

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 896**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/EP2013/072459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064283**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13783073 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2912465**

54 Título: **Metilglioxal como marcador de cáncer**

30 Prioridad:

**25.10.2012 WO PCT/EP2012/071163**

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

**28.02.2018**

73 Titular/es:

**ASSOCIATION POUR LA RECHERCHE  
THÉRAPEUTIQUE ANTI-CANCÉREUSE (100.0%)  
57 à 59, rue de la Convention  
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BELPOMME, DOMINIQUE y  
IRIGARAY, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 656 896 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

Metilglixal como marcador de cáncer

La presente divulgación desvela un ensayo de diagnóstico y pronóstico de cáncer en sujetos humanos o animales nuevo, fiable, sensible y fácil de manejar. Los presentes inventores han demostrado por primera vez en el presente documento que los elevados niveles de metilglixal (MG) en muestras biológicas de sujetos con cáncer se correlacionan de manera altamente positiva con el desarrollo y la progresión de células cancerosas que son metabólicamente activas. Esto resalta que las células cancerosas producen y liberan cantidades significativamente superiores de MG que las células normales en el tumor así como fluidos extracelulares en el organismo, y por lo tanto es posible obtener un ensayo de diagnóstico y pronóstico de cáncer fiable y sensible a partir de una única muestra de sangre. La presente invención, por lo tanto, se refiere a un procedimiento *in vitro* para la detección y el diagnóstico temprano de cáncer midiendo la presencia de MG.

**Antecedentes de la invención**

Con el número en aumento de casos de cáncer que se están diagnosticando a nivel mundial y el persistente elevado número de muertes debido al descubrimiento tardío de la enfermedad, la identificación de nuevos biomarcadores para la detección temprana y las intervenciones terapéuticas dirigidas se acepta ampliamente como crucial, tanto para la prevención de cáncer como para unos mejores resultados en pacientes tratados de cáncer. El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, siendo los cánceres de pulmón, de colon, de mama (en mujeres), de páncreas y de próstata (en hombres) los más comunes.

Actualmente, los indicadores de diagnóstico y pronóstico de cáncer más usados se basan en las características morfológicas e histológicas de los tumores, ya que no hay biomarcadores de sangre disponibles con suficiente sensibilidad y especificidad para el diagnóstico; y solo existen unos pocos biomarcadores para el control terapéutico y la evaluación del pronóstico de cáncer.

La Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos ha definido un biomarcador como una característica molecular que se puede medir y evaluar de manera objetiva y que indica procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. Tales biomarcadores se podrían producir bien por el propio tumor o por el cuerpo en respuesta a la presión maligna hacia las células normales, volviéndolas cancerosas. De acuerdo con el National Cancer Institute (NCI) de los Estados Unidos, los biomarcadores se podrían usar para la detección sistemática del cáncer, la evaluación del riesgo, el diagnóstico temprano de la enfermedad, el control, la evaluación del pronóstico, la toma de decisiones terapéuticas y la predicción de la respuesta a la terapia.

Sin embargo, un desafío importante en el aprovechamiento de este potencial de los biomarcadores oncológicos es que el comienzo y la propagación del cáncer y la progresión tumoral son procesos complejos que implican diversos eventos moleculares genéticos y epigenéticos e interacciones celulares anómalas.

La transformación maligna lleva a cambios distintivos de las células específicos y no específicos del fenotipo, por lo tanto, a la selección clonal y a la progresión de células cancerosas en el organismo. Además, el cáncer puede ser resultado de la exposición a múltiples y diversos agentes carcinogénicos ambientales, tales como compuestos químicos, radiación y/o microorganismos; especialmente en hospedadores genéticamente susceptibles (Belpomme y col., Environ Res 2007; Irigaray y Belpomme, Carcinogenesis 2010).

Como consecuencia de tal complejidad de los procesos carcinogénicos, los tumores varían ampliamente en su etología y patogénesis, de manera que el cáncer consiste en más de 200 enfermedades distintas que afectan a más de 60 órganos humanos. Esta complejidad es también la razón por la cual, aunque muchos bioensayos han buscado correlaciones entre los criterios de valoración oncológicos clínicos y los marcadores biológicos, aún hay muy pocos biomarcadores clínicamente útiles para ayudar a los oncólogos en la toma de decisiones y en la atención al paciente y - críticamente - no hay un biomarcador único disponible que pueda detectar todos o incluso muchos tipos de cáncer. La presente invención soluciona muchas de estas limitaciones, proporcionando un nuevo biomarcador único que permite la detección de muchos tipos de cáncer, a través de una medida simple en las muestras biológicas del paciente / sujeto. Esta medida es muy reproducible; para detectar cáncer, incluso en etapa temprana.

BISWAS y col., BIOMEDICAL RESEARCH, vol. 22, n.º 3, 1 de enero de 2011 página 273, desvela que se descubrió que el nivel sérico de MG era significativamente en lesiones premalignas orales y estaba significativamente disminuido en pacientes con neoplasias malignas.

TOSHIKI MATSUURA y col., CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN vol. 34, n.º.7, 1 de enero de 1986, páginas 2926-2930, desvela que, en ratones, la proliferación inicial de células tumorales está acompañada por un descenso de MG y un desarrollo adicional de las células tumorales da como resultado un aumento del nivel de MG.

ANTOGNELLI CINZA y col., CANCER JOURNAL vol. 12, n.º.3, páginas 222-228, desvela un descenso significativo en las concentraciones de MG en los tejidos cancerosos.

Básicamente, la presente invención consiste en medir el nivel de producción del subproducto metabólico metilglixal

(MG), detectando y cuantificando la cantidad de esta molécula en una muestra biológica de un sujeto.

La *Figura 1* es un diagrama esquemático que muestra el proceso metabólico de glucólisis y la formación de metilglioxal (MG) en células eucariotas.

5 La vía glucolítica completa para la energía es anaeróbica (no usa oxígeno). Las células normales en condiciones aerobias entran en el ciclo de Krebs de los ácidos tricarbónicos (ATC) para producir adenosín trifosfato (ATP); mientras que aún en condiciones aeróbicas, el efecto Warburg lleva a muchas células cancerosas, en lugar de entrar en el ciclo de Krebs de los ATC, para aumentar la glucólisis (es decir, "glucólisis aeróbica"). Durante el proceso de glucólisis, la vía de MG se salta la vía glucolítica clásica de Embden-Meyerhof-Parnas y es un callejón sin salida metabólico; en consecuencia, esta vía lleva a la formación de MG y D-lactato como productos  
10 residuales/subproductos mientras que la vía de Embden-Meyerhof-Parnas lleva bien a la formación de piruvato entonces para el ciclo de Krebs de los ATC en condiciones aeróbicas o a la formación de L-lactato a partir de piruvato en condiciones anaeróbicas. Cualquier deficiencia en el ciclo de Krebs de los ATC o en la cadena respiratoria, como es el caso de muchas células cancerosas, aumenta la glucólisis para compensar la producción de ATP y, en consecuencia, la formación de MG mediante una formación aumentada de dihidroxiacetona fosfato.

15 La *Figura 1 bis* muestra la producción de MG en el medio de cultivo de una línea celular de carcinoma humano (HCT16) en función de la presencia de bien una baja o una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo. La cuantificación de MG en el medio acondicionado (MA) se hizo usando el análisis de espectrometría de masas en tándem acoplada a la cromatografía de líquidos (LC-MS/MS). En condiciones de elevada glucosa, las células cancerosas producen MG 10 veces superior que en condiciones de baja glucosa, un hallazgo que sugiere que la  
20 síntesis y liberación de MG por células cancerosas depende directamente del consumo de glucosa y del metabolismo.

La *Figura 2* muestra la producción de MG en un clon de células malignas PRO mediante el uso de análisis directo de tejidos usando la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Los clones de células PRO se obtuvieron inicialmente de un adenocarcinoma de colon inducido mediante la administración de 1,2-dimetilhidrazina. El tumor se representa sin coloración y tras la coloración con hematoxilina-Eosina-Safran (HES) en los escaneos 1 y 2, respectivamente. La  
25 detección intratumoral de MG mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, se representa en los escaneos 3 y 4, obtenidos respectivamente de los análisis de fragmentos moleculares de 2MQX de 91 Da y 118 Da. Nótese que en la zona necrótica que predomina en la mitad y en la parte inferior del tumor en 1 y 2, el MG en 3 y 4 parece que se detecta menos, mientras que parece que se detecta principalmente en algunas zonas altamente coloreadas con HES.  
30

La *Figura 3* muestra la correlación significativamente positiva entre los niveles de MG en sangre y las etapas tumorales en pacientes con cáncer. Cualquiera que sea la etapa del cáncer, la mayoría de los valores de nivel de MG en sangre están por encima del valor de control normal (no canceroso) de 0,06  $\mu\text{M}$  de MG ( $p=0,0109$ ),  
35 demostrando que la medida sistemática de MG en la sangre es una herramienta eficaz para diagnosticar cáncer; permitiendo de manera crítica la detección y la determinación sistemática temprana de manera fácil.

La *Figura 4* muestra la diferencia ( $p < 0,01$ ) de la proporción de MG en sangre frente a glucosa en sangre (índice MG/G) entre pacientes de cáncer y controles (bien sujetos normales o normoglucémicos (tratados) de diabetes de tipo 2). Nótese que no hay diferencia significativa para los niveles de MG en sangre entre los controles normales y los sujetos normoglucémicos tratados por diabetes de tipo 2.

40 La *Figura 5* desvela la correlación positiva significativa entre los niveles de MG en sangre y el volumen tumoral en ratas BD-IX desarrollado tras el trasplante de células de cáncer de colon tumorigénicas PRO ( $p < 0,001$ ). Los clones de células PRO y REG provenían inicialmente de un único adenocarcinoma de colon inducido por 1,2-dimetilhidrazina en rata BD-IX.

45 La *Figura 6* muestra que cuando se inyecta por vía subcutánea en el hospedador singénico, las células PRO inducen tumores progresivos como las células parentales, mientras que las células REG inducen tumores que disminuyen tras 3 semanas. El injerto tumoral de células PRO se asocia con una progresión constante del volumen tumoral, por lo que se nota la correlación positiva entre los niveles de MG en sangre y el volumen tumoral; tres semanas tras el trasplante hay una progresión constante de los niveles de MG en sangre. El injerto tumoral de las células cancerosas REG se rechaza 3 semanas después del trasplante y el MG en la sangre permanece a un bajo nivel durante todo el  
50 período experimental. Comparando los resultados obtenidos con el clon de células cancerosas tumorigénicas PRO (Fig 5), esto sugiere que el cáncer que progresa de manera activa y más en particular, las células cancerosas tumorigénicas proliferativas sintetizan grandes cantidades de MG; mientras que el cáncer no progresivo, más en particular las células cancerosas no tumorigénicas y no proliferativas, no pueden.

55 La *Figura 7* muestra que en pacientes de cáncer (B), los niveles de MG en sangre se correlacionan inversamente de manera significativa con el índice de masa corporal (IMC) ( $p=0,0064$ ); mientras que no hay correlación del MG con el IMC en sujetos normales (A). Esto indica que el MG se produce por las células cancerosas.

La *Figura 8* muestra que en pacientes de cáncer hay una relación inversa de manera significativa entre el índice de la proporción de insulina/glucosa (I/G) y los niveles de MG en sangre, mientras que el índice I/G en sujetos normales

sanos permanece constante. En consecuencia, la intersección de las 2 curvas permite la individualización de un punto crítico al cual el nivel de MG en sangre de 0,2  $\mu\text{M}$  se denomina como el "valor de control asociado con la caquexia" por encima del cual, la resistencia a la insulina es superior y la secreción de insulina es inferior que en los sujetos normales; de manera que el paciente de cáncer está entrando en caquexia o en precaquexia grave.

5 La *Tabla 1* muestra los valores medios del nivel de MG en sangre ( $\pm$  los errores estándar y los intervalos de confianza) (en  $\mu\text{M}$ ) en pacientes de cáncer, en comparación con sujetos normales y pacientes normoglucémicos tratados por diabetes de tipo 2 usados como controles.

10 La *Tabla 2* muestra los valores medios del nivel de MG en sangre ( $\pm$  los errores estándar y los intervalos de confianza) (en  $\mu\text{M}$ ) en pacientes de cáncer de acuerdo con los tipos de tumor en comparación con sujetos normales y normoglucémicos tratados por diabetes de tipo 2 usados como control.

15 La *Tabla 3* desvela los valores medios ( $\pm$  los errores estándar) de los niveles de MG en sangre (en  $\mu\text{M}$ ) en pacientes de cáncer tratados de acuerdo con las respuestas clínicas; es decir, respuesta completa, respuesta parcial o enfermedad estable/progresiva, tal como se determina mediante la medida directa clínica del tumor usando técnicas de obtención de imágenes. En dos pacientes con una respuesta clínica aparentemente completa tal como se determina mediante técnicas clásicas de obtención de imágenes, los niveles de MG en sangre estaban por encima de los valores normales. Estos dos pacientes, tuvieron una recaída de cáncer a los 3 y 7 meses más tarde.

20 La *Tabla 4* desvela los valores medios ( $\pm$  los errores estándar) de los niveles de MG en sangre (en  $\mu\text{M}$ ) en diferentes pacientes de cáncer de acuerdo con su IMC. La distinción entre las tres categorías de IMC es altamente y estadísticamente significativa y los estados precaquético o caquético ( $\text{IMC} < 18$ ) se asocian con niveles significativamente superiores de MG en sangre en comparación con los pacientes de cáncer con sobrepeso / obesidad ( $\text{IMC} > 25$ ).

25 Muestras biológicas: Tal como se usa en el presente documento, la expresión "muestras biológicas" se refiere a una variedad de tipos de muestras obtenidas de los pacientes o de individuos normales, para su uso en un ensayo de control de diagnóstico. Dichas muestras biológicas abarcan cualquier fluido extracelular tal como sangre, suero, plasma, orina u otras muestras de líquidos tales como saliva, líquido peritoneal o pleural, líquido cefalorraquídeo, líquido gástrico o colorrectal, líquido linfático, líquido sinovial, líquido intersticial, líquido amniótico, secreciones fisiológicas, lágrimas, mocos, sudor, leche, líquido seminal, secreciones vaginales y líquido de úlceras y otras erupciones superficiales. También pueden ser tejidos sólidos tales como tumores u órganos y frotis celulares obtenidos por ejemplo del cuello uterino, de la médula ósea, de los nódulos linfáticos y similares. La expresión "muestras biológicas" incluye también la matriz extracelular y los fluidos extracelulares que constituyen el compartimento extracelular en el organismo. Incluyen no solo muestras clínicas, sino también cultivos celulares y cultivos tisulares, y células que provienen de los mismos y la progeñe de las mismas.

35 Metilgloxal: En la presente invención, "metilgloxal" se refiere al descubrimiento de que las células cancerosas producen y liberan cantidades significativamente mayores de metilgloxal (MG) de lo que lo hacen las células normales, de manera que el MG se puede medir y cuantificar en tumores y fluidos extracelulares en un organismo, particularmente en la sangre periférica tras la liberación de MG a partir de las células cancerosas. El MG se evidencia en muestras midiendo *in vitro* la parte de MG libre que existe de manera espontánea en el organismo; o midiendo la cantidad total de MG libre que se corresponde con el MG libre que existe de manera espontánea en muestras además del MG que se puede recuperar del MG unido al ligando de manera reversible después de que las muestras se han tratado para mediante el uso de una técnica similar o idéntica a la de Chaplen (Chaplen y col., Anal Biochem 1996; Chaplen y col., PNAS 1998). Tales procedimientos se han desarrollado inicialmente para medir el MG intracelular unido al ligando de manera reversible.

45 Por consiguiente, el MG cuyo nivel se mide por el procedimiento de la invención se corresponde con el nivel de moléculas de MG libres medidas en el tumor o en los fluidos corporales de los individuos, más particularmente en la sangre periférica porque ésta hace el uso clínico del biomarcador muy simple. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, el procedimiento de la invención no se basa exclusivamente en la medida del MG libre que está presente de manera espontánea en un tumor o en el compartimento extracelular en el organismo, sino que también se basa en la medida del MG libre que se recupera tras el tratamiento *in vitro* del MG unido al ligando de manera reversible. Sin embargo, cuando las expresiones "MG", "producción de MG" o "niveles de producción de MG" se usan en el presente documento sin definición adicional, el nivel de MG se corresponde con las moléculas libres que están presentes de manera espontánea en la muestra considerada, y no a la cantidad total de MG libre que se puede recuperar de la muestra, cuya medida sin embargo también se incluye en la invención.

55 La expresión "muestras biológicas" incluye muestras que se han manipulado de alguna forma tras su obtención. Dicha muestra biológica se puede "tratar" antes del análisis de MG, como mediante: la preparación de plasma a partir de la sangre, la eliminación de células de la muestra o el enriquecimiento de la población celular, la dilución de fluidos viscosos o similares. Los procedimientos de tratamiento pueden implicar la filtración, la destilación, la concentración, la desactivación de compuestos que interfieren, la lisis celular; por ejemplo, mediante ultrasonidos, adición de reactivos, fijación de células o fijación de tejido sólido antes del análisis de MG. Los ejemplos de las, así llamadas, muestras tratadas antes del análisis de MG usan técnicas para recuperar el MG intracelular y/o

extracelular unido al ligando de manera reversible (Chapten y col., Anal Biochem 1996; Chaplen y col., PNAS 1998).

