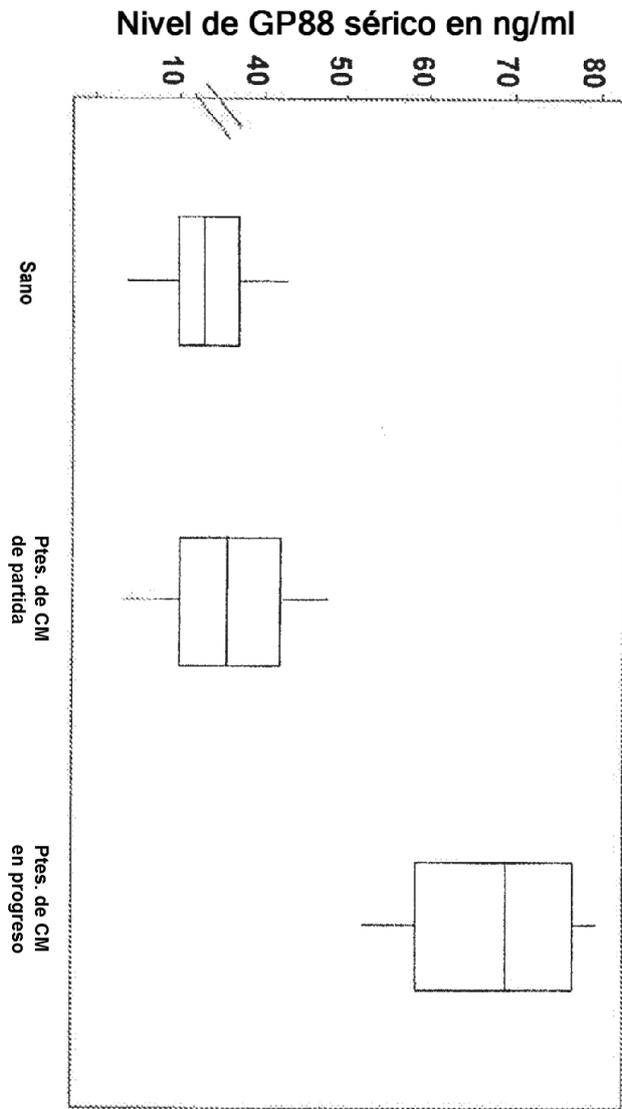


Figura 8

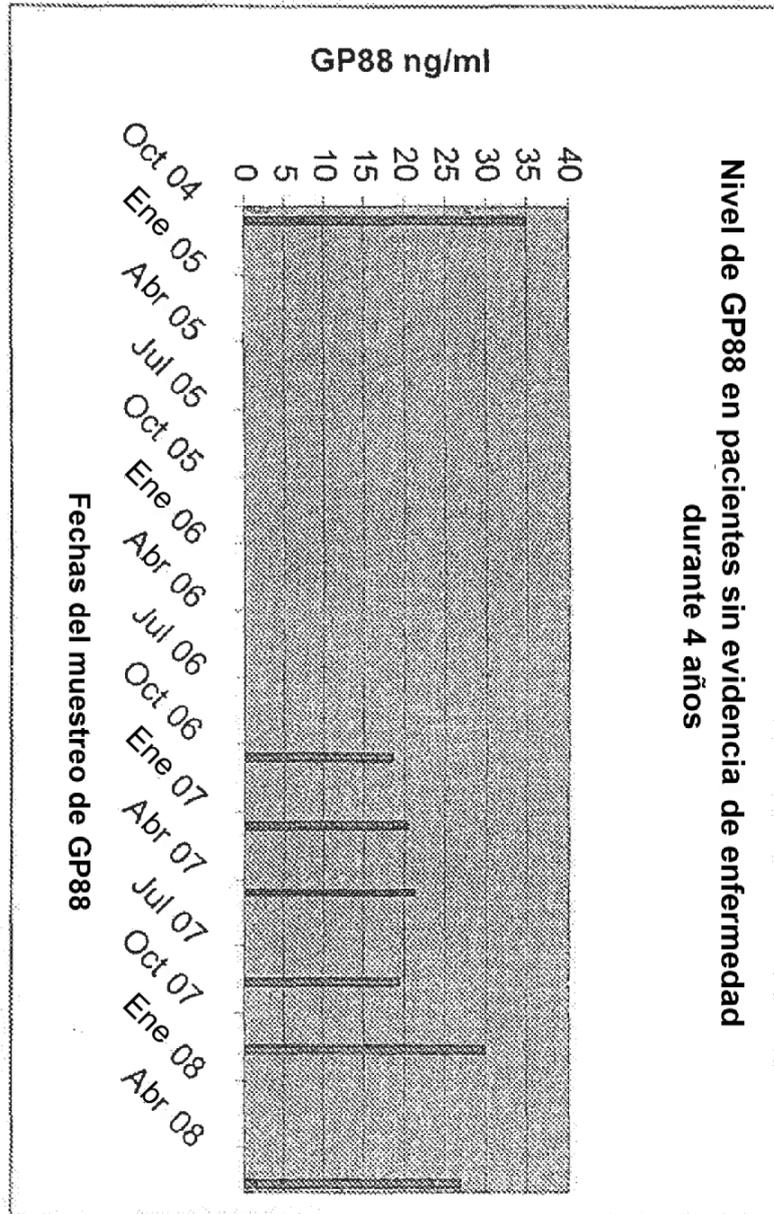


Figura 9

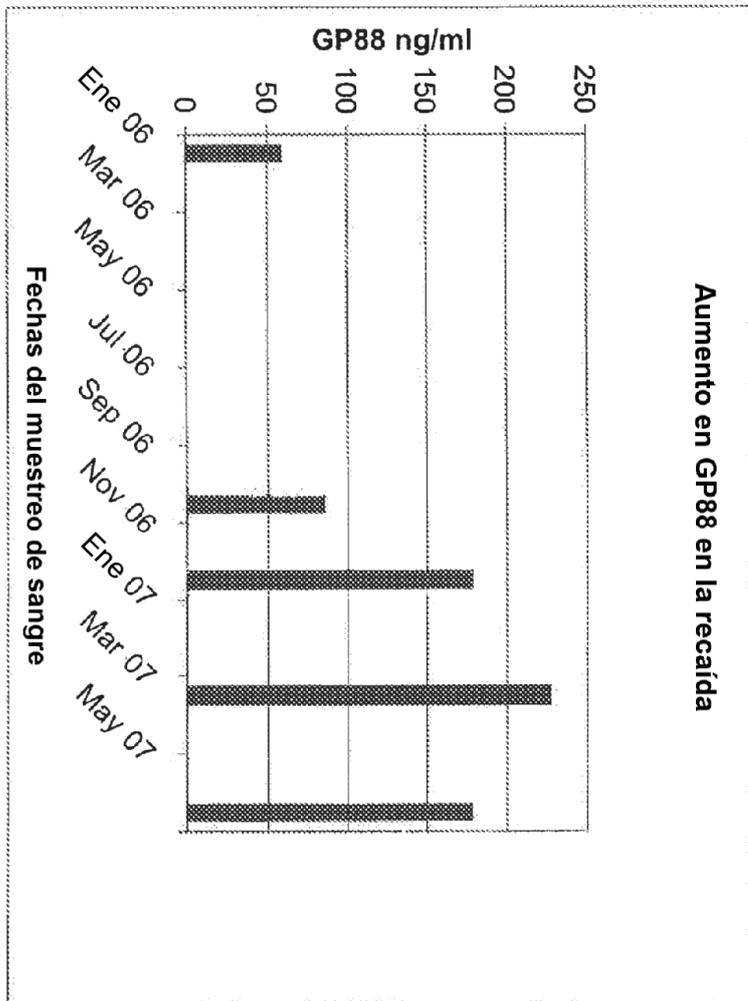


Figura 10

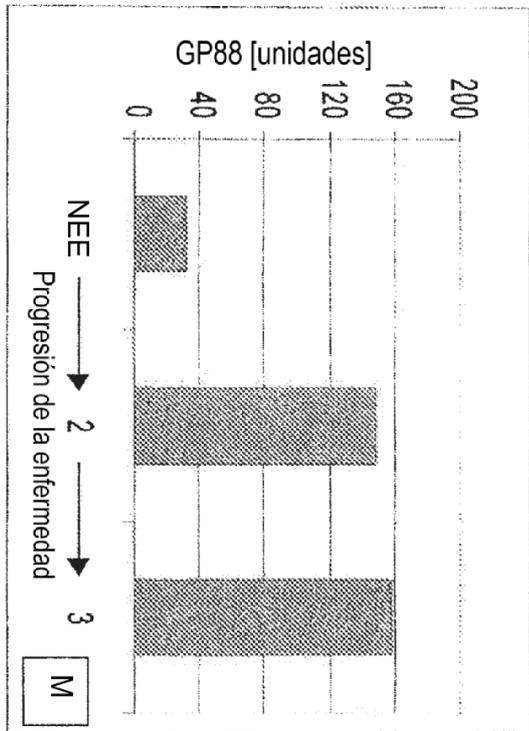


Figura 11A

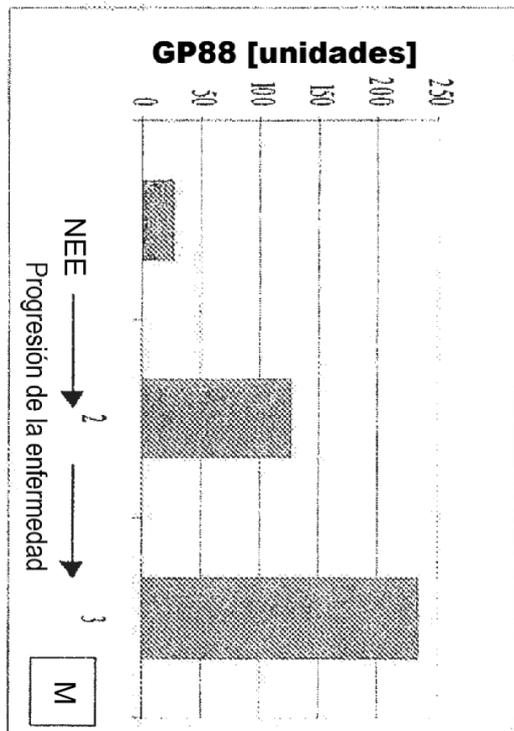


Figura 11B

ES 2 624 261 T3

ADNc de GP88 de ratón

CGG	GGA	CCC	CGA	CGC	AGA	CAG	ACC	ATG	TGG	GTC	CTG	ATG	AGC	TGG	CTG	46
								M	W	V	L	M	S	W	L	8
GCC	TTC	GCG	GCA	GGG	CTG	GTA	GCC	GGA	ACA	CAG	TGT	CCA	GAT	GGG	CAG	94
A	F	A	A	G	L	V	A	G	T	Q	C	P	D	G	Q	24
TTC	TGC	CCT	GTT	GCC	TGC	TGC	CTT	GAC	CAG	GGA	GGA	GCC	AAC	TAC	AGC	142
