

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 988**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2012 PCT/JP2012/060114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.10.2012 WO12141285**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2012 E 12770851 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2698634**

54 Título: **Biomarcador para el cáncer de mama**

30 Prioridad:

15.04.2011 JP 2011091378

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

01.03.2018

73 Titular/es:

**J-PHARMA CO., LTD. (100.0%)
75-1 Onocho Tsurumi-ku Yokohama-shi
Kanagawa 230-0046, JP**

72 Inventor/es:

**ENDO HITOSHI y
OKAYASU ISAO**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 656 988 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

Biomarcador para el cáncer de mama

Campo de la técnica

5 La presente descripción se refiere a un biomarcador para cánceres de mama, específicamente a un kit y a un método para el diagnóstico de tumores de glándula mamaria.

Antecedentes de la técnica

10 Un transportador de aminoácidos neutros [transportador de aminoácidos de tipo L (LAT)] es una proteína de tipo transmembrana que se ocupa de la captación celular de aminoácidos neutros como glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, serina, treonina, cisteína, asparagina, glutamina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina, L-DOPA, y similares. Los autores de la presente invención han estado buscando varios LATs y han encontrado LAT1 e isoformas del mismo, concretamente, LAT2, LAT3 y LAT4.

15 Entre ellos, LAT1 es una proteína de dominio transmembrana de 12 pasos que tiene la capacidad de transportar aminoácidos neutros grandes como leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y similares; y L-DOPA, Na⁺ que coexiste con un factor de activación de transporte de aminoácido, 4F2hc de forma independiente. Además, LAT1 se expresa principalmente *in vivo* como en placenta, bazo, colon, testículos, y una barrera hematoencefálica. También, se reconoce la expresión de LAT1 en una línea celular humana de carcinoma de células en anillo de sello, una línea celular de cáncer de pulmón de células pequeñas, una línea celular de melanoma, una línea celular de neuroblastoma, y se confirma además mediante tinción inmunohistoquímica en tejidos tumorales de cánceres de riñón, cánceres de vejiga y cánceres de próstata (consúltese bibliografía de Patente 1, bibliografía de Patente 9, bibliografía de no Patente 1 y bibliografía de no Patente 2). Además, usando anticuerpo anti-LAT1, se detectó la expresión en líneas celulares cancerosas (consúltese bibliografía de Patente 8) y los niveles de expresión de LAT1 se pueden usar para diagnosticar la malignidad de tumores de mama, particularmente, carcinoma ductal de mama (consúltese bibliografía de no Patente 12). La supresión de la expresión de LAT1 por supresores como melfalán, BCH, y similares disminuyen notablemente la velocidad de crecimiento de células cultivadas que están expresando LAT1. Por lo tanto, la captación intracelular de aminoácidos esenciales por LAT1 es absolutamente indispensable para la proliferación celular, y se ha creído que la expresión de LAT1 a un nivel alto ayuda a las células cancerosas a obtener un estado nutricional superior en comparación con las células normales, de este modo las células cancerosas son predominantes en la proliferación celular sobre las células normales.

20 30 LAT2, que es la isoforma de LAT, tiene una estructura transmembrana que se extiende dentro de la membrana intracelular 12 veces así como LAT1, y tiene una selectividad de sustrato en una amplia gama lo que permite un transporte independiente de Na⁺ de todos los aminoácidos, incluyendo pequeños aminoácidos como glicina, alanina, serina, treonina, cisteína, asparagina, y glutamina además de aminoácidos grandes, coexistiendo con 4F2hc (Bibliografía de Patente 10). Se ha confirmado que LAT2 se expresa en tejidos normales en el cerebro, músculo esquelético, riñón, yeyuno, íleon, testículo, y placenta, pero no en tejidos tumorales (consúltese Bibliografía de Patente 2 y Bibliografía de no Patente 3). Puesto que la afinidad de LAT2 con un sustrato es baja en comparación con la de LAT1, se cree que LAT2 juega un papel en el transporte de aminoácidos neutros en células de tejidos normales que no requieren proliferación celular activa.