Sujetos, individuos, pacientes: Los términos "sujetos" o "individuos" usados en el presente documento se refiere a seres humanos (o animales) de cualquier edad o género, tanto sanos como que padecen la enfermedad; mientras que el término "pacientes" se refiere a sujetos o individuos que tienen la enfermedad, tales como los que tienen cáncer o diabetes.

Las expresiones "sujeto/s sano/s" e "individuo/s sano/s" se refieren a sujetos o individuos asintomáticos de los que se ha demostrado que no padecen ninguna enfermedad detectable usando las pruebas médicas habituales. Más precisamente, estos términos se refieren a personas de las que se ha demostrado que no padecen cáncer, diabetes, insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial ni enfermedad de Alzheimer.

Cáncer o leucemia: Estos términos se refieren a tumores cuyas células presentan un fenotipo maligno anómalo caracterizado por varios rasgos distintivos reconocidos y validados que principalmente incluyen el crecimiento autónomo en el organismo y la pérdida de regulación de la proliferación celular. Estos rasgos distintivos se han revisado y analizado con más precisión recientemente (Hanahan y Weinberg, Cell 2011). Por el contrario, el término "tumor" se refiere a células que pueden presentar un fenotipo maligno o no maligno. La expresión "tumor benigno" se usa para caracterizar tumores cuya capacidad proliferativa permanece limitada dado que las células no albergan un fenotipo maligno.

No hay limitación particular en relación con qué tipos de cánceres se identifican mediante el procedimiento de la presente invención: incluyen cánceres sólidos y no sólidos, que abarcan tanto los tipos epiteliales como los no epiteliales.

Los cánceres de origen epitelial incluyen todos los tipos histológicos tales como adenocarcinoma o carcinoma epidermoide; y todas las localizaciones, por ejemplo, cánceres de cabeza y cuello (es decir, de cavidad oral, lingual, orofaríngeo, faríngeo, laríngeo, etc.), de bronquios y pulmón, de mama, gástrico, colorrectal, de páncreas, hepático (y todos los demás tipos digestivos), de cuello uterino y endometrio uterino, de ovario, urogenital (de próstata, de vejiga, renal); etc. Los cánceres no epiteliales consisten en particular en cualquier tipo de leucemia, linfoma, melanoma o sarcoma.

También se pueden presentar otros cánceres mediante la presente invención, por ejemplo, cáncer testicular, disgerminoma, glioblastoma, astrocitoma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, cánceres infantiles y tumores relacionados con el VIH, entre otros.

Por "detección temprana" de cáncer, se entiende en el presente documento que se refiere a la detección o identificación de un cáncer microscópico (no fácilmente diagnosticable) subclínico ya metabólicamente activo establecido en sujetos asintomáticos.

Por "detección sistemática" de cáncer se entiende que se refiere a la detección sistemática de cáncer metabólicamente activo o de lesiones precancerosas en una población de individuos asintomáticos.

Por "diagnóstico" de cáncer se entiende que se refiere a la detección de un cáncer progresivo ya macroscópico en pacientes sintomáticos. El procedimiento de detección/diagnóstico de la invención, por lo tanto, no se dedica a detectar las, así llamadas, lesiones precancerosas que se pueden evidenciar en biopsias de tejido pero que no necesariamente evolucionan a verdaderos cánceres microscópicos metabólicamente activos. En su lugar, la presente invención detecta de manera fácil y fiable los verdaderos cánceres progresivos y proliferativos. Esto puede tener lugar en sujetos asintomáticos en forma de lesiones microscópicas subclínicas o en sujetos sintomáticos en la forma de lesiones más avanzadas, antes de que se pueda evidenciar mediante las herramientas de diagnóstico clínico habituales disponibles. Dado que los niveles de MG se relacionan con la actividad metabólica de las células cancerosas progresivas, el procedimiento de detección/diagnóstico de la presente invención se puede usar no solo para la detección sistemática de cáncer metabólicamente activo en sujetos asintomáticos, sino también para la progresión de cáncer proliferativo en sujetos sintomáticos y por lo tanto para la estimación en tales sujetos de la probabilidad de que el cáncer evolucione clínicamente; antes de que la progresión del cáncer se evidencie mediante las herramientas clínicas habituales disponibles.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "valores de MG normales de control" o "valores de MG de referencia" se refieren a valores específicos y/o intervalos de valores que se han determinado a partir de sujetos normales sin enfermedad, particularmente, sin cáncer ni diabetes (es decir, donantes sanos). El valor normal de control de  $0,6 \mu\text{M} \pm 0,02$  usado en el presente documento es el valor medio del nivel de producción de MG en muestras de sangre completa de donantes sanos, medido por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) de acuerdo con un procedimiento descrito a continuación. Por lo tanto, en una realización preferida, dicho valor normal de control es el nivel de producción de MG que se ha medido en una muestra biológica (preferentemente una muestra de sangre) de sujetos que no padecen cáncer o diabetes, y que tampoco tienen ninguna otra enfermedad. La referencia puede ser un único valor global, tal como la media o la mediana del valor, o pueden ser diferentes valores para subpoblaciones específicas de sujetos. Un experto en la materia apreciará que la relación entre el nivel de producción de MG en la muestra de ensayo y el valor de MG de control puede depender del tipo de valor de control que se use.

El procedimiento de la invención capacita a los profesionales médicos y biomédicos para determinar si un sujeto sin diabetes tiene un alto o un bajo riesgo de tener un cáncer. Esta probabilidad de cáncer se estima que es proporcional al nivel de producción de MG en los sujetos examinados para valores por encima del valor normal de control.

5 Se dice que un sujeto sin diabetes tiene un "alto riesgo de tener un cáncer", cuando el nivel de producción de MG en dicha muestra biológica es mayor que dicho valor normal de control: eso significa que el sujeto tiene un alto riesgo de tener un cáncer en el momento de la recogida de la muestra biológica aunque el cáncer pueda o no ser detectable aún mediante las herramientas de diagnóstico habituales disponibles. En otras palabras, se considera que el sujeto tiene una mayor probabilidad de tener un cáncer en comparación con la población normal cuando el  
10 nivel de producción de MG en el sujeto examinado está por encima del valor de MG normal de control. Más precisamente en el ámbito de la invención, se dice que un sujeto tiene "un alto riesgo de tener un cáncer" cuando él/ella tiene una probabilidad mayor del 50 %, preferentemente el 70 %, mejor el 90 %, idealmente el 95 %, de tener un cáncer.

15 Por el contrario, el riesgo de tener un cáncer es bajo cuando el nivel de producción de MG en la muestra biológica de los sujetos examinados está dentro del intervalo de valores normales de control y *a fortiori* cuando el nivel de producción de MG está por debajo del límite inferior del intervalo de valores normales de control. Esto significa que el sujeto tiene una baja probabilidad de tener un cáncer o no está desarrollando un cáncer en el momento de la recogida de la muestra biológica.

20 En el ámbito de la invención, el sujeto tiene un bajo riesgo de tener un cáncer cuando él/ella tiene una probabilidad de tener un cáncer menor del 10 %, preferentemente menor del 5 %, en comparación con la población normal. En otras palabras, el sujeto tiene un 90 %, preferentemente un 95 % de probabilidad de no tener cáncer. En el ámbito de la presente invención, se dice que el nivel de producción de MG en una muestra del sujeto es "significativamente mayor" o "mayor" que el valor de control, cuando dicho nivel de MG es 1,5 veces superior, de manera más fiable, 2 veces, de manera aún más fiable, 3 veces mayor que dicho valor de control. Se dice que el sujeto tiene un alto  
25 riesgo de tener un cáncer (típicamente entre el 50 % y el 80 % de riesgo), cuando su nivel de producción de MG es 2 veces mayor que dicho valor de control. Un riesgo de cáncer aún mayor (típicamente entre el 80 % y el 100 % de riesgo) se da cuando el nivel de producción de MG es 3 veces mayor que dicho valor de control. Por el contrario, se dice que el nivel de producción de MG de un sujeto examinado es "significativamente menor" o "menor" que el valor de control, cuando dicho nivel de producción de MG es 1,5 veces menor, preferentemente 2 veces y más preferentemente 3 veces menor que dicho valor de control. A la inversa, se dice que el sujeto tiene un bajo riesgo de tener un cáncer (típicamente entre el 20 % y el 50 % de riesgo), cuando su nivel de producción de MG es 2 veces menor que dicho valor de control, y un riesgo incluso menor (típicamente entre el 0 y el 20 % de riesgo) cuando su nivel de producción de MG es 3 veces menor que dicho valor de control. Finalmente, se dice el nivel de producción de MG de un sujeto examinado es "similar a un valor de control" si la proporción entre dicho nivel de producción de  
35 MG y dicho valor de control de MG está entre 0,8 y 1,2, preferentemente entre 0,9 y 1,1, más preferentemente de entre 0,95 y 1,05.

40 La glucosa es un monosacárido con la fórmula  $C_6H_{12}O_6$  o  $H-(C=O)-(CHOH)_5-H$  cuyos cinco grupos hidroxilo (OH) se ordenan de manera específica en su estructura principal de seis carbonos, normalmente como un anillo. En su forma de cadena fugaz, la molécula de glucosa tiene una estructura principal abierta (al contrario que la forma cíclica) y no ramificada de seis átomos de carbono, de C-1 a C-6; en donde C-1 es parte de un grupo aldehído  $H(C=O)-$ , y cada uno de los otros cinco carbonos lleva un grupo hidroxilo, -OH (las uniones restantes de los carbonos de la estructura principal están saturados con átomos de hidrógeno, -H).

45 En soluciones basadas en agua, la forma de cadena abierta de la glucosa (bien en su forma 'D-' o 'L-') está en equilibrio con varios isómeros cíclicos para la glucosa, que contiene cada uno un anillo de carbonos cerrado por un átomo de oxígeno. En solución acuosa, más del 99 % de la glucosa existe en forma de piranosa. La forma de cadena abierta se limita a aproximadamente el 0,25 % y la furanosa está en cantidades despreciables. Los términos "glucosa" y "D-glucosa" también se usan generalmente para estas formas cíclicas. El anillo surge de la forma de cadena abierta mediante una reacción de adición nucleofílica entre el grupo aldehído  $-(C=O)H$  en el C-1 y el grupo hidroxilo -OH en el C-4 o en el C-5, produciendo un grupo  $-C(OH)H-O-$ . El isómero abierto de D-glucosa da lugar a  
50 cuatro isómeros cíclicos distintos:  $\alpha$ -D-glucopiranososa,  $\beta$ -D-glucopiranososa,  $\alpha$ -D-25 glucofuranosa y  $\beta$ -D-glucofuranosa; todos ellos quirales.

El otro isómero abierto de L-glucosa da lugar, de manera similar, a cuatro formas cíclicas distintas de L-glucosa.

En el ámbito de la presente invención, el término "glucosa" designa cualquiera de los isómeros de glucosa, bien en forma cíclica o de cadena abierta.

55 Una vez que los niveles de MG y glucosa se han determinado en la muestra biológica ensayada, es posible calcular el, así llamado, índice MG/G, que es la proporción entre el nivel de MG y el nivel de glucosa en la muestra biológica ensayada. Esta proporción, expresada en  $\mu\text{moles/g}$  se compara después con una proporción normal de control para determinar si el paciente padece cáncer.

Dado que las células cancerosas consumen mayores cantidades de glucosa y producen y liberan mayores cantidades de MG de lo normal en el ámbito de la presente invención, la actividad metabólica de las células cancerosas en el compartimento extracelular en el organismo se caracteriza por un índice MG/G, definido como la proporción del nivel de producción de MG en sangre expresada en nmoles/g sobre el nivel de glucosa (G) en sangre expresado en mmoles/l de acuerdo con la fórmula: Índice MG/G =  $\frac{\text{MG/G}}{\text{G}}$  en el que MG/G se expresa en  $\mu\text{moles/g}$ .

En pacientes diabéticos sin cáncer existe una correlación positiva entre el nivel de glucosa, el porcentaje de hemoglobina glucosilada HbA1c y el nivel de producción de MG en la sangre (Beisswenger y col., Diabetes 1999). En otras palabras, en tales pacientes, cuanto mayor es la glucemia, mayor es el porcentaje de hemoglobina glucosilada HbA1c y mayor es el nivel de MG en circulación sanguínea. Esto explica por qué en la sangre de pacientes diabéticos sin cáncer hay un aumento simultáneo en los niveles de glucosa y MG. Por el contrario, en pacientes diabéticos con cáncer, un aumento significativo en el índice MG/G se relaciona con el hecho de que, debido a su mayor consumo de glucosa (el así llamado efecto de la "bomba de glucosa") y su mayor actividad glucolítica (Hsu y Sabatini, Cell 2008; Koppenol y col., Nat Rev Cancer 2011), las células cancerosas producen y liberan cantidades significativamente mayores de MG en la sangre, tal como los inventores han demostrado en el presente documento (véase a continuación); mientras que debido a su efecto específico de la bomba de glucosa, tienden de manera simultánea a disminuir la glucosa extracelular en el organismo; explicando por qué, a diferencia de lo que ocurre en los pacientes diabéticos, la glucemia permanece normal en pacientes con cáncer, incluso en estado avanzado.

En una realización preferida, la proporción de control (en lo sucesivo, en el presente documento citado como "índice MG/G normal de control") es el índice de la proporción MG/G que se ha determinado a partir de las muestras biológicas - preferentemente, muestras de sangre de sujetos que no tienen cáncer ni diabetes, preferentemente de sujetos sanos.

En el ámbito de la invención, el índice de la proporción MG/G normal de control es de aproximadamente 0,01, lo que se corresponde con el intermedio entre el valor de la mediana del índice MG/G obtenido de la sangre de los donantes sanos y el valor de la mediana del índice MG/G obtenido de la sangre de los sujetos normoglucémicos diabéticos tratados sin cáncer (véase la Figura 4).

En el ámbito de la presente invención, el índice MG/G de un paciente diabético es "significativamente mayor" o "mayor" que el índice MG/G normal de control, cuando dicho índice MG/G es 1,5 veces mayor, preferentemente 2 veces y, de manera más fiable, 3 veces mayor que dicho índice MG/G normal de control. Se dice que el paciente diabético tiene un alto riesgo de tener un cáncer (típicamente entre el 50 % y el 80 % de riesgo) cuando su índice MG/G es 2 veces mayor que dicho índice de control, y un riesgo incluso mayor (típicamente entre el 80 y el 100 % de riesgo) cuando su índice MG/G es 3 veces mayor que dicho índice de control.

Por el contrario, se dice que el índice MG/G de un paciente diabético es "significativamente menor" o "menor" que el índice MG/G normal de control, cuando dicho índice MG/G es 1,5 veces menor, preferentemente 2 veces, y más preferentemente 3 veces menor, que dicho índice MG/G normal de control. Se dice que el paciente tiene un bajo riesgo de tener un cáncer (típicamente entre el 20 % y el 50 % de riesgo), cuando su índice MG/G es 2 veces menor que dicho índice MG/G normal de control, y un riesgo incluso menor (típicamente un riesgo del 0-20 %) cuando su índice MG/G es 3 veces menor que dicho índice MG/G normal de control. Finalmente, se dice el índice MG/G de un paciente diabético es "similar al índice de control" si la proporción entre dicho índice MG/G y dicho índice de control está comprendida entre 0,8 y 1,2, preferentemente entre 0,9 y 1,1, más preferentemente de entre 0,95 y 1,05.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "estadificación del cáncer" o "etapas del cáncer" designa la clasificación del cáncer dentro de las cuatro categorías reconocidas a nivel internacional, denominadas etapas I, II, III y IV. Estas cuatro etapas del pronóstico se determinan en el momento del diagnóstico, es decir, antes de que se administre cualquiera de los tratamientos anticancerígenos. La estadificación se ha basado principalmente en la clasificación 'TNM' del cáncer (en la que T es el tamaño y la invasión del tejido; N es la implicación de los nódulos linfáticos regionales, M es la metástasis distante). Dependiendo del tipo tumoral, la estadificación se puede determinar con otros sistemas de clasificación. De manera que, aunque por ejemplo se use frecuentemente la clasificación TNM para el cáncer de mama, para el cáncer de bronquios y para los cánceres de cabeza y cuello; se usa frecuentemente la clasificación FIGO (International Federation of Gynecologists and Obstetricians) para el carcinoma de ovario, y una clasificación de Dukes modificada para los cánceres de colon. Por lo tanto, en el ámbito de la presente invención, los inventores clasificaron los cánceres dentro de la clasificación de las cuatro etapas de pronóstico, I, II, III y IV al considerar que es la clasificación más frecuentemente usada para cada tipo de cáncer. Además, la etapa 0 se limitó a los cánceres no invasivos *in situ*.

Los términos "tratamiento", "tratando", "tratar" y similares usados en el presente documento, normalmente se refieren a obtener una respuesta farmacológica y/o fisiológica anticancerígena. El efecto puede ser profiláctico en el sentido de evitar la progresión del cáncer en sujetos asintomáticos, y/o puede ser terapéutico *sensu stricto* en pacientes sintomáticos, con el fin de obtener una estabilización parcial o completa o la cura del cáncer.