F	C	P	V	A	C	C	L	D	Q	G	G	A	N	Y	S	40
TGC	TGT	AAC	CCT	CTT	CTG	GAC	ACA	TGG	CCT	AGA	ATA	ACG	AGC	CAT	CAT	190
C	C	N	P	L	L	D	T	W	P	R	I	T	S	H	H	56
CTA	GAT	GGC	TCC	TGC	CAG	ACC	CAT	GGC	CAC	TGT	CCT	GCT	GGC	TAT	TCT	238
L	D	G	S	C	Q	T	H	G	H	C	P	A	G	Y	S	72
TGT	CTT	CTC	ACT	GTG	TCT	GGG	ACT	TCC	AGC	TGC	TGC	CCG	TTC	TCT	AAG	286
C	L	L	T	V	S	G	T	S	S	C	C	P	F	S	K	88
GGT	GTG	TCT	TGT	GGT	GAT	GGC	TAC	CAC	TGC	TGC	CCC	CAG	GGC	TTC	CAC	334
G	V	S	C	G	D	G	Y	H	C	C	P	Q	G	F	H	104
TGT	AGT	GCA	GAT	GGG	AAA	TCC	TGC	TTC	CAG	ATG	TCA	GAT	AAC	CCC	TTG	382
C	S	A	D	G	K	S	C	F	Q	M	S	D	N	P	L	120
GGT	GCT	GTC	CAG	TGT	CCT	GGG	AGC	CAG	TTT	GAA	TGT	CCT	GAC	TCT	GCC	430