35 40 Además, los autores de la presente invención han encontrado varios transportadores que incluyen un transportador de aminoácidos neutros pequeños independiente de sodio que transporta aminoácidos de formas L- y D (consúltese la Bibliografía de Patente 3), y también un transportador de los cuales los sustratos son cisteína, aminoácidos básicos, y aminoácidos neutros (consúltese la Bibliografía de Patente 4). Se define un transportador como una proteína de tipo transmembrana que tiene una función de captación de varias sustancias que son esenciales para las células de una manera específica de sustrato, por lo que es esencial para el mantenimiento y proliferación de los tejidos corporales. Por lo tanto, se han propuesto muchos métodos para el diagnóstico de enfermedades utilizando varios transportadores. Por ejemplo, se han descrito métodos que incluyen uno para detectar la presencia o ausencia de la expresión de una proteína o para determinar la cantidad de proteína en muestras derivadas de órganos o de parte de los mismos que contienen células tumorales, tejidos tumorales, o tumores (consúltese la Bibliografía de Patente 1); un método para el diagnóstico de enfermedades pulmonares/torácicas caracterizadas por el uso del anticuerpo de un transportador aniónico (consúltese la Bibliografía de Patente 5); un método para diagnosticar si los pacientes están afectados del síndrome de trastorno de integración mediante una valoración cuantitativa de una proteína, un fragmento de la misma, o ácido nucleico de un transportador de urea del eritrocito como un índice (consúltese la Bibliografía de Patente 6); un método para discriminar la benignidad de tumores malignos que sobreexpresan GLUT-1 mediante una preparación citológica de fluido de la cavidad corporal y comparando el nivel de expresión de GLUT-1 con una muestra de tejido obtenida de la sección de tejidos no malignos del mismo tipo de tejidos que usan un anticuerpo que se une al transportador de glucosa transmembrana GLUT-1 (consúltese la Bibliografía de Patente 7).

Se conocen principalmente tres biomarcadores destinados para usar en el tratamiento del cáncer de mama, es decir,

5 el receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PgR) y HER2 (un receptor de factor de crecimiento, que también se conoce como EGFR2). En caso de que se lleve a cabo un método de inmunohistoquímica o de FISH para cada biomarcador en tejidos tumorales y se encuentren casos positivos, se ha elegido el método de tratamiento dirigido a un biomarcador correspondiente para casos que presentan positividad para cada biomarcador (consúltese la Bibliografía de no Patente 13 y Bibliografía de no Patente 14). Por otra parte, un cáncer de mama que presenta negatividad para todos estos marcadores (tres proteínas, que son un receptor hormonal de estrógenos, un receptor hormonal de progesterona y HER2 no se expresan en células tumorales en cáncer) se denomina como cáncer de mama triple negativo, que representa el 12 al 15% de la población total de los casos de cáncer de mama (consúltese la Bibliografía de no Patente de 7 a 10). Hasta ahora no se ha desarrollado un método de tratamiento apropiado para el cáncer de mama triple negativo. Los pacientes tienen mal pronóstico en comparación con aquellos cánceres de mama que presentan positividad a cualquiera de los tres marcadores (consúltese la Bibliografía de no Patente 9 y 10).

15 También, se lleva a cabo un método histopatológico que usa especímenes teñidos con HE (hematoxilina-eosina) convencional para la discriminación entre el carcinoma ductal in situ maligno (de aquí en adelante denominado como DCIS) y el papiloma intraductal de mama benigno (papiloma intraductal de mama) en tumores de mama intraductales. Sin embargo, no están claros los elementos bien definidos de discriminación, ya que hay muchas lesiones que son difíciles de discriminar entre benignidad y malignidad. Por lo tanto, se necesita el desarrollo de un marcador que proporcione una discriminación más explícita.

Lista de citaciones

20 Bibliografía de patentes

Bibliografía de Patente 1: JP 2000-157286 A

Bibliografía de Patente 2: JP 2000-342270 A

Bibliografía de Patente 3: JP 2001-211886 A

Bibliografía de Patente 4: JP 2001-46070 A

25 Bibliografía de Patente 5: JP 2001-228146 A

Bibliografía de Patente 6: JP 2001-245661 A

Bibliografía de Patente 7: JP 11-511245 W

Bibliografía de Patente 8: JP 2011-024537 A

Bibliografía de Patente 9: EP 2146208 A1

30 Bibliografía de Patente 10: JP 2000-342270 A

Bibliografía de No Patentes

Bibliografía de No Patente 1: Kanai, Y., et al., J. Biol. Chem., 273, 23629-23632, 1998

Bibliografía de No Patente 2: Yanagida O., et al., Biochim. Biophys. Acta., 1514(2), 291-302, 2001

Bibliografía de No Patente 3: Segawa, H., et al., J. Biol. Chem., 274(28), 19745-19751, 1999

35 Bibliografía de No Patente 4: Sakata, T., et al., Pathol. Int., 59, 7-18, 2009

Bibliografía de No Patente 5: Ichinohe, M., et al., Pathol. Int., 2011 en prensa

Bibliografía de No Patente 6: Oda, K., et al., Cancer Sci., 101, 173-179, 2010

Bibliografía de No Patente 7: Rakha, E. A., et al., Cancer, 109, 25-32, 2007

Bibliografía de No Patente 8: Liedtke, C., et al., J. Clin. Oncol., 26, 1275-1281, 2008