Más precisamente tal como se usa en el presente documento, la expresión "tratamiento anticancerígeno" se refiere bien a quimioterapia, a radioterapia, a cirugía o a cualquiera de las otras terapias biológicas o químicas usadas por

los médicos. Los tratamientos existentes se resumen, por ejemplo, en la página web del National Cancer Institute (NCI) de los Estados Unidos en: <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment>.

5 El tiempo de duplicación del crecimiento de un tumor se define como el período de tiempo que es necesario para que un tumor duplique su volumen (o, de manera más precisa, una duplicación del número de células tumorales no estromáticas).

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "respuesta tumoral" se refiere a las diferentes modalidades reconocidas a nivel internacional de la evolución del tumor después de que se ha administrado un tratamiento anticancerígeno a un paciente de cáncer cuya enfermedad es perceptible, es decir, en el que la respuesta tumoral se puede evaluar directamente midiendo el tumor de manera clínica y/o indirectamente midiendo el tumor usando las técnicas disponibles de obtención de imágenes. El tipo de respuesta se determina tras un determinado intervalo de tiempo durante el cual se ha administrado el tratamiento anticancerígeno. La evaluación consiste en comparar las medidas realizadas tras el tratamiento con las realizadas antes del tratamiento. Existen cuatro categorías de respuesta: (1) tumor progresivo: el aumento en el volumen tumoral es mayor del 25 %; (2) tumor estable: el aumento en el volumen del tumor es menor del 25 % y la reducción tumoral es menor del 25 %; (3) respuesta parcial: la reducción tumoral es mayor del 25 % pero menor del 100 %; y (4) respuesta completa: el volumen tumoral medido es nulo, es decir, el tumor es indetectable por medio de las técnicas disponibles.

15 El intervalo de tiempo entre la primera y la segunda muestra biológica, es decir, el momento en el cual se puede proporcionar la segunda muestra biológica para evaluar el pronóstico o la respuesta terapéutica depende fundamentalmente del tiempo de duplicación del crecimiento del tumor; cuanto más corto es el tiempo de duplicación, más corto debería ser el intervalo de tiempo. Por sí mismo, el tiempo de duplicación del crecimiento depende del tipo de tumor y de la eficacia del tratamiento. De manera que en el caso del tumor de rápido crecimiento, el intervalo de tiempo para el muestreo podría ser uno, dos o tres meses, mientras que en el tumor de crecimiento lento podría ser cuatro, cinco, seis meses o incluso más.

20 Se considera en el presente documento que dicho tratamiento anticancerígeno no es eficaz en dicho paciente si, cuando se proporciona la segunda muestra biológica uno, dos o tres meses o incluso seis meses después de la primera muestra biológica, dependiendo del tiempo de duplicación del tumor, el nivel de producción de MG es 2 veces y, más preferentemente, 3 veces superior a dicho nivel de producción de MG en la primera muestra. Por el contrario, se dice que dicho tratamiento anticancerígeno es eficaz en dicho paciente si; cuando se obtiene la segunda muestra por ejemplo uno, dos, tres meses o incluso seis meses después de la primera muestra, dependiendo del tiempo de duplicación del crecimiento del tumor; el segundo nivel de producción de MG es 2 veces y, más preferentemente, 3 veces menor que el nivel de producción de MG en la primera muestra.

25 La supervivencia depende del tipo tumoral, de la etapa y del tratamiento. Por "supervivencia a largo plazo", se entiende en el presente documento que dichos sujetos examinados tendrán una supervivencia de al menos 12 meses, preferentemente 3 años y más preferentemente 5 años después de haber realizado la recogida de la muestra. Por otro lado, Por "supervivencia a corto plazo", se entiende en el presente documento que dichos sujetos examinados no vivirán más de 5 años, probablemente menos de 3 años, y más probablemente menos de 12 años después de haber realizado la recogida de la muestra.

30 En el ámbito de la presente divulgación se considera que la probabilidad de curar a un paciente o incluso de supervivencia a largo plazo es baja cuando la determinación del nivel de producción de MG en una segunda muestra obtenida un mes, dos meses, tres meses o incluso seis meses después de una primera muestra, es 2 veces y más definitivamente 3 veces superior a dicho nivel de producción de MG en la primera muestra. Por el contrario, se considera que el paciente tiene una mayor oportunidad de supervivencia a largo plazo o incluso de curarse definitivamente cuando el nivel de producción de MG en una segunda muestra obtenida tres meses, preferentemente seis meses y más preferente un año después de la primera muestra es 2 veces, más preferentemente 3 veces menor al nivel de producción de MG en una primera muestra e idealmente cuando los niveles de producción de MG medidos en varias muestras tras la segunda muestra permanecen en el intervalo normal.

35 La caquexia es un síndrome metabólico complejo que se da en enfermedades crónicas tales como cáncer (Tisdale, *Physiol Rev.* 2009). Se ha demostrado en pacientes que pierden peso que la medida de respuesta de insulina al ensayo de tolerancia a la glucosa puede ser indicativo de resistencia a la insulina en el caso de una alta proporción de insulina/glucosa (índice I/G) o de un a baja secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas en el caso de un índice I/G bajo (Rofe y col., *Anticancer Res* 1994).

40 Por consiguiente, los presentes inventores midieron el índice I/G en pacientes de cáncer y en sujetos normales. Compararon la curva que caracteriza a los pacientes de cáncer con la curva de los sujetos normales y descubrieron en el punto de intersección de las dos curvas la existencia de un correspondiente valor crítico de MG, en lo sucesivo, denominado como "calor de MG de control relacionado con la caquexia", por encima del cual en comparación con los sujetos normales hay un descenso en el índice I/G. Esto significa que los pacientes que tienen niveles de producción de MG por encima del valor de MG de control relacionado con la caquexia tienen un descenso en la secreción pancreática de insulina y, por lo tanto, están entrando en una precaquexia o caquexia grave.

En el ámbito de la divulgación, el valor de MG de control relacionado con la caquexia en la sangre de los pacientes de cáncer es de 0,2  $\mu$ M, que es aproximadamente 3 veces superior al valor de MG normal de control en sujetos sanos (véase anteriormente), lo que significa que al valor de MG de 0,2  $\mu$ M, el paciente de cáncer tiene exactamente la misma proporción de insulina/glucosa que la medida en sujetos sanos y, en consecuencia, tiene un nivel idéntico de resistencia a la insulina y de secreción pancreática.

En el ámbito de la divulgación, se dice que un paciente tiene un "alto riesgo de desarrollar un síndrome caquético" (típicamente un riesgo entre el 50 % y el 80 %) cuando el nivel de producción de MG en la sangre es aproximadamente 2 veces superior que el valor de MG de control relacionado con la caquexia de 0,2  $\mu$ M, mientras que cuando el nivel de MG en sangre es de aproximadamente 3 veces superior a dicho valor de MG de control relacionado con la caquexia, el riesgo de desarrollar caquexia es mayor (típicamente un riesgo entre el 80 % y el 100 %). Por el contrario, se dice que un paciente tiene un "bajo riesgo de desarrollar un síndrome caquético" (típicamente un riesgo de entre el 20 % y el 50 %), cuando el nivel de MG en sangre es aproximadamente 2 veces menor que dicho valor de MG de control relacionado con la caquexia de 0,2  $\mu$ M mientras que el riesgo de desarrollar un síndrome caquético es incluso menor (típicamente un riesgo de entre el 0 y el 20 %) cuando el nivel de MG en sangre es aproximadamente 3 veces menor que dicho valor de MG de control relacionado con la caquexia.

Tal como se usa en el presente documento, las expresiones "correlación", "correlacionar" o "se correlaciona con" y similares se refieren a una asociación estadística entre dos variables, compuestas de números, conjuntos de datos y similares. Una correlación positiva (o "correlacionado positivamente") significa que a medida que aumenta una variable, la otra también aumenta. Por el contrario, una correlación negativa (o "correlacionado negativamente" o "correlacionado inversamente") significa que a medida que aumenta una variable, la otra disminuye. La presente invención usa las directrices del National Cancer Institute de Estados Unidos - European Organization for Research and Treatment of Cancer (NCI-EORTC) para los estudios de marcadores tumorales, adaptadas a las características bioquímicas y a las propiedades biológicas del MG. Las directrices de NCI-EORTC incluyen recomendaciones relevantes sobre el diseño del estudio, las hipótesis previas, las características del paciente y de la muestra, los procedimientos de ensayo y los análisis estadísticos. Además, para la detección temprana y los enfoques de la detección sistemática, se usaron las recomendaciones de la Early Detection Research Network (EDRN) del NCI para el desarrollo de biomarcadores.

Se debe considerar que la presente invención no se restringe a las realizaciones particulares descritas. También se debe considerar que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solo realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se limita solo por las reivindicaciones adjuntas.

### **Descripción detallada de la invención**

El metilgloxal (MG) - la forma de aldehído del ácido pirúvico, también denominada piruvaldehído o 2-oxopropanal, con la fórmula: ( $\text{CH}_3\text{-CO-CH=O}$  o  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ ) - es una molécula única pero ubicua presente en la mayoría de los sistemas biológicos, incluyendo todas las células de mamífero (Inoue, Adv Microb Physio 1995). Es un metabolito citotóxico altamente reactivo y dependiente de la dosis que se produce principalmente durante la glucólisis, una etapa metabólica clave para los organismos que respiran.

Un importante descubrimiento que distingue las células cancerosas de las células normales es que muchas células cancerosas principalmente usan la glucólisis en su citoplasma para generar adenosín trifosfato (ATP) para proporcionar energía a las células. Este fenómeno de la, así llamada, glucólisis aerobia, se relaciona con el efecto Warburg que es un rasgo distintivo del metabolismo de las células cancerosas (Hsu y Sabatini, Cell 2008). Este efecto se comprende bien en la actualidad dado que se ha establecido claramente que las células cancerosas se asocian con la disfunción mitocondrial y las mutaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) (Copeland y col., Cancer Invest 2002; Wallace, Cold Spring Harb Symp Quant Biol 2005). Se ha demostrado que la glucación excesiva de las proteínas mitocondriales, de los lípidos y del ADNmt, debido a un estrés carbonílico asociado a las mitocondrias contribuye a la disfunción de las mitocondrias y a mutaciones en el ADNmt (Pun y Murphy, Int J Cell Biol 2012). Además, la producción de radicales libres en exceso en las proximidades del ADNmt por las mitocondrias disfuncionales y la ausencia de histonas protectoras en el ADNmt (Baynes, Ann N Y Acad Sci 2002) podría explicar por qué el genoma mitocondrial es mucho más susceptible tanto al estrés carbonílico como al estrés oxidativo que el genoma nuclear y, por lo tanto, experimenta una mayor tasa de mutaciones (Yakes y Van Houten, PNAS 1997). Además se ha demostrado que los cambios epigenéticos y/o mutagénicos en las células cancerosas pueden inducir: (1) la sobreexpresión de hexocinasa de tipo 2 (Goel y col., J Biol Chem 2003); (2) la activación de receptores de membrana de glucosa normalmente regulados por insulina, especialmente GLUT1, GLUT3 y GLUT5 (Merral y col., Cell Signal 1993), que llevan a que la glucosa extracelular penetre fácilmente dentro de las células cancerosas; y, por último (3) la sobreexpresión de todas las enzimas glucolíticas en condiciones aerobias y anaerobias, provocando que la glucosa intracelular se metabolice de manera activa por las células cancerosas independientemente de cómo sean las condiciones oxigénicas intratumorales (Hanahan y Weinberg, Cell 2011).

La presente invención se dirige al hecho de que las células cancerosas podrían producir, de manera característicamente significativa, mayores cantidades de MG que las células normales; haciendo que MG sea un posible marcador metabólico de cáncer. Además, debido a sus grupos reactivos de cetona y aldehído, el MG ha

demostrado ser un poderoso aceptor de electrones y, por tanto, es un compuesto extremadamente reactivo caracterizado por sus propiedades químicas y biológicas únicas.

5 En muchos organismos, incluyendo las bacterias, el MG se forma como un producto secundario de varias vías metabólicas. Se puede formar a partir de la 3-amino acetona, que es un intermediario del catabolismo de la treonina, así como a través de la peroxidación de lípidos. Sin embargo, la fuente más importante es la glucólisis, en la que el MG se genera a través de la eliminación no enzimática de fosfato de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y gliceraldehído-3-fosfato (G-3P).

10 Dado que el MG es altamente citotóxico, los organismos han desarrollado varios mecanismos de detoxificación. Uno de estos es el sistema de glioxalasa, que desempeña un papel importante en la protección de las células frente a la toxicidad electrófila, en particular, frente a la glucación dañina inducida por el MG. Durante este proceso, el MG activa la glioxalasa 1 (GLO-1) que usa el glutatión reducido (GSH) como un cofactor para convertir el MG en S-D-Lactoilglutatión (S-D-lactoilGSH), un intermediario metabólico que se degrada adicionalmente mediante la glioxalasa 2 (GLO-2) en D-lactato (Thornalley, Gen Pharmacol 1996). Es de destacar que se ha demostrado que la actividad de GLO-1 está aumentada en comparación con los tejidos normales en muchos cánceres humanos, que incluyen 15 cáncer de colon, de pulmón, de mama, de ovario, de próstata, de vejiga, de riñón, de páncreas y de estómago y leucemia y melanoma y más en particular, en cánceres agresivos (Jones y col., Proteomics 2002; Zhang y col., Mol Cell Proteomics 2005). Además, la sobreexpresión de GLO-1 y de GLO-2 se ha correlacionado con la resistencia a multifármacos en tumores (Sakamoto y col., Blood 2000). Sin embargo, la actividad de GLO-2 es generalmente menor en tejidos cancerosos que en tejidos normales, lo que sugiere que, en comparación con las células normales, 20 las células cancerosas podrían ser espontáneamente menos capaces de detoxificar el MG intracelular y de recuperar el GSH normal. Esto podría aumentar tanto el estrés carbonílico como el estrés oxidativo, por lo tanto, bien la promoción y la progresión del tumor o la apoptosis/necrosis, dependiendo de la concentración de radicales libres intracelulares (Irigaray y Belpomme, Carcinogenesis 2010).

25 Se ha descrito un papel del MG como una molécula de señalización. Együd y Szent-Györgyi sugirieron en primer lugar que GLO-1 y su sustrato MG están implicados en la regulación de la división celular (Együd y Szent-Györgyi, PNAS 1966). Más recientemente se ha sugerido que el MG regula la actividad del factor de transcripción NF-κB y la expresión del gen reportero inducida por NF-κB (Ranganathan y col, Gene 1999; Laga y col.). Además, se ha demostrado que la formación de los productos finales de la glucación avanzada (AGE, del inglés *Advanced Glycation Endproducts*) contribuyen al envejecimiento y posiblemente al desarrollo de afecciones patológicas generales, tales como diabetes (Brownlee, Nature 2001; Brownlee, Diabetes 2005), hipertensión arterial (Wang y col., J Hypertens 30 2005), proliferación de adipocitos relacionada con el sobrepeso/obesidad (Jia y col., PloS One 2012), enfermedad de Alzheimer (Smith y col., PNAS 1994) y cáncer (van Heijst y col., Ann N Y Acad Sci 2005).

35 La formación de MG intracelular aumenta en condiciones de hiperglucemia. Los niveles anómalos de aumento de MG en sangre se han evidenciado en pacientes con diabetes de tipo 1 y 2 (Beisswenger y col., Diabetes 1999) y recientemente, se ha descrito un mecanismo mediante el cual, el MG puede inducir resistencia a la insulina en diabetes de tipo 2 (Ribouley-Chavey y col., Diabetes 2006).

40 Algunos datos indican claramente que debido a su poderosa capacidad como aceptor de electrones, el MG es un poderoso agente de glucación y el precursor de AGE más reactivo (Shinohara y col., J Clin Invest 1998). No solo las proteínas, sino también los lípidos y los ácidos nucleicos son susceptibles de glucación por MG (Thornalley, Drug Metabol Drug Interact 2008).

45 Por lo tanto, por un lado, se cree que el MG contribuye al cáncer como un mutágeno potente y podría ser responsable de la génesis y del desarrollo del cáncer. Por otro lado, debido a sus propiedades citotóxicas proapoptóticas y/o pronecróticas relacionadas con la dosis, también se cree que es un fármaco anticancerígeno y se piensa que proporciona algunos efectos carcinostáticos en animales con cáncer (Conroy, Ciba Found Symp 1978) y en individuos con cáncer (Talukdar y col., Drug Metab Drug Interact 2008). Además, sobre la base de un posible efecto antitumoral de MG, varios compuestos relacionados con el MG tales como el compuesto metilglioxal-bis ciclopentil amidino hidrazina y el compuesto Mitoguazona, es decir, metilglioxal-bis(butilaminohidrazona), comercializado con el nombre de methylGAG® (NSC-32946) se han sintetizado con el fin de tratar el cáncer. Sin embargo, ni el MG ni estos compuestos sintéticos han demostrado tener realmente efectos antitumorales 50 beneficiosos a través de los adecuados ensayos clínicos de fase I y II. A pesar de los avances en la comprensión de los efectos sistémicos del MG, muchos permanecen desconocidos. En gran parte, esto se debe a que el MG existe principalmente aducido, dado que debido a sus propiedades de glucación extremadamente altas, se une a los ligandos intracelulares y extracelulares (Chaplen y col., PNAS 1998). Complicando además el problema está que el MG interactúa de manera reversible o de manera irreversible con estos ligandos. Sin embargo, se ha demostrado 55 que el MG de libre circulación se puede detectar en muestras de sangre obtenidas de pacientes que padecen diabetes tipo 1 o tipo 2 (Beisswenger y col., Diabetes 1999).