G	A	V	Q	C	P	G	S	Q	F	E	C	P	D	S	A	136
ACC	TGC	TGC	ATT	ATG	GTT	GAT	GGT	TCG	TGG	GGA	TGT	TGT	CCC	ATG	CCC	478
T	C	C	I	M	V	D	G	S	W	G	C	C	P	M	P	152
CAG	GCC	TCT	TGC	TGT	GAA	GAC	AGA	GTG	CAT	TGC	TGT	CCC	CAT	GGG	GCC	526
Q	A	S	C	C	E	D	R	V	H	C	C	P	H	G	A	168
TCC	TGT	GAC	CTG	GTT	CAC	ACA	CGA	TGC	GTT	TCA	CCC	ACG	GGC	ACC	CAC	574
S	C	D	L	V	H	T	R	C	V	S	P	T	G	T	H	184
ACC	CTA	CTA	AAG	AAG	TTC	CCT	GCA	CAA	AAG	ACC	AAC	AGG	GCA	GTG	TCT	622
T	L	L	K	K	F	P	A	Q	K	T	N	R	A	V	S	200
TTG	CCT	TTT	TCT	GTC	GTG	TGC	CCT	GAT	GCT	AAG	ACC	CAG	TGT	CCC	GAT	670
L	P	F	S	V	V	C	P	D	A	K	T	Q	C	P	D	216