En 1959, Lewis, Majane y Winhouse, usando el procedimiento de Neuberg y Strauss, sugirieron claramente que la detección del MG en células cancerosas es despreciable (Lewis y col., Cancer Res 1959).

Además, en 1978, Brandt y Siegel especularon que la determinación directa de MG en tejidos biológicos es difícil

debido a el sistema de glioxalasa activa y, por lo tanto, propusieron administrar D-Lactato en lugar de MG en la sangre (Brandt y Siegel, Ciba Found Symp 1978). Más recientemente se concluyó a partir de una serie limitada de pacientes investigados con el, así llamado, tumor maligno establecido, que los niveles de MG en sangre estaban significativamente reducidos en pacientes con cáncer de mama y de próstata (Kumar, Biswas y col. Biomedical Res 2011); mientras que se dijo que nos niveles de MG en sangre estaban aumentados en lesiones orales precancerosas, es decir, en lesiones orales en las que se dijo que no estaban establecidas como un cáncer maligno. De hecho, en ese momento, no estaba claro sin los elevados niveles de MG en sangre en pacientes con lesiones orales precancerosas no se debían al consumo de tabaco y/o a la adicción al alcohol, dado que estos factores de riesgo se asocian comúnmente con tales sujetos y a que se ha demostrado que el humo de los cigarros así como el alcohol contienen MG (Nagao y col., Environ Health Perspect 1986); y a si los pacientes con el cáncer establecido reivindicado se han tratado previamente o no con tratamientos anticancerígenos y, por lo tanto, si estos pacientes se asocian o no con un tumor proliferativo clínica y/o biológicamente activo en el momento de la recogida de la muestra de sangre.

Los inventores descubrieron de manera sorprendente que los niveles de MG en sangre son significativamente elevados en pacientes que padecen cánceres progresivos establecidos, mientras que en cánceres no metabólicamente activos, es decir en estados precancerosos o incluso en cáncer *in situ* en etapa 0, los niveles de MG en sangre no son significativamente elevados. De hecho, los niveles de MG en sangre están significativamente aumentados en cáncer epitelial tales como los cánceres de cabeza y cuello, de pulmón, de mama, de próstata, colorrectal, de páncreas y otros cánceres digestivos; y en cáncer no epitelial tal como leucemia, linfoma, melanoma y sarcoma. Más precisamente, los niveles de MG en sangre se correlacionan con el volumen tumoral y las respuestas terapéuticas en pacientes que padecen cáncer. Cuanto mayor es el nivel de MG en sangre, mayor es la carga tumoral. El nivel de MG, por lo tanto, y de manera crítica, parece ser un biomarcador clínicamente significativo para ayudar a los oncólogos en la toma de decisiones y tratar a los pacientes de cáncer.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al MG para su uso como un biomarcador clínicamente útil para la detección y el diagnóstico temprano de cáncer en sujetos con cáncer y desvela la evaluación del pronóstico, el control y la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con cáncer, seres humanos o animales. Como los niveles de MG en sangre se pueden medir de manera rápida y precisa, el procedimiento de diagnóstico de la invención contribuye al control de la enfermedad y a la evaluación de la respuesta terapéutica de una manera muy sensible. Finalmente, dado que la producción de MG por las células cancerosas se relaciona con una disfunción metabólica fundamental y característica de estas células, el uso de MG como un biomarcador de cáncer permite la detección de muchos, si no todos los cánceres; al contrario que los biomarcadores actualmente disponibles relacionados con el tipo tumoral. Otro objeto de la divulgación es un kit para la detección y el diagnóstico temprano de cáncer, para la estadificación del cáncer, para la predicción de las probabilidades de supervivencia de los pacientes de cáncer, para el control de la respuesta terapéutica anticancerígena y para la predicción y la detección temprana de caquexia.

Otro objeto de la invención es el uso del MG en la detección y el diagnóstico temprano de cáncer metabólicamente activo midiendo y analizando la producción de MG en muestras de fluidos extracelulares, en células y/o en tejidos usando cualquier procedimiento químico o inmunológico *in vitro* para la medición del MG; dado que se prefiere el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF o técnicas similares.

### **1. MG como un biomarcador intratumoral natural producido por células cancerosas.**

Los inventores descubrieron que las células cancerosas pueden descubrir y liberar mayores cantidades de MG que las células normales, que las células cancerosas producen y liberan grandes cantidades de MG directamente dentro del tumor, luego en el compartimento extracelular en el organismo y más particularmente en la sangre periférica; mientras que las células normales (o las células inflamatorias) no producen y liberan MG o solo lo hacen en bajas cantidades en tejidos y en el compartimento extracelular en el organismo, más particularmente en la sangre periférica.

Estos sorprendentes resultados se han confirmado en cultivos *in vitro* y en modelos animales y de manera más particular usando la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para análisis tumorales de MG *in situ*, y de manera clínica con pacientes. El MG se puede detectar de manera directa en tejidos tumorales y en la zona del tumor en la que se detecta MG se corresponde principalmente con las zonas de proliferación activa en el tumor (véase la Fig 2). Además, la cantidad de MG producido y liberado por las células cancerosas en cultivos depende de la concentración de glucosa en el medio de cultivo, es decir, cuanto mayor es la concentración de glucosa, mayor es la producción de MG por las células cancerosas (véase la Fig 1 bis), lo que confirma que las células cancerosas principalmente usan la glucólisis para la producción de ATP, incluso en condiciones aerobias. Además, los inventores han demostrado que la cantidad de MG sintetizada y liberada a partir del tumor se correlaciona positivamente con la carga tumoral, es decir, cuanto mayor es el volumen tumoral, mayor es el nivel de producción de MG en la sangre periférica (véase la Fig 3 para pacientes de cáncer y la Fig 5 para el modelo animal); mientras que en el caso de un rechazo tumoral por las células inflamatorias y/o inmunocompetentes, los niveles de MG permanecen muy bajos (véase la Fig 6). Por consiguiente, una realización principal de la invención es que el nivel de producción de MG detectado en el tumor y/o en el compartimento extracelular en el organismo de un sujeto que tiene cáncer se relaciona con el nivel de actividad metabólica de las células cancerosas, lo que se corresponde con el nivel de actividad proliferativa del tumor que padece el sujeto.

La presente invención, por lo tanto, se basa en un procedimiento para la detección y el diagnóstico temprano de cáncer midiendo y analizando la producción *in situ* de MG por células cancerosas metabólicamente activas en muestras de células y/o de tejidos, usando cualquiera de los procedimientos químicos o inmunológicos *in vitro* para la medición del MG. Estos procedimientos incluyen el uso de la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF o de técnicas similares.

En consecuencia, la presente invención abarca el MG para su uso en un procedimiento para detectar cáncer midiendo y analizando la producción y la liberación de MG en muestras de tejido y/o de células usando biopsias de tejido, tal como se hace comúnmente para cualquier tumor sólido y/o cualquier frotis de células, tal como se usa comúnmente para el diagnóstico y el control de cáncer hematológico (leucemia, linfoma) y/o para la detección sistemática de algún cáncer sólido (de cuello uterino) así como de otros tipos de cáncer. Dado que la mayor parte del MG que se produce y libera a partir de las células cancerosas proviene de su elevada actividad glucolítica, la presente invención también abarca un procedimiento para determinar la agresividad proliferativa de un tumor y por tanto, puede contribuir a distinguir el cáncer de los tumores benignos o procesos inflamatorios, dado que la actividad metabólica de las células cancerosas está potenciada de manera general en comparación con la de células de tumores benignos o células inflamatorias.

## **2. MG como un biomarcador natural liberado por células cancerosas en fluidos extracelulares para la detección, el diagnóstico y la evaluación del pronóstico tempranos en sujetos no diabéticos.**

En una segunda realización principal de la invención, la presente invención abarca un procedimiento para determinar la existencia de un tumor en dichos sujetos, midiendo los niveles de producción de MG en muestras biológicas del compartimento extracelular en el organismo; más preferentemente en la sangre periférica; y comparar el nivel de producción de MG medido con su valor normal de control.

La presente invención también se basa en un procedimiento *in vitro* para la detección y el diagnóstico temprano de cáncer en sujetos no diabéticos, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de producción de MG en una muestra biológica de dichos sujetos a partir de un fluido extracelular,
- b) comparar dicho nivel de producción de MG con un valor de control, es decir, con el nivel de MG en sujetos sin cáncer en los que el nivel de producción de MG en dicha muestra biológica es mayor que dicho valor de control, dichos sujetos padecen cáncer o tienen un alto riesgo de tenerlo.

Por el contrario, cuando el nivel de producción de MG en dicha muestra biológica está dentro del intervalo de valor normal de control, dichos sujetos no padecen cáncer o tiene un bajo riesgo de tenerlo. La presente invención permite la detección y el diagnóstico de cáncer en sujetos humanos o animales que no son diabéticos, es decir, en sujetos que tienen un nivel de hemoglobina glucosilada, HbA1c por debajo del 7 %. En una realización preferida, el procedimiento de diagnóstico de la invención permite la detección de cánceres de cabeza y cuello, de bronquios y pulmón, de mama, de próstata, colorrectal, de páncreas y cánceres de otros tractos digestivos, además de los cánceres de ovario y endometrio, renal y de vejiga, leucemia y linfoma no hodgkiniano, melanoma y sarcoma. En una realización preferida, el valor de MG normal de control es el nivel de producción de dicho MG que se ha medido en una muestra biológica de individuos sanos. Preferentemente, este valor para sangre completa es  $0,06 \mu\text{M} \pm 0,02$  con intervalo de confianza de  $0,02 \mu\text{M}$  a  $0,11 \mu\text{M}$ . Además, la presente divulgación también abarca un procedimiento para determinar la agresividad proliferativa de un tumor que comprende la etapa de medir el MG en una muestra biológica de dichos sujetos y comparar el nivel de producción de MG con su valor de control.

## **3. Detección y diagnóstico temprano de cáncer: pacientes diabéticos.**

Existe una mayor incidencia de cáncer estadísticamente significativa en 30 pacientes de diabetes mellitus de tipo 1 y de tipo 2 no tratados. Sin embargo, se sabe que el nivel de producción de MG está aumentado en condiciones de hiperglucemia, es decir, en diabéticos no tratados o no tratados de manera correcta, (McLellan, Clin Sci 1994). Por lo tanto, el presente biomarcador de cáncer, MG, se confundiría en estos pacientes.

Un objeto de la divulgación es, por lo tanto, que el índice MG/G permite discriminar a estos pacientes que podrían tener un cáncer de aquellos que podrían no tenerlo, incluso en pacientes diabéticos. La evaluación de este índice, por lo tanto, permite la detección y diagnóstico temprano de cáncer en pacientes diabéticos y, en consecuencia, mejorará el pronóstico de cáncer en estos pacientes.

La presente divulgación, por lo tanto, se basa en un procedimiento *in vitro* para la detección temprana, para la detección sistemática y para diagnosticar cáncer en sujetos diabéticos, que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de producción de MG en una primera muestra biológica de dichos sujetos diabéticos,
- b) determinar el nivel de glucosa en una segunda muestra biológica de dichos sujetos,
- c) comparar la proporción de MG/G de estos dos niveles (índice MG/G) con la correspondiente proporción de control determinada en individuos sanos y en sujetos diabéticos normoglucémicos tratados, en los que si el índice MG/G obtenido en la etapa c) es mayor que dicha proporción correspondiente de control, se considera que dichos sujetos padecen cáncer o están en un alto riesgo de padecer cáncer; en los que si el índice MG/G

obtenido en la etapa c) es similar a dicha proporción correspondiente de control, se considera que dichos sujetos no padecen cáncer ni están en alto riesgo de padecer cáncer.

De manera importante, el presente procedimiento se puede aplicar a cualquier sujeto animal o humano no diabético, preferentemente a pacientes diabéticos tratados de manera correcta, pero incluso a pacientes diabéticos tratados de manera incorrecta, es decir, a sujetos con un nivel de hemoglobina glucosilada, HbA1c, inferior al 7 %.

Tal como se ha mencionado anteriormente, dichas primera y segunda muestras biológicas (que son para la medición en el mismo individuo de los niveles de MG y de glucosa, respectivamente) son preferentemente muestras de líquidos biológicos, por ejemplo, elegidos de sangre, suero, plasma, orina, derrames peritoneales o pleurales y líquido cefalorraquídeo. En el procedimiento de la invención, dichas primera y segunda muestras deben ser de la misma naturaleza (es decir, ambas son sangre, derrames peritoneales o pleurales, etc.).

Dichas primera y segunda muestras se pueden tomar del sujeto de manera secuencial. En la realización preferida, las muestras se toman a la vez. En una realización mejor, la una muestra se divide en dos, de manera que los niveles de MG y glucosa se miden en la misma muestra. Se usan de manera habitual varios procedimientos para medir el nivel de glucosa en una muestra biológica. El experto en la materia conoce cómo medir el nivel de glucosa en función del tipo de muestra biológica. Por ejemplo, cuando se usa una muestra de sangre, la glucosa se puede medir sobre la sangre completa, sobre el plasma o sobre el suero mediante técnicas habituales. Sin embargo, el plasma se tiene que mantener a 4 °C si se va a medir el MG de forma fiable.

Pero, en el ámbito de la divulgación, se prefieren las técnicas eléctricas o enzimáticas para la medición de glucosa. Las dos enzimas más comúnmente empleados son la glucosa oxidasa y la hexocinasa. En una realización preferida, la glucosa se mide midiendo el nivel de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formado cuando la glucosa reacciona con la glucosa oxidasa.

El nivel de MG se mide en la muestra biológica, tal como se desvela anteriormente.

En una realización preferida, el índice MG/G medido en y determinado a partir de una muestra biológica de individuos sanos y de sujetos diabéticos normoglucémicos tratados es preferentemente un valor de aproximadamente 0,01  $\mu$ moles/g, lo que se corresponde con un valor del índice MG/G que es intermedio entre el valor de la mediana del índice MG/G obtenido de la sangre de los donantes sanos y el valor de la mediana del índice MG/G obtenido de la sangre de los pacientes normoglucémicos diabéticos tratados sin cáncer (Fig 4).

#### **4. Estadificación, evaluación del pronóstico, control y evaluación terapéutica en pacientes de cáncer**

Las técnicas de obtención de imágenes no son precisas para detectar estados cancerosos iniciales así como para estadificar el cáncer de manera correcta en las cuatro categorías reconocidas a nivel internacional (I a IV). De hecho, una preocupación fundamental para los oncólogos clínicos es evaluar correctamente la progresión del cáncer y su extensión a través del organismo durante los estados subclínicos.

La presente divulgación muestra que en animales, los niveles de producción de MG se correlacionan con el volumen tumoral (Fig 5), y que en pacientes, los niveles de producción de MG en sangre periférica se correlacionan con la etapa de los tumores (Fig 3) y con la respuesta tumoral tras el tratamiento (Tabla 3).

La presente divulgación, por lo tanto, se basa en un procedimiento *in vitro* para la estadificación de la enfermedad y la evaluación del pronóstico en pacientes de cáncer, sean seres humanos o animales, determinando el nivel de producción de MG en una muestra biológica, preferentemente una muestra de sangre obtenida de dichos pacientes y para controlar la eficacia terapéutica en pacientes de cáncer, que comprende las etapas de:

- para la estadificación y la evaluación del pronóstico:
  - a) determinar el nivel de producción de MG en una muestra biológica inicial de pretratamiento obtenida de dichos pacientes,
  - b) comparar dicho nivel de MG de pretratamiento con el valor de MG normal de control,
  - c) clasificar dicho nivel de MG de pretratamiento de acuerdo con una de las cuatro etapas de la clasificación de estadificación,
- para el control de la eficacia del tratamiento anticancerígeno:
  - a) determinar un nivel inicial de producción de MG de pretratamiento en una primera muestra biológica obtenida de dichos pacientes,
  - b) determinar un segundo nivel de producción de MG en una segunda muestra biológica obtenida tras el tratamiento de dichos pacientes, en la que dicha segunda muestra se obtiene en un momento dado tras la obtención de la primera muestra,
  - c) comparar dicho nivel inicial y dicho segundo nivel de producción de MG, en el que si dicho segundo nivel de producción de MG es mayor que dicho nivel de producción inicial de MG, se considera que dicho tratamiento no es eficaz en dichos pacientes; mientras que si dicho segundo nivel de producción de MG es

menor que dicho nivel inicial de producción de MG, se considera que dicho tratamiento es eficaz en dichos pacientes y preferentemente debería proseguir.

El presente procedimiento de control se puede aplicar a cualquier sujeto humano o animal que presente un cáncer.

5 El presente procedimiento *in vitro* también se puede usar para controlar la eficacia terapéutica de cualquier tratamiento profiláctico anticancerígeno administrado a sujetos asintomáticos cuyo cáncer subclínico se ha detectado usando el presente procedimiento.

10 El presente procedimiento *in vitro* también se puede usar para controlar la eficacia terapéutica de cualquier tratamiento profiláctico anticancerígeno administrado a pacientes de cáncer ya tratados por una enfermedad perceptible, y para quienes se requiere tratamiento anticancerígeno adyuvante para tratar una enfermedad subclínica residual, preferentemente usando el presente procedimiento.

15 Tal como se ha mencionado anteriormente, la primera y segunda muestras biológicas (es decir, las muestras de pretratamiento y postratamiento) son preferentemente muestras de líquido biológico, por ejemplo, elegidas de sangre completa, suero, plasma, orina, derrames pleurales o peritoneales y líquido cefalorraquídeo, y deberían ser lo más idénticas posibles. En el presente procedimiento, dichas primera y segunda muestras se tienen que tomar de forma  
20 escalonada, de manera que dicho tratamiento anticancerígeno realizado entre la toma de muestras haya tenido suficiente tiempo como para desarrollar su eficacia y poder medir el resultado obtenido e interpretarlo de acuerdo de acuerdo con la presente divulgación. Más precisamente, tal como se indica anteriormente, dicha segunda muestra biológica se tiene que obtener "en un momento dado tras la primera muestra", es decir, dependiendo del tiempo de duplicación del crecimiento del cáncer, al menos un mes; preferentemente dos o tres meses o incluso seis meses después de la primera muestra; y preferentemente después de que dicho tratamiento se ha dado por completo o se ha iniciado durante un tiempo lo suficientemente largo como para proporcionar resultados interpretables.

La presente divulgación también se basa en un procedimiento *in vitro* para predecir las probabilidades de supervivencia de un paciente que padece cáncer, mediante una muestra biológica de dichos pacientes, que comprende las etapas de:

- 25 a) determinar un nivel inicial de producción de MG en una primera muestra biológica obtenida de dichos pacientes,  
b) determinar un segundo nivel de producción de MG en una segunda muestra biológica obtenida de dichos pacientes, en la que dicha segunda muestra se obtiene en un momento dado tras la obtención de la primera muestra,  
30 c) comparar dicho nivel inicial y dicho segundo nivel de producción, en el que si dicho segundo nivel de producción de MG es mayor que dicho nivel de producción inicial de MG, se predice que dichos pacientes tienen una probabilidad de supervivencia a corto plazo; en el que si dicho segundo nivel de producción es menor que dicho nivel inicial de producción, se predice que dichos pacientes tendrán una probabilidad de supervivencia prolongada.

35 El presente procedimiento de predicción de la eficacia de la terapia se puede aplicar a cualquier sujeto humano o animal que presente un cáncer.

40 Tal como se indica anteriormente, la primera y segunda muestras biológicas (es decir, las muestras de pretratamiento y postratamiento) son preferentemente muestras de líquido biológico; por ejemplo, elegidas de sangre completa, suero, plasma, orina, derrames peritoneales o pleurales y líquido cefalorraquídeo; y deben ser de la misma naturaleza. Igualmente, en el presente procedimiento, dichas primera y segunda muestras se tienen que tomar de manera secuencial, es decir, un mes, dos meses, tres meses o incluso seis meses después de la primera muestra, dependiendo del tiempo de duplicación del crecimiento del cáncer, cuanto más corto es el tiempo de duplicación del crecimiento, más corto debería ser el intervalo de tiempo.

Preferentemente, el procedimiento se realiza sobre una muestra de sangre.

45 Cabe destacar que cuando el nivel de producción de MG en dicha segunda muestra es similar el nivel de producción de MG en dicha primera muestra; es decir, si su proporción está comprendida entre 0,7 y 1,3 e incluso más preferentemente entre 0,9 y 1,1, habiéndose tomado dichas primera y segunda muestras con un intervalo de un mes, entonces no es posible predecir con precisión si el paciente tiene un cáncer en crecimiento, estable o en colapso. Por lo tanto, es necesario proceder con el mismo tratamiento y repetir la medición semanas o meses más  
50 tarde para confirmar el resultado.

### **5. Predicción y detección temprana de caquexia**

55 Se estima que la caquexia tiene lugar en un gran porcentaje de pacientes con cáncer (especialmente en aquellos con cánceres de páncreas, de estómago, de colon y de pulmón) y se asocia con una mala calidad de vida y un período de supervivencia reducido, independientemente de la carga tumoral y de la presencia de metástasis. Clínicamente, se caracteriza por una reducción en la ingesta de alimento y una pérdida de peso, y biológicamente, por la inflamación sistémica, la elevada movilización y oxidación de lípidos, una elevada degradación y renovación

de las proteínas en todo el cuerpo y la alteración del metabolismo de carbohidratos. En pacientes caquéticos, las alteraciones del metabolismo de carbohidratos incluyen la intolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina en todo el cuerpo, la reducción de la oxidación de glucosa del hospedador, el aumento de la gluconeogénesis y el aumento de la renovación y el reciclado de la glucosa; todos los procesos en los que la insulina desempeña un papel clave (Tayek, J Am Coll Nutr 1992).

Los presentes inventores midieron el MG en relación con el IMC y descubrieron que los niveles de producción de MG en sangre se correlacionan inversamente y de manera significativa con el IMC de los pacientes de cáncer pero no con el IMC de los sujetos normales (véase la Fig 7); y que en los pacientes de cáncer con un IMC menor a 18, es decir, en pacientes con un síndrome precaquético o caquético, los niveles de producción de MG aumentan significativamente en comparación con los pacientes de cáncer no caquéticos (Tabla 4). Esto significa que la medición de MG en pacientes de cáncer puede ser una herramienta valiosa para predecir o confirmar un diagnóstico de caquexia. Además, en pacientes de cáncer caquéticos, la intolerancia a la glucosa y más específicamente la resistencia a la insulina son acontecimientos bioquímicos tempranos, que tienen lugar mucho antes de la aparición de la pérdida de peso (Tayek y col., J Am Coll Nutr 1992) y en pacientes con pérdida de peso, la medida de la respuesta de insulina al ensayo de tolerancia a la glucosa puede ser indicativo de resistencia a la insulina en el caso de un alto índice Insulina/Glucosa (I/G) o de una reducida secreción de insulina en el caso de un bajo índice I/G (Rofe y col., Anticancer Res 1994). En consecuencia, los presentes inventores midieron el índice I/G en pacientes de cáncer y en sujetos normales de acuerdo con el nivel de producción de MG y establecieron que el valor de MG de control relacionado con la caquexia en la sangre de los pacientes de cáncer es de 0,2  $\mu$ M, lo que significa que a un valor de MG de 0,2  $\mu$ M, los pacientes de cáncer tienen exactamente la misma proporción de I/G que la medida en sujetos sanos, y que, en consecuencia, tienen un idéntico nivel de resistencia a la insulina y de secreción pancreática (véase la Fig 8).

Por lo tanto, la presente divulgación también se basa en un procedimiento *in vitro* para predecir, detectar y diagnosticar caquexia o precaquexia en sujetos o pacientes de cáncer que comprende las etapas de:

- a) determinar el nivel de producción de MG en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- b) comparar dicho nivel de producción de MG con un valor de control de caquexia relacionado con el MG, en el que si el nivel de producción de MG en dicha muestra biológica es mayor que dicho valor de control de caquexia relacionado con el MG, entonces dicho paciente está entrando en caquexia o en una precaquexia grave y, por lo tanto, en ausencia de un tratamiento anticaquético específico eficaz, se predice que tienen una supervivencia a corto plazo, mientras que si el nivel de producción de MG en dicha muestra biológica es menor que dicho valor de control, dicho paciente no está entrando en caquexia o precaquexia grave y, por lo tanto, se predice que tienen una supervivencia más prolongada.

En el presente procedimiento, dicho valor de MG de control se ha determinado a partir de una comparación entre la evolución de la proporción de insulina/glucosa (índice I/G) en pacientes de cáncer y la evolución del índice I/G en sujetos normales, permitiendo la caracterización de un punto crítico del nivel de producción de MG denominado "valor de control relacionado con la caquexia", del que se estima que es aproximadamente de 0,2  $\mu$ M de MG en la sangre y por encima del cual el nivel de secreción de insulina por las células  $\beta$  del páncreas es deficiente, lo que significa que los pacientes entran en caquexia o precaquexia grave.

Esto es aproximadamente 3 veces superior al valor de MG normal de control en sujetos sanos.

Una vez más, el presente procedimiento de predicción se puede aplicar a cualquier sujeto humano o animal que presente cáncer.

#### PROCEDIMIENTOS DE MEDICIÓN DE METILGLIOXAL

Se puede hacer un análisis o detección directa *in situ* del MG en muestras de tejidos sólidos y más en particular, de tumores, usando la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF, que asocia una desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, del inglés *matrix assisted laser desorption/ionization*) con una espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF, del inglés *time-of-flight*).

El procedimiento llevado a cabo para una medición directa *in situ* y un análisis del MG en biopsias de tejido sólido y en frotis celulares mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF se describe a continuación en "Ejemplos". Brevemente, en lo que respecta a los tejidos sólidos, antes de cortarlos en secciones de 12  $\mu$ m de espesor, los tejidos sólidos se congelan en primer lugar a -80 °C y se fijan mediante agua ultrapura durante el procedimiento del criostato. Las secciones se ponen después en placas MALDI específicas y se tratan con etanol antes de ser tratadas con alfa-fenilendiamina (o-PD). Las preparaciones se incuban a continuación en una cámara humidificada durante toda la noche a temperatura ambiente en la oscuridad, después se secan (usando un desecador) y se recubren con una solución de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA). Analizando el efecto proporcionado por la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF sobre 2MQX, los inventores descubrieron que los dos fragmentos moleculares de 2MQX, uno de 91 Da y el otro de 118 Da son la mejor característica distintiva seleccionada de MG que se podría usar para detectar y cuantificar el MG en tejidos sólidos, tras usar el análisis de imágenes de MS/MS. Se ha establecido un procedimiento similar y se ha llevado a cabo para detectar y medir el MG intracelular en frotis

celulares. El análisis o la detección de MG libre en muestras líquidas se puede realizar por medios convencionales conocidos en la materia, por ejemplo, usando la cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC), ensayos ELISA u otros procedimientos que se han propuesto (véase Ohmori y col., J Chromatogr. 1987; McLellan y col., Anal Biochem 1992; Nemet y col., Clin Biochem 2004; Chaplen y col., Anal Biochem 1996).

5 En una realización preferida de la invención, dichas muestras biológicas líquidas se eligen de sangre completa, suero, plasma, orina, derrames pleurales o peritoneales, líquido cefalorraquídeo o líquidos digestivos. En una realización preferida de la invención, la detección de MG libre de origen natural se realiza añadiendo a la muestra de sangre un derivado de 1,2-diaminobenceno, preferentemente o-fenilendiamina (o-PD). La reacción entre MG y o-PD de hecho forma quinoxalinas, que son fuertes cromóforos o fluoróforos o ambos, fácilmente cuantificados con  
10 RP-HPLC. Sin embargo, la invención también usa 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno (DMB también denominado DDB) de acuerdo con el procedimiento descrito por McLellan y col. (McLellan y col., Anal Biochem 1992) que mide la quinoxalina resultante también mediante RP-HPLC.

Un procedimiento sencillo para cuantificar el nivel de MG en la muestra de sangre completa se proporciona en la parte experimental a continuación. En esta realización particular, la muestra de sangre completa se toma del sujeto por medios convencionales, y se mantiene inmediatamente sobre hielo antes de congelarla a -80 °C hasta que se mide el MG. Tras la descongelación, hasta la temperatura del procedimiento de derivatización, la muestra se mantiene a 4 °C, ya que el MG es muy reactivo e inestable. En una primera etapa, se añade ácido trifluoroacético (TFA) a la muestra de sangre completa descongelada para la precipitación instantánea de proteínas. La muestra se centrifuga a continuación a 4 °C y se recupera el sobrenadante. En una segunda etapa, la derivatización se realiza  
15 añadiendo o-PD o DMB al sobrenadante, y dicha mezcla se mantiene durante 4-6 horas a temperatura ambiente (23 °C) en la oscuridad. Se realiza una centrifugación final y se recupera el sobrenadante, para analizarlo usando RP-HPLC o cromatografía de gas, acoplada a un sistema de detección, que cuantifican ambos los niveles de MG de manera precisa.

Como alternativa a este procedimiento, los inventores proponen un procedimiento mejorado para simplificar la toma y el tratamiento de la muestra y la medición del MG. En este procedimiento alternativo, para la toma de la muestra, se usan los frascos que ya contienen TFA, las muestras se mezclan inmediatamente mediante inversión y se mantienen a 4 °C antes de congelarlas a -80 °C. De manera que después de la descongelación, la muestra se pueda centrifugar inmediatamente a 4 °C y obtener el sobrenadante, y derivatizarlo para la cuantificación del MG como anteriormente.

30 La medición de MG también se puede hacer usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas cuantitativo de tipo sándwich (ELISA de tipo "sándwich") basado en la preparación de anticuerpos específicos frente a MG. La preparación de anticuerpos específicos contra el MG libre es crucial para la validez de este ensayo. Se comercializan varios kits de ELISA para MG humano.

En una realización preferida de la invención, los anticuerpos específicos para MG se recubren previamente sobre microplacas. Las muestras calibradas se introducen después en los pocillos de la microplaca recubiertos previamente, de manera que el MG libre que está presente en la muestra se une a los anticuerpos previamente recubiertos. Tras retirar cualquiera de las sustancias no unidas se añaden después directamente a los pocillos los anticuerpos anti-MG conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP, del inglés *HorseRadish Peroxidase*). Tras el lavado, a esto le sigue la adición de la solución del sustrato 3,3',5,5' tetrametil-bencidina (TMB) (un sustrato específico para el conjugado enzimático usado) a cada pocillo. Solo los pocillos que contengan MG evidenciarán un cambio en el color que se puede medir mediante espectrofotometría. Finalmente, los niveles de MG en las muestras se determinan mediante comparación con un patrón. Este inmunoensayo enzimático cuantitativo de tipo "sándwich" es una simplificación de los ensayos de ELISA comercialmente disponibles, que usan por ejemplo un sistema de anticuerpos conjugados con biotina acoplados a HRP conjugada con avidina. Dado que la validez de los ensayos  
40 ELISA de tipo "sándwich" dependerá de la especificidad y de la calidad de los anticuerpos anti-MG, tales ensayos deberían implicar controles regulares de RP-HPLC para cada nuevo reservorio de reactivos.

## REDUCCIÓN DE RESULTADOS DE FALSOS NEGATIVOS Y DE FALSOS POSITIVOS

A partir de los datos presentados en el presente documento (véase la Fig 3 y los "Ejemplos") al medir el MG en la sangre completa de un paciente de cáncer mediante RP-HPLC, los inventores evaluaron la posibilidad de resultados de falsos negativos del 10 al 15 % del tiempo. En tales casos, se tuvieron que emplear otros procedimientos tales como aquellos de la invención que miden directamente el MG en tejidos o células. El error de falso positivo puede tener lugar en pacientes con insuficiencia renal crónica (Nakayama y col., Am J Nephrol 2008) y en pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 y 2, pero la insuficiencia renal crónica y la diabetes se pueden reconocer y diagnosticar con facilidad, y los inventores han propuesto el uso de un índice MG/G para detectar cáncer en pacientes diabéticos.  
55 Tal como se indica anteriormente, además de la diabetes, Los AGE se han asociado con el envejecimiento y con varias enfermedades no cancerosas relacionadas con la edad, tales como hipertensión arterial, sobrepeso/obesidad y la enfermedad de Alzheimer. Se ha detectado un aumento en los niveles de MG en la pared de la pared arterial y en la sangre de ratas hipertensas (Wu y Juurlink Hypertension 2002) pero nunca se ha demostrado que los pacientes con hipertensión arterial común tengan unos niveles de producción de MG aumentados en su sangre. Se ha documentado un aumento en la glucación de proteínas y en los niveles de MG en el líquido cefalorraquídeo de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, pero no se ha observado que el MG haya aumentado en la sangre  
60

periférica de los pacientes. Además, se descubrió que los parámetros asociados al producto final de la glucación avanzada detectados en la sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Alzheimer eran valores más bajos en comparación con los controles sin demencia (Thorne J y col., Life Science 1996), un hallazgo que no sugiere que los niveles de MG en sangre puedan aumentar en tales pacientes. De hecho, a excepción de la insuficiencia renal crónica y la diabetes mellitus de tipo 1 y 2, no hay datos que apoyen la presencia de altos niveles de MG libre en sangre en seres humanos con enfermedades relacionadas con la edad tales como hipertensión arterial o la enfermedad de Alzheimer. Además, en sujetos normales sanos, no se consideró que el envejecimiento influyen en los niveles de producción de MG en sangre y los niveles de MG en sangre relacionados con la edad se incluyeron dentro de los valores del intervalo normal, de manera que el envejecimiento de por sí no podría suponer falsos positivos. Además, no se ha observado ningún aumento en los niveles de producción de MG en la sangre de varios pacientes con enfermedad inflamatoria crónica.