Figura 12A

ES 2 624 261 T3

ADNc de GP88 de ratón (continuación)

GAT TCT ACC TGC TGT GAG CTA CCC ACT GGG AAG TAT GGC TGC TGT CCA	718
D S T C C E L P T G K Y G C C P	232
ATG CCC AAT GCC ATC TGC TGT TCC GAC CAC CTG CAC TGC TGC CCC CAG	766
M P N A I C C S D H L H C C P Q	248
GAC ACT GTA TGT GAC CTG ATC CAG AGT AAG TGC CTA TCC AAG AAC TAC	814
D T V C D L I Q S K C L S K N Y	264
ACC ACG GAT CTC CTG ACC AAG CTG CCT GGA TAC CCA GTG AAG GAG GTG	862
T T D L L T K L P G Y P V K E V	280
AAG TGC GAC ATG GAG GTG AGC TGC CCT GAA GGA TAT ACC TGC TGC CGC	910
K C D M E V S C P E G Y T C C R	296
CTC AAC ACT GGG GCC TGG GGC TGC TGT CCA TTT GCC AAG GCC GTG TGT	958
L N T G A W G C C P F A K A V C	312
TGT GAG GAT CAC ATT CAT TGC TGC CCG GCA GGG TTT CAG TGT CAC ACA	1006
C E D H I H C C P A G F Q C H T	328
GAG AAA GGA ACC TGC GAA ATG GGT ATC CTC CAA GTA CCC TGG ATG AAG	1054
E K G T C E X G I L Q V P W M <u>K</u>	344
AAG GTC ATA GCC CCC CTC CGC CTG CCA GAC CCA CAG ATC TTG AAG AGT	1102
<u>K V I A P L R L P D P Q I L K S</u>	360
GAT ACA CCT TGT GAT GAC TTC ACT AGG TGT CCT ACA AAC AAT ACC TGC	1150
<u>D T</u> P C D D F T R C P T N N T C	376
TGC AAA CTC AAT TCT GGG GAC TGG GGC TGC TGT CCC ATC CCA GAG GCT	1198
C K L N S G D W G C C P I P E A	392
GTC TGC TGC TCA GAC AAC CAG CAT TGC TGC CCT CAG GGC TTC ACA TGT	1246
V C C S D N Q H C C P Q G F T C	408
CTG GCT CAG GGG TAC TGT CAG AAG GGA GAC ACA ATG GTG GCT GGC CTG	1294
L A Q G Y C Q K G D T M V A G L	424
GAG AAG ATA CCT GCC CGC CAG ACA ACC CCG CTC CAA ATT GGA GAT ATC	1342
E K I P A R Q T T P L Q I G D I	440

Figura 12B

ES 2 624 261 T3

ADNc de GP88 de ratón (continuación)

GGT TGT GAC CAG CAT ACC AGC TGC CCA GTA GGG CAA ACC TGC TGC CCA	1390
G C D Q H T S C P V G Q T C C P	456
AGC CTC AAG GGA AGT TGG GCC TGC TGC CAG CTG CCC CAT GCT GTG TGC	1438
S L K G S W A C C Q L P H A V C	472
TGT GAG GAC CGG CAG CAC TGT TGC CCG GCC GGG TAC ACC TGC AAC GTG	1486
C E D R Q H C C P A G Y T C N V	488
AAG GCG AGG ACC TGT GAG AAG GAT GTC GAT TTT ATC CAG CCT CCC GTG	1534
K A R T C E K D V D F I Q P P V	504
CTC CTG ACC CTC GGC CCT AAG GTT GGG AAT GTG GAG TGT GGA GAA GGG	1582
L L T L G P K V G N V E C G E G	520
CAT TTC TGC CAT GAT AAC CAG ACC TGT TGT AAA GAC AGT GCA GGA GTC	1630
H F C H D N Q T C C K D S A G V	536
TGG GCC TGC TGT CCC TAC CTA AAG GGT GTC TGC TGT AGA GAT GGA CGT	1678
W A C C P Y L K G V C C R D G R	552
CAC TGT TGC CCC GGT GGC TTC CAC TGT TCA GCC AGG GGA ACC AAG TGT	1726
H C C P G G F H C <u>S A R G T K C</u>	568
TTG CGA AAG AAG ATT CCT CGC TGG GAC ATG TTT TTG AGG GAT CCG GTC	1774
<u>L R K K I P R</u> W D M F L R D P V	584
CCA ACA CCG CTA CTG TAA GGA AGG GCT ACA GAC TTA AGG AAC TCC ACA	1822
P R P L L *	589
GTC CTG GGA ACC CTG TTC CGA GGG TAC CCA CTA CTC AGG CCT CCC TAG	1870
CGC CTC CTC CCC TAA CGT CTC CCC GGC CTA CTC ATC CTG AGT CAC CCT	1918
ATC ACC ATG GGA GGT GGA GCC TCA AAC TAA AAC CTT CTT TTA TGG AAA	1956
GAA GGC TGT GGC CAA AAG CCC CGT ATC AAA CTG CCA TTT CTT CCG GTT	2014
TCT GTG GAC CTT GTG GCC AGG TGC TCT TCC CGA GCC ACA GGT GTT CTG	2062
TGA GCT TGC TTG TGT GTG TGT GCG CGT GTG CGT GTG TTG CTC <u>CAA TAA</u>	2110
<u>AGT</u> TTG TAC GCT TTC TGA AAA AAA AAA	2137

Figura 12C

Secuencia de nucleótidos del precursor de granulina/epitelina humana (GP88 humana).