En otro aspecto, la presente divulgación se basa en un kit para la detección y el diagnóstico temprano de cáncer, para la estadificación del cáncer, para la predicción de las probabilidades de supervivencia de los pacientes de cáncer, para el control de la respuesta terapéutica anticancerígena y para la predicción y la detección temprana de caquexia, que comprende:

- los medios para tomar muestras biológicas,
- los medios para medir los niveles de producción de MG,
- las instrucciones para usar dicho kit,
- de manera óptima, una muestra de control (referencia).

En una realización preferida de la divulgación, dicho kit comprende las instrucciones y los medios para la detección *in situ* y la medición de MG en frotis celulares o tejidos mediante espectrometría de masas MALDI-TIF/TOF o técnicas similares y la cuantificación de MG, usando uno de los procedimientos disponibles:

- Un ensayo químico, que incluye o-PD o DMB, 2MQX o DMQ, MQX o DDQ para el análisis de RP-HPLC en fluidos extracelulares

Para el ensayo químico, dicho kit comprende los siguientes reactivos:

- Ácido trifluoroacético (TFA) para la precipitación de proteínas
- o-fenilendiamina (o-PD) o 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno (DMB también denominado DDB) para la derivatización
- El producto específico de quinoxalina que se corresponde con los agentes de derivatización usados: 2-metilquinoxalina (2-MQX) o 6,7-dimetoxi-2-metilquinoxalina (DMQ) para la curva de calibración.
- Patrones que consisten en los derivados de quinoxalina 5-metilquinoxalina (5-MQX) o 6,7-dimetoxi-2,3-dimetilquinoxalina (DDQ) para el patrón interno.

- Opcionalmente, un ensayo químico que usa reactivos químicos para el análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para la medición del MG en tejidos sólidos o en frotis celulares.
- Opcionalmente, un ensayo inmunológico enzimático cuantitativo de tipo "sándwich" basado en los anticuerpos monoclonales o policlonales que reconocen de manera específica el MG libre, para la medición de MG en fluidos extracelulares.

En otra realización preferida, el kit de la divulgación comprende adicionalmente los medios para detectar el nivel de producción de glucosa y las instrucciones para determinar el índice MG/G basado en los ensayos enzimáticos de la glucosa oxidasa o de la hexocinasa.

### **Ejemplo 1: Preparación de muestras de tejidos sólidos y medida de MG en tumores**

Las muestras de tumores se obtuvieron 6 semanas después de que 90 ratas BD-IX macho y hembra (Charles River, Francia) se injertasen con células de cáncer de colon tumorigénicas PRO (45 hembras y 45 machos proporcionados por Charles River). Antes de cortarlas en secciones de 12  $\mu\text{m}$  de espesor, los tumores se congelaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se fijaron mediante agua ultrapura durante el procedimiento de criostato a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Las secciones se pusieron después sobre placas MALDI específicas (proporcionadas por Bruker) y las preparaciones se trataron con etanol, después con o-PD (al 0,01 %) (Sigma Aldrich, Francia) antes de incubarlas en una cámara humidificada durante toda la noche a una temperatura ambiente en la oscuridad. Tras esta incubación, las secciones se secaron (usando un desecador) y se recubrieron con una solución de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico. (HCCA) (proporcionado por Sigma Aldrich). Analizando el efecto sobre 2MQX (2-metilquinoxalina) (proporcionado por Sigma Aldrich) con espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Bruker UltraFlex III), se seleccionaron dos fragmentos moleculares de 2MQX, uno de 91 Da y el otro de 118 Da, que permitieron la detección de MG en el tumor tras el análisis de imágenes MS/MS.

Los intervalos de control se prepararon tal como sigue: el patrón interno 5MQX (5-metilquinoxalina) (proporcionado por Sigma Aldrich) se usó a  $0,4\text{ }\mu\text{M}$  y se mezcló a su concentración final con cada alícuota de 2MQX, preparada de acuerdo con un intervalo de concentraciones, desde 0 hasta  $1,6\text{ }\mu\text{M}$ . Las diluciones se hicieron con agua ultrapura. El análisis se hizo usando la espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.

**Ejemplo 2: Preparación de muestras de fluidos extracelulares y medida de MG en sangre:**

Los sujetos tuvieron que estar en ayunas durante 8-12 horas antes del muestreo, dado que el MG puede estar presente en algunos alimentos y bebidas. Las muestras de sangre se recolectaron a 4 °C y el análisis se pudo hacer sobre sangre completa dado que el MG está a concentración constante en glóbulos rojos. Esta posibilidad proviene del hecho de que en los glóbulos rojos, el MG se produce de manera no enzimática a una tasa constante a partir de glicerona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato (Thornalley, Biochem 1989).

Se ha usado un procedimiento basado en un proceso de derivatización seguido por cromatografía de gas/espectrometría de masas (GC/MS). La preparación y cuantificación del MG se hace usando un procedimiento de cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC) que implica la derivatización bien con o-PD o DMB acoplado con un análisis de espectrometría de masas. En resumen, tras la centrifugación de la sangre completa a 4 °C, el procesamiento requiere la precipitación de proteínas con ácido trifluoroacético (TFA), la incubación del sobrenadante con el agente de derivatización o-PD o DMB durante 4-6 horas a 23 °C en la oscuridad, y el análisis cuantitativo del MG tras su conversión en 2MQX para o-PD, o 6,7-dimetoxi-2-metilquinoxalina (DMQ) para DMB.

Las soluciones patrón se prepararon tal como sigue: La concentración de la solución madre acuosa de MG se determinó de manera enzimática mediante ensayo de criterios de valoración. La cuantificación del MG implica la conversión a S-D-lactoilglutión mediante glioxalasa I en presencia de glutatión reducido (GSH). Se prepararon patrones de calibración que contienen 0,0625-1,6 nmol de MG en 1 ml de agua. La derivatización se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito anteriormente. Las curvas de calibración se construyen representando gráficamente las proporciones del área de los picos de 2MQX y 5MQX (patrón interno) frente a las concentraciones de MG para el agente de derivatización o-PD o representando gráficamente las proporciones del área de los picos de DMQ y 6,7-dimetoxi-2,3-dimetil-quinoxalina (DDQ) (patrón interno) frente a las concentraciones de MG para el agente de derivatización DMB.

Con el fin de identificar y determinar la concentración de MG en la sangre, los derivados de quinoxalina 2MQX y 5MQX, para o-PD, y DMQ y DDQ para DMB se resuelven mediante RP-HPLC y se analizan mediante ionización de electronebulización/monitorización de iones seleccionados (ESI/SIM). Finalmente, la cuantificación del MG se realiza calculando la proporción del área del pico de la intensidad del pico del ion molecular protonado (m/z de 145 para 2MQX y m/z de 205 para DMQ) para una intensidad de pico de iones de patrón interno molecular (m/z de 145 para 5MQX y m/z de 218 para DDQ) en el modo de monitorización de iones seleccionados (SIM).

**Ejemplo 3: Experimentos *in vitro***

La medida de la producción de MG por las células cancerosas en comparación con las células normales se ha hecho usando cultivos tisulares *in vitro*. En un experimento típico que usa cultivos celulares, la producción de MG por las células cancerosas en el medio acondicionado (MA) de la línea celular HCT116 de carcinoma colorrectal humano se hizo usando LC-MS/MS. Las células se cultivaron bien en condiciones de baja glucosa (5,6 mM) o en condiciones de elevada glucosa (25 mM) y se recogieron tras 48 horas.

Se descubrió que la producción de MG en el MA es 10 veces superior en condiciones de elevada glucosa (concentración de MG de 0,05917  $\mu$ M) que en condiciones de baja glucosa (concentración de MG de 0,00515  $\mu$ M), demostrando que las células cancerosas sintetizan MG a partir de glucosa y, por lo tanto, usan principalmente la glucólisis para la producción de ATP.

Los experimentos adicionales demostraron que esta dependencia de la dosis implica a diversos tipos de células cancerosas; mientras que debido al bajo consumo de glucosa y a la glucólisis, las células normales sintetizan y liberan menos MG.

**Ejemplo 4: Experimentos *in vivo***

En una serie de 101 pacientes consecutivos con una variedad de tipos y localizaciones de cánceres en diferentes etapas de su enfermedad se examinó la presencia de MG en la sangre y los niveles obtenidos en los pacientes de cáncer se compararon con los obtenidos en una serie de 36 individuos normales de control ajustados a la edad y el sexo y con los de 12 pacientes normoglucémicos tratados por diabetes mellitus de tipo 2 (además de 6 pacientes de diabetes mellitus de tipo 2 usados como un control positivo para el ensayo). Los criterios de inclusión para los pacientes de cáncer fueron un diagnóstico patológico de cáncer, la ausencia de tratamiento previo, la presencia de una enfermedad clínicamente y/o biológicamente perceptible, la ausencia de diabetes mellitus, la insuficiencia renal y otras enfermedades crónicas.

Los criterios de inclusión para los controles normales fueron la ausencia de cáncer, diabetes mellitus, hipertensión arterial, enfermedad de Alzheimer e insuficiencia renal; para los pacientes con diabetes de tipo 2 no insulino dependientes, que no tuviesen complicaciones asociadas a la diabetes y para los pacientes diabéticos tratados, una hemoglobina glucosilada, HbA1c  $\leq$  al 7 % y una glucemia normal. Para todos los sujetos incluidos, los criterios de inclusión fueron no fumar, no consumir alcohol ni café 24 horas antes del momento de la recogida de la muestra, y todos los pacientes con elevado consumo de tabaco y/o adicción al alcohol se excluyeron del estudio. El

IMC así como la medida de la glucosa e insulina en sangre se determinaron de manera seriada de acuerdo a los procedimientos convencionales en los primeros 66 pacientes incluidos y en todos los controles.

#### **Ejemplo 5: modelos animales *in vivo***

5 Se llevó a cabo un conjunto de experimentos usando animales de laboratorio, en particular, el modelo de cáncer de colon trasplantado inducido por 1-2 dimetilhidrazina en ratas singénicas BDIX, para lo cual, dos clones de células de carcinoma, (DHD-K12/SRb y DH-K12/JSb) se seleccionaron previamente *in vitro* para formar tumores progresivos (PROb) y tumores regresivos (REGb), respectivamente, cuando se injertaron a las ratas. En estos experimentos, las muestras de sangre para la medición del MG y de otras moléculas tales como glucosa e insulina se recolectaron en las semanas 2, 3, 4, 6 y 9. Al mismo tiempo, se midieron las masas tumorales para la evaluación tumoral. El análisis estadístico se realizó usando JMP 7 (SAS Software, NC, EE.UU.). La significación estadística se determinó usando el test exacto de Fisher y la prueba de la t de Student de dos colas.

15 El tumor de colon es un adenocarcinoma que se obtuvo de ratas BD-IX 6 semanas después del trasplante de células de cáncer de colon tumorigénicas PRO (véase anteriormente). En 1 y 2 de la Fig 2, el tumor se asocia claramente con una gran zona necrótica que predomina en su parte media e inferior. Esto se evidencia particularmente bien en 2 de la Fig 2, lo que se corresponde con la tinción tumoral mediante hematoxilina-eosina-safrán.

El MG se ha localizado en el tumor detectando los dos fragmentos moleculares de 2MQX, uno de 91 Da y el otro de 118 Da tras el análisis de imágenes de MS/MS mediante MALDI-TOF/TOF. Esto permitió obtener los escaneos tumorales que se muestran en 3 y 4 de la Fig 2, respectivamente.

20 Los escaneos en 3 y 4 son ejemplos que demuestran que los tumores malignos son capaces de producir altas cantidades de MG, mientras que el análisis del tejido normal de control usando el presente procedimiento no reveló MG detectable o lo hizo en baja cantidad. Tal como se documenta en los escaneos 3 y 4 de la Fig 2, no estaba claro si se detectó el MG intracelular, extracelular o ambos. Sin embargo, en el escaneo 3 de la Fig 2 (que se corresponde con el fragmento de 2MQX de 91 Da), la cantidad de MG parece ser menos abundante en la zona necrótica del tumor, aunque parece que se detecta principalmente en la parte proliferativa activa del tumor.

#### **25 Ejemplo 6: Pacientes de cáncer**

Los resultados de la Tabla 1 demuestran que el valor medio y los valores extremos de los niveles de MG en sangre en pacientes de cáncer son significativamente superiores que los de los normales de control, tanto en hombres como en mujeres, y en pacientes normoglucémicos tratados de diabetes mellitus de tipo 2. No se descubrió una diferencia significativa entre los sujetos normales y los pacientes normoglucémicos tratados de diabetes mellitus de tipo 2 usados como control.

35 Además de la determinación del MG en sangre, a los pacientes con cáncer demostrado de manera patológica se les investigó de manera prospectiva y seriada la glucosa y la insulina en sangre antes del tratamiento anticancerígeno. Se realizó una investigación similar en sujetos normales. En pacientes de cáncer, no se halló una correlación significativa entre los niveles de MG en sangre y la glucemia, aunque los niveles de MG en sangre tendían a correlacionarse de manera inversa con la insulinemia (datos no mostrados), lo que significa que en pacientes de cáncer, el nivel de MG en sangre es un parámetro relativamente independiente. Se halló un resultado no significativo en los controles normales. Tales datos, por lo tanto, significan que la detección de un aumento en el nivel de MG en sangre en pacientes diabéticos tratados de manera correcta, es decir, en pacientes con glucemia normal y con HbA1c normalizada, se podría deber a, como en los sujetos sanos no diabéticos, una consecuencia del cáncer.

40 Las medidas sistemáticas del MG en pacientes normoglucémicos tratados de diabetes se justifican, por lo tanto, como una alta incidencia de determinados tipos de cáncer que incluyen los cánceres colorrectal, de páncreas, de hígado, de mama, y de vejiga, se ha demostrado que se asocian de manera significativa con la diabetes mellitus de tipo 1 o 2.

45 Los resultados de la Tabla 2 desvelan una comparación de los niveles de MG en sangre en pacientes de cáncer de acuerdo con los tipos de tumor:

50 De hecho, en comparación con los controles normales (y los pacientes normoglucémicos tratados de diabetes de tipo 2) los niveles de MG en sangre están significativamente aumentados en pacientes que padecen cánceres de cabeza y cuello, de pulmón, de mama, de próstata, colorrectal, de páncreas y/o otros cánceres digestivos y demuestran que, en estos pacientes, los diferentes valores de MG son entre 1,5 y 2 veces mayores que el valor normal de control, en función del tipo tumoral. Cabe destacar la diferencia estadísticamente significativa con respecto a los controles normales del nivel de MG obtenido para los cánceres de mama y de próstata, que son los cánceres más frecuentes; y las diferencias altamente y estadísticamente significativas de los niveles de MG para los cánceres de pulmón, colorrectal, de páncreas y de cabeza y cuello, para los que actualmente no existen biomarcadores de detección temprana.

55

**Ejemplo de referencia 1: Relación estadísticamente significativa entre los niveles de MG en sangre de pacientes de cáncer y las etapas de la enfermedad.**

Dado que se ha demostrado bien que el volumen tumoral es de valor de pronóstico, los niveles de MG en sangre en la estadificación se pueden considerar como un indicador del pronóstico. Además, dado que los inventores han demostrado que los niveles de MG en sangre reflejan claramente el volumen tumoral, los niveles de MG en sangre también son un indicador de pronóstico más tarde o durante la evolución de la enfermedad.

Para los cánceres *in situ* (etapa 0) no hay aumentos significativos en los niveles de MG en sangre en comparación con el valor normal de control (0,06  $\mu\text{M}$ ), un hallazgo que confirma que algunos cánceres en etapa 0 pueden no ser metabólicamente activos, mientras que para el cáncer de etapa I a IV hay una correlación positiva significativa ( $p=0,0109$ ). Esto significa que la medida sistemática de MG en la sangre de los pacientes de cáncer es una herramienta eficaz para diagnosticar y estadificar el cáncer y para evaluar el pronóstico.

**Ejemplo 7: Niveles de MG en sangre y volumen tumoral en experimentos con animales.**

La Figura 5 desvela la evolución de los niveles de MG en sangre en ratas BD-IX tras el trasplante de células de cáncer de colon tumorigénicas PROb y la Figura 6 desvela la evolución de los niveles de MG en sangre en ratas BD-IX tras el trasplante de células de cáncer de colon no tumorigénicas REGb. Tal como se demuestra a partir de estos datos, existe una correlación positiva claramente y estadísticamente significativa entre los niveles de MG en sangre y el volumen tumoral en ratas injertadas con células tumorales PROb. Por el contrario, en ratas trasplantadas con células tumorales REGb y para las cuales el injerto no puede tomarse, los niveles de MG en sangre, tras un aumento transitorio en la semana 4 tras el trasplante no se pudieron detectar adicionalmente, lo que significa que, en animales para los que no se toma el injerto tumoral, no se evidenciaron cantidades significativamente aumentadas de MG en circulación. Este experimento demuestra que los tumores en crecimiento se asocian de manera significativa con niveles de MG en sangre más altos que los tumores que no crecen, es decir, que las células cancerosas proliferativas producen y liberan mayores cantidades de MG en circulación que las células cancerosas no proliferativas o las células normales. Esto explica por qué los niveles aumentados de MG en sangre son detectables en pacientes de cáncer, mientras que se detectan niveles de MG significativamente inferiores o no se detectan niveles de MG en sangre en sujetos sin cáncer, más precisamente sin cáncer de actividad proliferativa.

**Ejemplo 8: Media y valores extremos (en  $\mu\text{M}$ ) de niveles de MG en sangre de acuerdo con las respuestas clínicas obtenidas en pacientes de cáncer tratados.**

Tal como se indica en la Tabla 3, los estudios longitudinales de varios pacientes tratados por cáncer demostraron que los pacientes a los que se les evaluó clínicamente la respuesta completa tras los tratamientos anticancerígenos se asociaron con niveles normales de MG en sangre, mientras que los pacientes que fracasaron en la respuesta al tratamiento o que tuvieron una respuesta parcial o una enfermedad estable tras el tratamiento tuvieron unos elevados niveles persistentes de MG en sangre. Por lo tanto, en pacientes de cáncer, el MG es un marcador de la evolución de la enfermedad y de la respuesta terapéutica. Sin embargo, varios pacientes de los que se consideró que respondieron por completo al tratamiento usando los biomarcadores actualmente disponibles y las técnicas de obtención de imágenes para evaluar la respuesta aún tuvieron niveles aumentados detectables de MG en su sangre, cuyos niveles se asociaron adicionalmente con la recaída tumoral temprana. Este hallazgo sugiere fuertemente que la detección de MG en pacientes de cáncer tratados puede ser una mejor herramienta para la evaluación de la respuesta terapéutica tumoral que las estrategias clínicas actualmente disponibles basadas en biomarcadores clásicos y/o en técnicas de obtención de imágenes.

**Ejemplo de referencia 2: índice MG/G en la sangre de pacientes de cáncer, de sujetos normales y de pacientes tratados por diabetes de tipo 2.**

Tal como se muestra en la Figura 4, el índice MG/G determinado en la sangre está aumentado de manera significativa casi dos veces en pacientes de cáncer en comparación con el de sujetos sanos y pacientes normoglucémicos tratados por diabetes de tipo 2. Este resultado sugiere fuertemente que es posible reconocer pacientes diabéticos con cáncer (que tienen un alto índice MG/G) de aquellos que no lo son con cáncer (que tienen un bajo índice MG/G); a pesar de la disregulación de la glucosa potencialmente confundente de la diabetes del diabético.

**Ejemplo de referencia 3: Correlación entre los niveles de MG en sangre y el IMC en pacientes de cáncer y en sujetos sanos.**

Como se ha demostrado que los pacientes con sobrepeso/obesidad se asocian con un aumento significativo en la incidencia de cáncer, se realizó la búsqueda de una correlación entre los niveles de MG en sangre y el IMC en pacientes de cáncer frente a los controles normales.

**a. Niveles de MG en sangre en pacientes de cáncer con sobrepeso-obesidad**

Tal como se expone en la Tabla 4, los pacientes de cáncer con sobrepeso/obesidad ( $\text{IMC}>25$ ) se asocian con menores (pero aún así altos) niveles de MG en sangre en comparación con los pacientes de cáncer que tienen un

peso normal ( $18 < \text{IMC} < 25$ ). Sin embargo, a diferencia de los sujetos normales, existe en los pacientes de cáncer una correlación inversa estadísticamente significativa entre el IMC y los niveles de MG en sangre (Fig 7), lo que significa que la detección de un nivel de MG en sangre mayor de  $0,1 \mu\text{M}$  en pacientes con sobrepeso-obesidad se deba probablemente al cáncer. La medida del MG en pacientes con sobrepeso/obesidad, por lo tanto, se justifica.

5 **b. Nivel de MG en sangre en pacientes de cáncer precaquéticos o caquéticos**

10 Tal como se indica en la Tabla 4, los pacientes de cáncer con un IMC por debajo de 18 (es decir, con delgadez o caquexia) tienen unos niveles de MG en sangre significativamente superiores que los pacientes con IMC normal ( $18 < \text{IMC} < 25$ ). También se descubrió que los niveles de MG en sangre se correlacionan inversamente y de manera significativa con los niveles de albúmina en sangre (datos no mostrados). Dado que se ha demostrado que la hipoalbuminemia está asociada con la caquexia, esto confirma de manera indirecta que en pacientes de cáncer, los altos niveles de MG en sangre se asocian con la caquexia. Este resultado se presenta en la Figura 7, en la que, tal como se ha indicado anteriormente, se demuestra que los niveles de MG en sangre en pacientes de cáncer se correlacionan inversamente y de manera significativa con el IMC (Fig 7B), mientras que en sujetos normales, los niveles de MG en sangre y el IMC no se correlacionan (Fig 7A).

15 Dado que la delgadez-caquexia se asocia con un tiempo de supervivencia reducido independientemente del volumen tumoral o de la presencia de metástasis, estos datos sugieren fuertemente que la medición repetida de MG en pacientes de cáncer constituye una nueva herramienta para predecir y detectar de manera temprana la caquexia y, por lo tanto, para evaluar de manera objetiva el pronóstico del paciente.

**Ejemplo de referencia 4: Determinación de un valor de control de MG en sangre relacionado con la caquexia.**

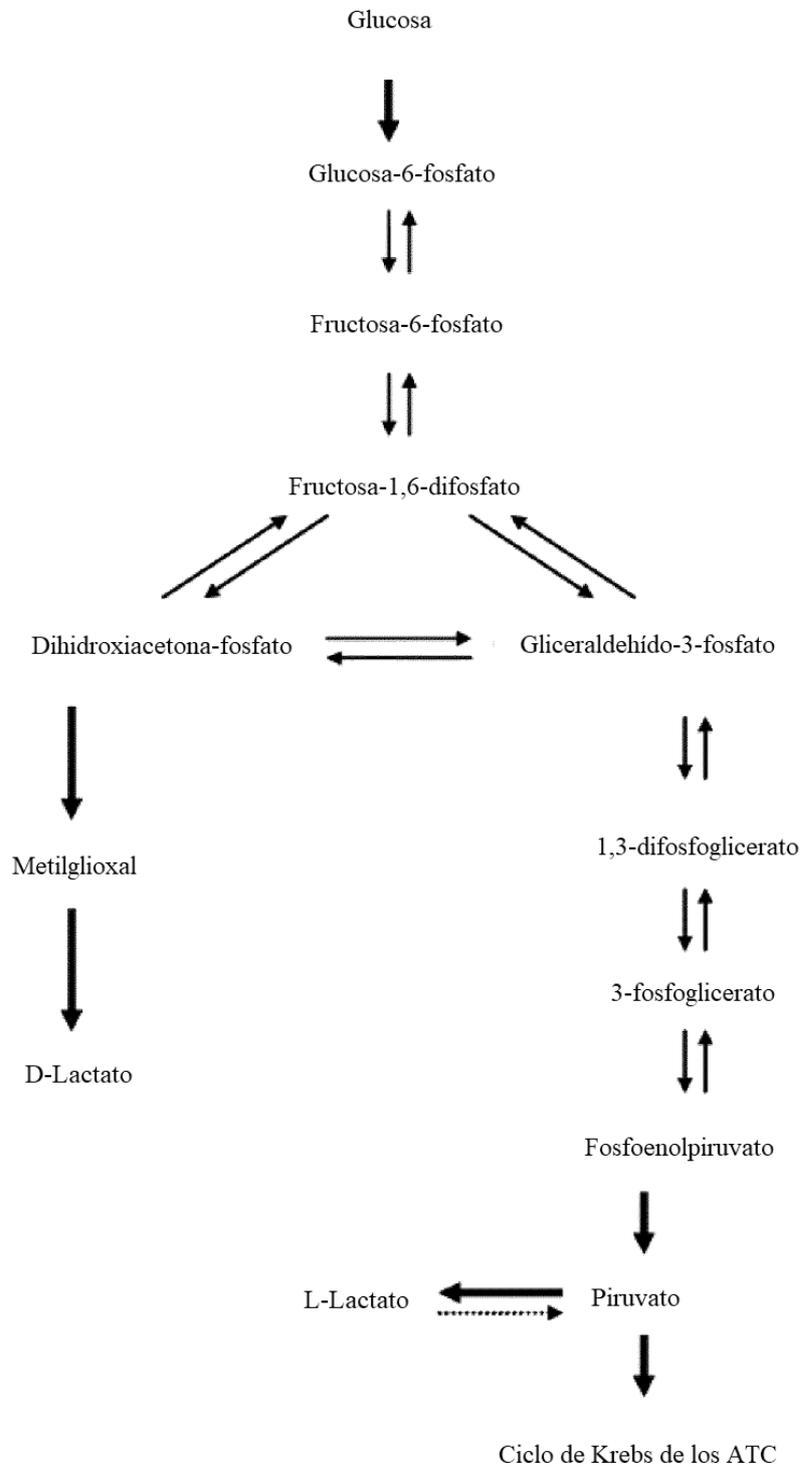
20 En caquexia, el índice I/G está aumentado o es normal en el 25 % de los casos, respectivamente y está disminuido en el 50 % de los casos; en función del estado avanzado de la caquexia, cuanto más bajo es el índice, más baja es la gravedad de la caquexia. De hecho, se sabe bien que un índice I/G aumentado se relaciona con la resistencia a la insulina, mientras que un índice I/G bajo se relaciona con una secreción deficiente de insulina por las células  $\beta$  del páncreas. Tal como se presenta en la Fig 8, en sujetos normales, el índice I/G es constante, independientemente del valor del nivel de MG en sangre, mientras que en pacientes de cáncer se correlaciona inversamente de manera significativa con los niveles de MG en sangre. Basándose en las consideraciones previas (véase anteriormente), el punto de intersección de las dos curvas define el límite a partir del cual el índice I/G en pacientes de cáncer se vuelve más bajo que el de los sujetos normales. Este punto de intersección se refiere, por lo tanto, a un valor crítico de MG (el así llamado valor de MG de control relacionado con la caquexia") por encima del cual se da una menor secreción de insulina en pacientes de cáncer que en sujetos sanos, un hallazgo que se asocia claramente con la caquexia. Esto significa que el valor de control de MG en sangre de  $0,2 \mu\text{M}$  que se ha determinado sobre la gráfica se corresponde con el valor límite de MG por encima del cual los pacientes de cáncer entran en caquexia o en precaquexia grave (Fig 8).

35 La medición de MG en la sangre de los pacientes de cáncer parece justificada con el fin de determinar el nivel de resistencia a la insulina en comparación con el de la secreción de insulina pancreática, y para reconocer de manera objetiva la entrada en un estado caquético o precaquético grave en estos pacientes.

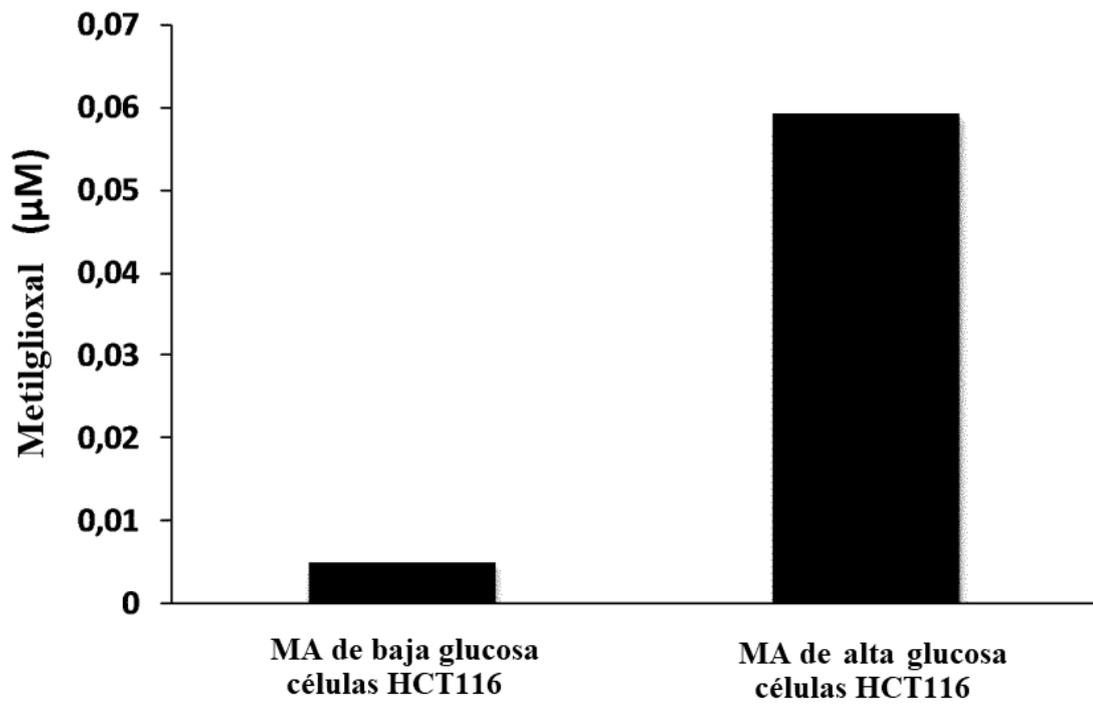
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento *in vitro* para la detección y diagnóstico temprano de cáncer en muestras biológicas de fluidos extracelulares en sujetos no diabéticos, que comprende las etapas de:
- 5 a) determinar el nivel de producción de metilgloxal (MG) en una muestra biológica de dichos sujetos a partir de un fluido extracelular;
- b) comparar dicho nivel de producción con un valor de control, es decir, con el nivel de MG en sujetos sin cáncer; en el que si el nivel de producción de MG en dichas muestras biológicas es mayor que dicho valor de control, se considera que dichos sujetos padecen cáncer.
- 10 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 que incluye el uso de espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF.
3. El procedimiento *in vitro* de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho valor de control es el nivel de producción de dicho MG que se ha medido en una muestra biológica de individuos sanos, y es preferentemente un valor de 0,06  $\mu$ M en la sangre.
- 15 4. El procedimiento *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre.
5. El procedimiento *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos tumores son cánceres de cabeza y cuello, de pulmón, de mama, de próstata, colorrectal, de páncreas u otros tumores digestivos, leucemia, linfoma, melanoma, sarcoma, cánceres infantiles, o cánceres de cerebro, urogenital, de útero o de ovario.
- 20 6. El procedimiento *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento se aplica a cualquiera de los tumores o de los procesos inflamatorios, permitiendo por lo tanto diferenciar tumores benignos de malignos y procesos inflamatorios de cáncer.
7. El procedimiento *in vitro* de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento se aplica para la detección del cáncer en sujetos asintomáticos.