Granulina humana Genbank M75161\$

```

[CGCAGGCAGA CcAtgtggac cTtggTgagc Tgggtggcct taacagcagg gctggTggct
ggaacgcggt gcccagatgg tcagttctgc cctgtggcct gctgcctgga ccccggagga
gccagctaca gctgctgccg tcccttctg gacaaatggc ccacaacact gagcaggcat
ctgggtggcc cctgccaggt tgatgcccac tgctctgccg gccactcctg catctttacc
gtctcagggg cttccagttg ctgccccttc ccagaggccg tggcatgegg ggatggccat
cactgctgcc cacggggcct ccactgcagt gcagacggga gatcctgctt ccaaagatca
ggtaacaact cctggggTgc catccagTgc cctgatagtc agttogaatg cccggacttc
tccacgtgct gtgttatggt cgtatggctc tggggTgct gcccctgccc ccaggcttcc
tgctgtgaag acagggTgca ctgtgtccg caeggtgctt tctgagacct ggttcacacc
cgctgcatca caccacggg caccaccccc ctggcaaaaga agctccctgc ccagaggact
aacagggcag tggcctTgtc cagctcggtc atgtgtccgg acgcacggtc ccggtgcccc
gatggTtcta cctgctgtga gctgcccagt gggaaTatg gctgtgtccc aatgccccac
gccacctgct gctccgatca cctgcactgc tgccccaaag aactgtgtg tgacctgatc
cagagtaagt gctcttcaa ggagaacgt accacggacc tctcactaa gctgctgcg
cacacagTgg gcgatgtgaa atgtgacatg gaggtgagct gccagatgg ctatacctgc
tgccgtctac agtcgggggc ctggggetgc tgccctttta cccaggctgt gtgtgtgag
gaccacatac actgctgtcc cgcggggTt acgtgtgaca cgcagaaggg tacctgtgaa
caggggcccc accaggtgcc ctggatggag aaggccccag ctacctcag cctgccagac
ccacaagcct tgaagagaga tgtcccctgt gataatgtca gcagctgtcc ctctccgat
acctgctgcc aactcacgTc tggggagtgg ggctgctgtc caateccaga ggtgtctgc
tgctcggacc accagcactg ctgccccag cgatacacgt gtgtagtga ggggcagtgt
cagcagggaa gcgagatcgt ggctggactg gagaagatgc ctgcccgccg cggTtctta
tcccacccca gagacatcgg ctgtgaccag cacaccagct gcccggtgg cggaacctgc
tgcccagacc agggTgggag ctgggctgc tgccagttgc cccatgctgt gtgtgagag
gatcggccagc actgctgccc ggctggctac acctgcaacg tgaaggctcg atcctgagag
aaggaagtgg tctctgccc gctgcccacc tctctggccc gtagccctea cgtgggtgtg
aaggacgtgg agtgtgggga aggacacttc tgccatgata accagacctg ctgccgagac
aacggacagg gctgggctg ctgtccctac gccagggcg tctgtTgtgc tgatcggcgc
cactgctgtc ctgctggctt ccgctgcgca cgcaggggta ccaagtTtt gcgcagggag
gcccgcgct gggacgcccc tttgagggac ccagccttga gacagctgct gtgagggaca
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggaccc cactcggagg gtgcccctctg ctcaggcctc
gtactgaaga ctctgcagcc ctcgggaccc cactcggagg gtgcccctctg ctcaggcctc
cctagcacct ccccctaacc aaattctccc tggaccccat tctgagctcc ccatcaccat
gggaggtggg gccTcaatct aaggcccttc cctgtcagaa gggggTtgag gcaaaagccc
attacaagct gccateccct ccccgTtca gtggacctg tggccaggTg ctttcceta
tccacagggg tgtttgtgtg ttgggtgtgc ttcaataaa gttgtcact ttctt*

```

Figura 13A

Secuencia de aminoácidos del precursor de granulina/epitelina humana (GP88 humana).

MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRP
LLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRG
FHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSWGCCPMPQASCCED
RVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVHCPDARSRCPDG
STCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTYLPA
HTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGT
CEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPAALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPFP
EAVCCSDHQHCCPQRYTCVAEGCCQRGSEIVAGLEKMPARRGSLSHPRDIGCQHTSC
PVGGTCCPSQGGSWACCQLPHAVCCEDROHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL
ARSPHVGKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYAQGVCCADRRHCCPAGFRCA
RRGKCLRRREAPRWDAPLRDPALRQLL*