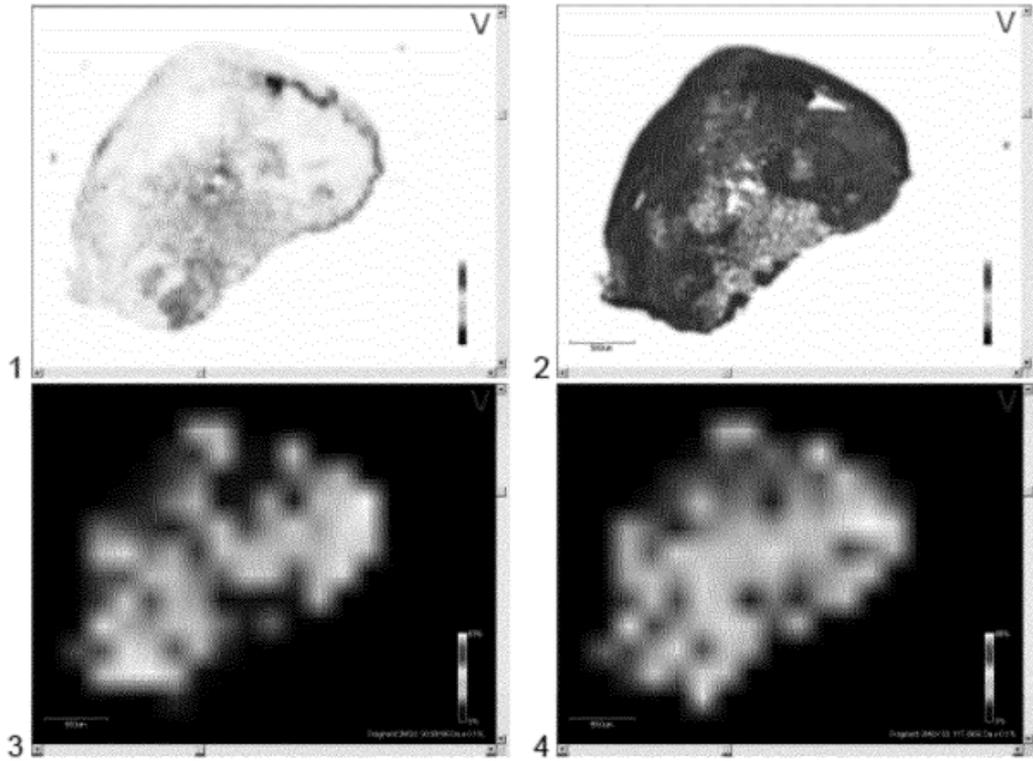
**FIGURA 1**



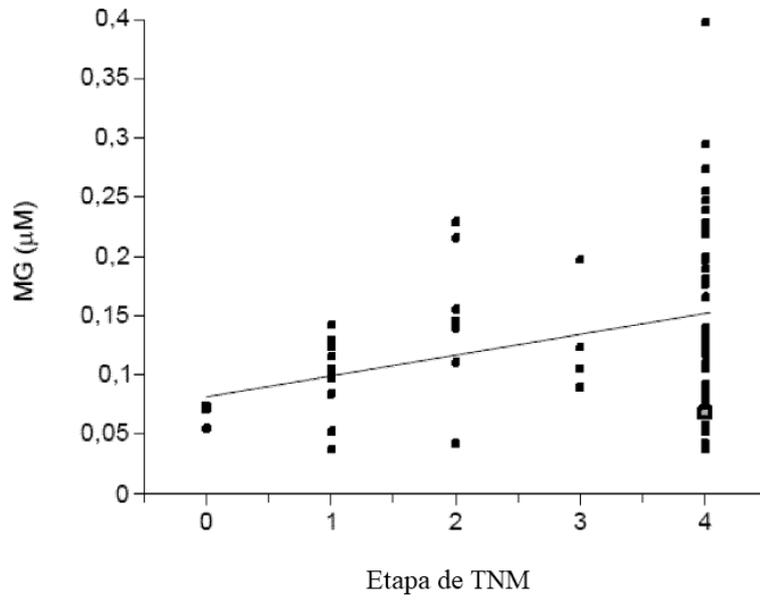
**FIGURA 1bis**



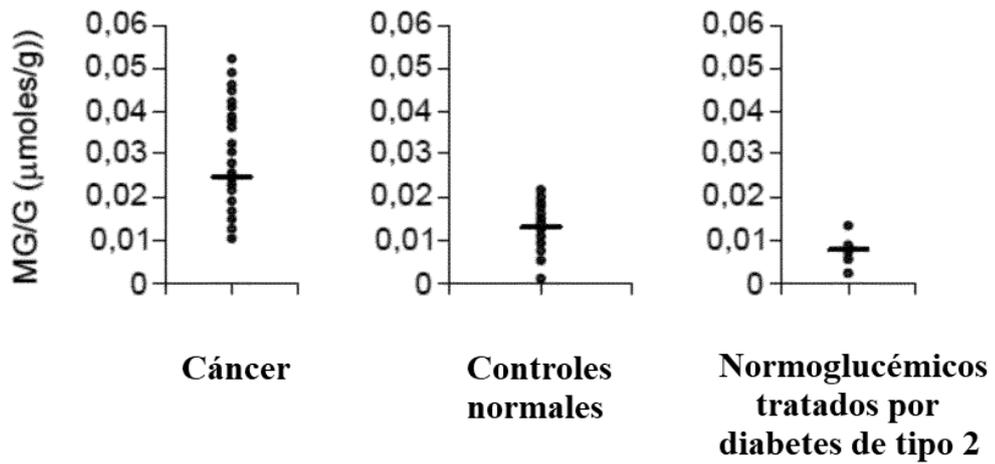
**FIGURA 2**



**FIGURA 3**



**FIGURA 4**



**FIGURA 5**

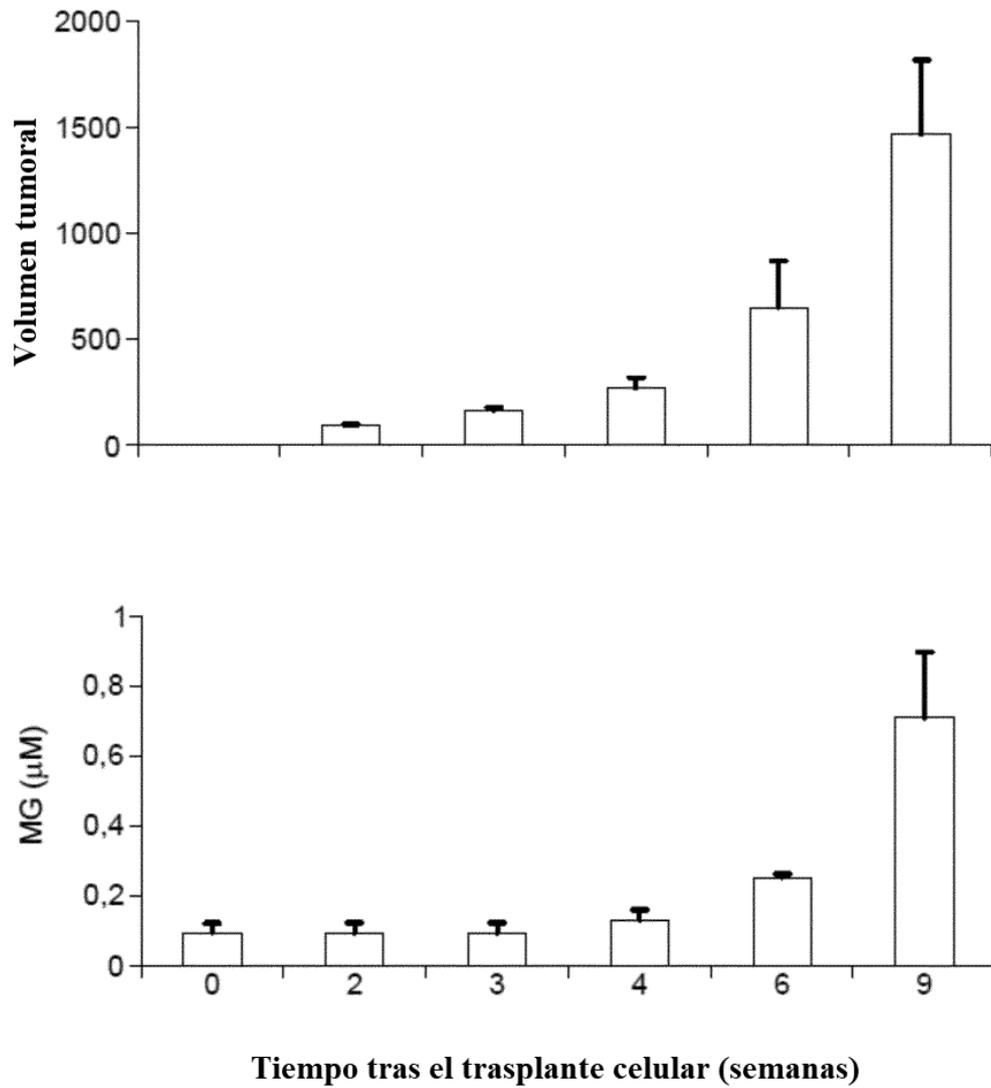


FIGURA 6

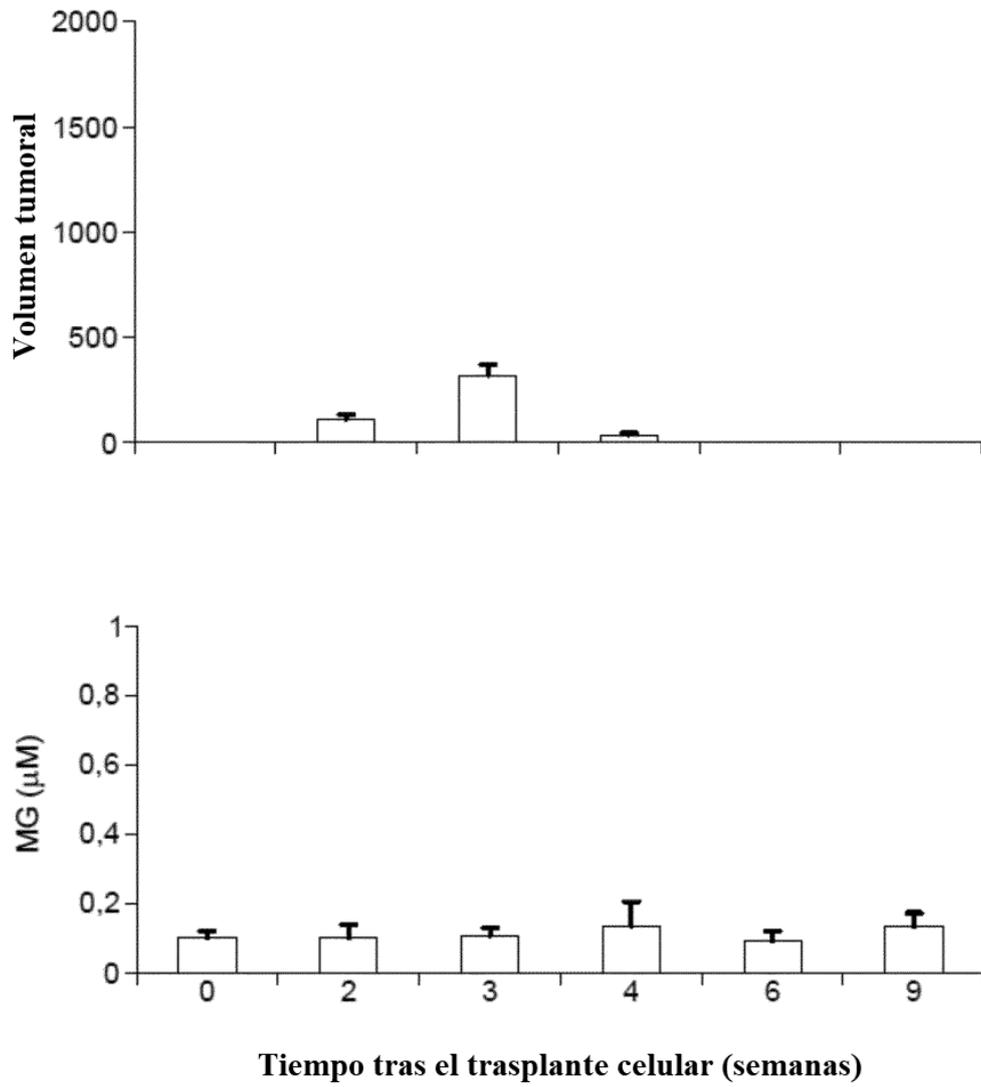
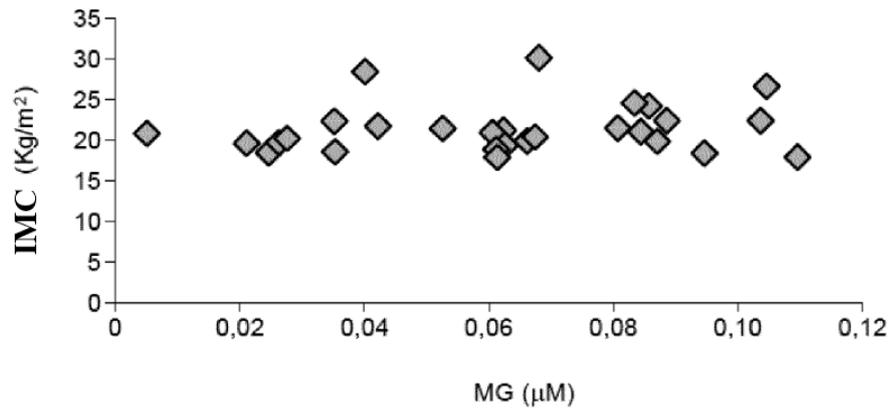


FIGURA 7

**A**



**B**

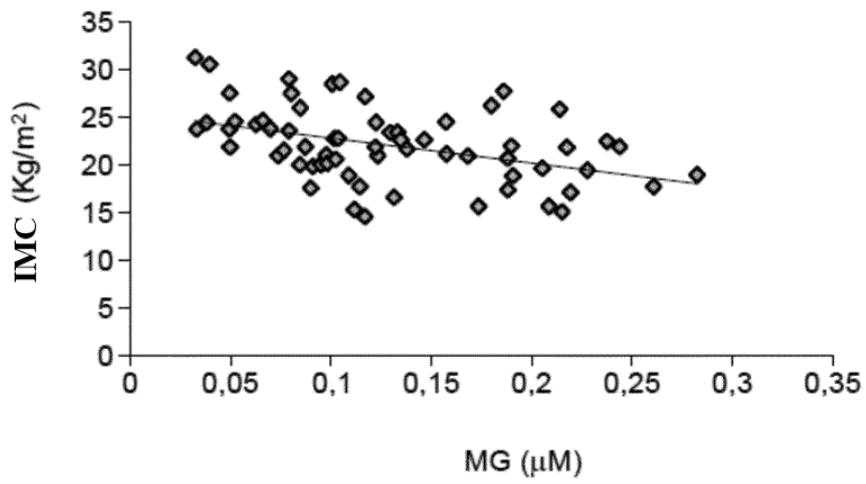


FIGURA 8

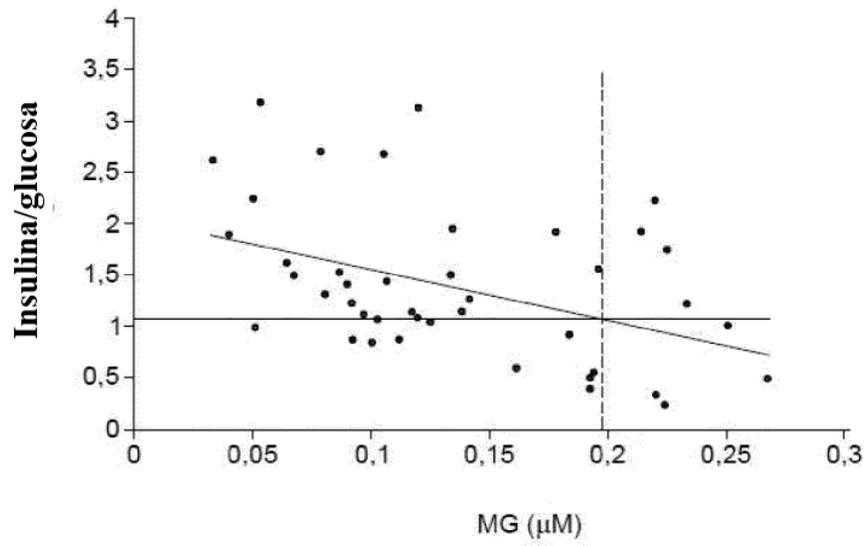


TABLA 1

	<b>Mujeres</b>	<b>Hombres</b>	<b>Total</b>
<b>Cáncer (101)</b>	<b>0,1320</b> +/-0,0628 [0,033-0,248] p<0,0001	<b>0,01361</b> +/-0,0794 [0,078-0,264] P<0,0001	<b>0,1339</b> +/-0,0703 [0,033-0,264] P<0,001
<b>Normoglucémicos tratados de diabetes de tipo 2 (12)</b>	<b>0,0526</b> +/-0,0155 [0,0416-0,0636] NS	<b>0,0701</b> +/-0,0299 [0,0306-0,1216] NS	<b>0,0676</b> +/-0,0281 [0,064-0,089] NS
<b>Sujetos normales (36)</b>	<b>0,0611</b> +/-0,0283 [0,021-0,109]	<b>0,0647</b> +/-0,0246 {0,040-0,104}	<b>0,0625</b> +/-0,0210 [0,021-0,109]

NS: No significativo

TABLA 2

Tipo de cáncer		Total
	N	MG promedio
Controles normales	36	<b>0,0625</b> +/-0,0210 [0,021-0,109]
Normoglucémicos tratados por diabetes de tipo 2	12	<b>0,0676</b> +/-0,0281 [0,064-0,089] NS
De cabeza y cuello	5	<b>0,1023</b> +/- 0,0308 [0,078-0,137] p=0,0086
De pulmón	24	<b>0,1578</b> +/-0,0530 [0,091-0,264] p < 0,0001
De mama	12	<b>0,0989</b> +/-0,0522 [0,033-0,191] p=0,010
De próstata	10	<b>0,1118</b> +/-0,047 [0,086-0,217] p=0,004
Colorrectal	9	<b>0,1358</b> +/-0,0838 [0,038-0,287] p < 0,0001
De páncreas	7	<b>0,1820</b> +/-0,0532 [0,0994-0,248] p < 0,0001
Otros tumores digestivos	12	<b>0,1428</b> +/-0,0667 [0,053-0,248] p < 0,0001
Otros tipos de cáncer*	22	<b>0,1207</b> +/-0,0636 [0,053-0,223] p < 0,0001
Total (cáncer)	101	

\*Otros tipos de cáncer incluyen el cáncer de tiroides, los cánceres de ovario y de endometrio, los cánceres de riñón y de vejiga, sarcoma, cánceres de origen indeterminado, leucemia y linfoma no hodgkiniano.

NS: No significativo

TABLA 3

<b>Respuestas clínicas</b>	<b>MG</b>
<i>Respuesta completa</i>	0,0610+/-0,0252
<i>Respuesta parcial</i>	0,1305+/-0,0721
<i>Estable/progresiva</i>	0,1405+/-0,0617

TABLA 4

	<b>MG</b>	<b>p</b>
<b>IMC&lt;18</b>	0,1743+/-0,055	<0,0001
<b>18&lt;IMC&gt;25</b>	0,1023+/-0,0719	<0,0001
<b>IMC&gt;25</b>	0,0969+/-0,0508	<0,0001