Figura 13B

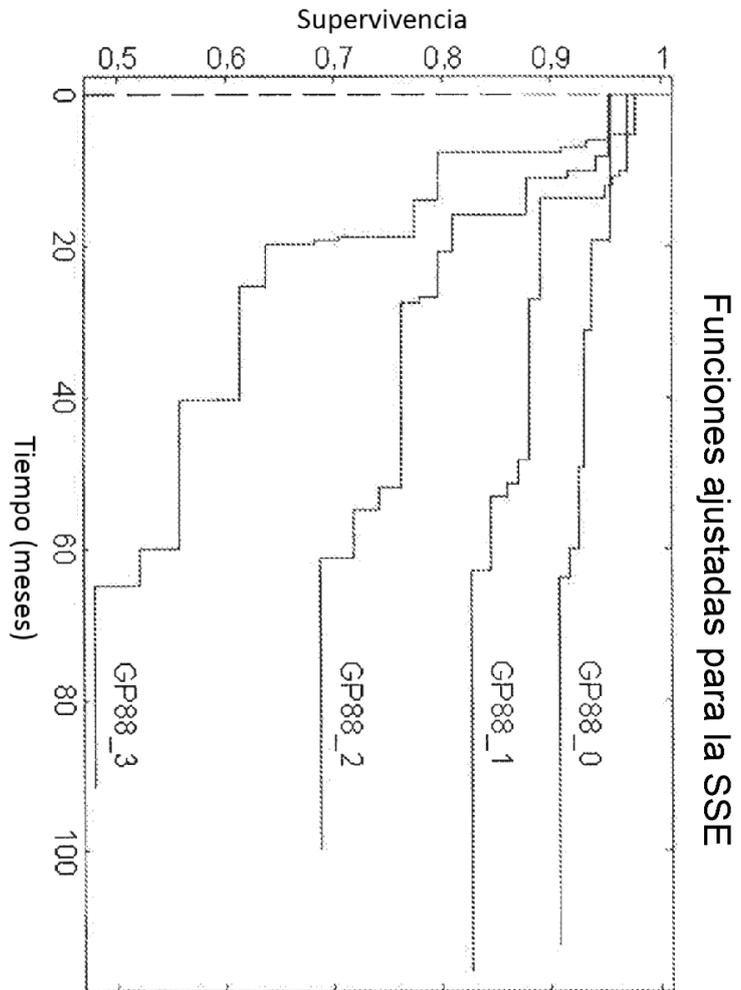


Figura 14

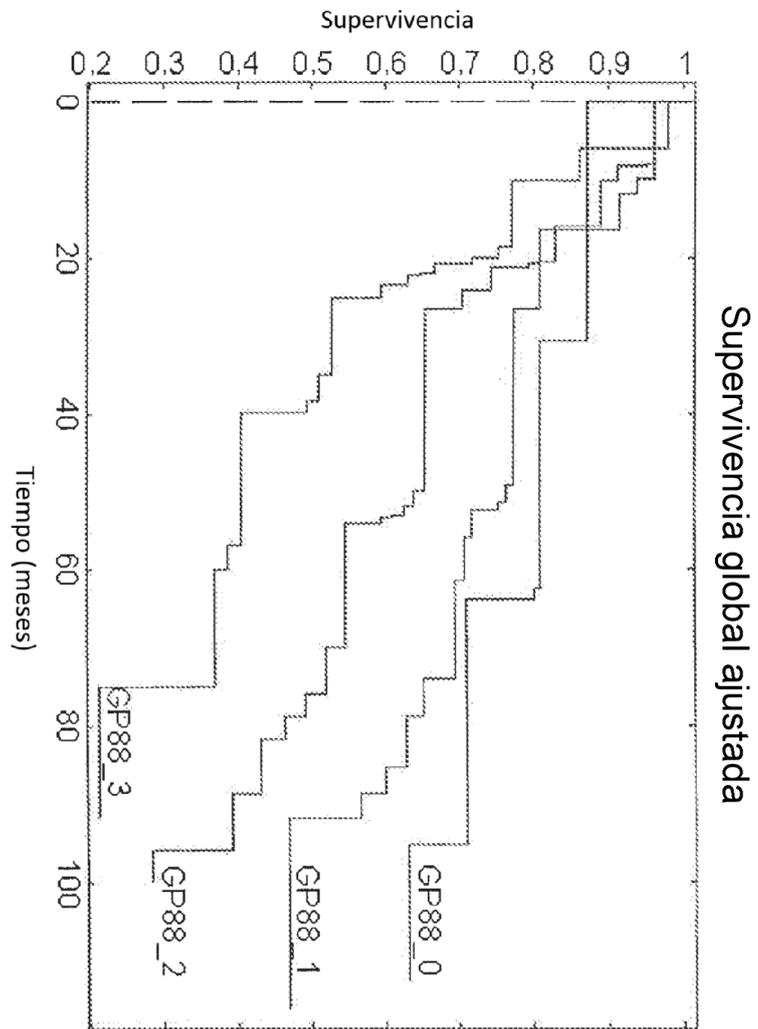


Figura 15