40 Bibliografía de No Patente 9: Sasaki, Y., et al., Breast Cancer, 16, 254-259, 2009

Bibliografía de No Patente 10: Iwase, H., et al., Breast Cancer, 17, 118-124, 2010

Bibliografía de No Patente 11: Sinicrope, F. A., et al., Cancer Res., 55, 237-241, 1995

Bibliografía de No Patente 12: Uchigasaki, S., et al., Japanese J. of Diagnostic Pathology, 19, 189-194, 2002

Bibliografía de No Patente 13: Sasaki et al., Pathology and Clinical Medicine, 24, 625-633, 2006

Bibliografía de No Patente 14: Nakamura, H., et al., Modern Medical Laboratory, 38, 1003-1008, 2010

Resumen de la invención

Problema técnico

5 La presente invención proporciona un método y uso de un kit para el diagnóstico de tumores de glándula mamaria. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de un kit y un método para el diagnóstico del cáncer triple negativo que es negativo para la totalidad de ER, PgR y HER2.

Solución al problema

10 Los autores de la presente invención se han centrado en y han investigado un transportador de aminoácidos de tipo canceroso que era específicamente aprovechado por las células cancerosas, que apunta al desarrollo de una terapia molecular dirigida para el cáncer. LAT2 se usó principalmente para el estudio de células normales y LAT1, que posee la capacidad de captación eficiente de aminoácidos, se usó para el estudio de células cancerosas. Los autores de la presente invención produjeron un anticuerpo monoclonal de ratón contra LAT1, y desarrollaron un método inmunohistológico de investigación utilizando este anticuerpo (consúltese la Bibliografía de No Patente 4).
 15 Los autores de la invención han encontrado que los casos que presentan la expresión de LAT1 a un alto nivel en pacientes con cáncer de próstata y cáncer gástrico tenían un pronóstico significativamente peor en comparación con los casos que expresan LAT1 a un bajo nivel usando este método (consúltese la Bibliografía de No Patente 4 y 5). Además, los autores de la invención también han desarrollado una terapia para el cáncer que integra diagnóstico y tratamiento así como el desarrollo de sustancias supresoras específicas de LAT1 (consúltese la Bibliografía de No Patente de 4 a 6).

20 Los autores de la presente invención han estudiado ampliamente la expresión de LAT1 en el tumor de mama intraductal mediante una técnica inmunohistológica que usa el anticuerpo monoclonal anti-LAT1 que apunta al objetivo de establecer una terapia molecular dirigida cuyo objetivo sea este LAT1 en el cáncer de mama, basada en un hallazgo de que LAT1 se expresa en el cáncer en un nivel alto con captación eficiente de aminoácidos que promueven la proliferación de las células cancerosas como se ha mencionado anteriormente. Como resultado, los
 25 autores de la invención han encontrado que la expresión de LAT1 en el carcinoma ductal in situ es alta en comparación con el papiloma intraductal de mama, y que un método de tinción inmunológica es útil para la discriminación entre benignidad y malignidad de los tumores de mama intraductales.

30 Además, los autores de la invención encontraron que el uso de anticuerpos monoclonales anti-LAT1 en tejidos de cánceres de mama triple negativos, que son negativos para la totalidad de ER, PgR, y HER2, revelaron la expresión de LT1 a un nivel alto en 14 de los 17 casos.

Además, los autores de la presente invención han encontrado que LAT1, que es un transportador para aminoácidos esenciales específicamente en el cáncer de riñón o de vejiga, y LAT2, que se encuentra en células normales. De modo sorprendente, los autores de la presente invención encontraron que LAT1 se expresaba en los así llamados tejidos de cáncer de mama triple negativos con una alta probabilidad.

35 La presente invención se refiere a el uso de un kit para el diagnóstico que incluye un anticuerpo monoclonal anti-LAT1 para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 para el diagnóstico del tumor de glándula mamaria.

La presente invención se refiere al uso de un kit para el diagnóstico según la sentencia anterior, en donde el tumor de glándula mamaria es un tumor de mama intraductal y se diagnostica el grado de malignidad en el tumor de glándula mamaria.

40 La presente invención se refiere al uso de un kit para el diagnóstico de tumores de glándula mamaria que comprende un kit de tinción inmunológica del receptor de estrógeno, un kit de tinción inmunológica del receptor de progesterona y un kit de tinción inmunológica de HER2, y un kit de tinción inmunológica de LAT1.

45 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de tumores de glándula mamaria que incluye las etapas de detectar, identificar, o cuantificar LAT1 en el tejido poniendo en contacto el anticuerpo monoclonal anti-LAT1 con tejidos de glándula mamaria extraídos de sujetos.

La presente invención se refiere al método según la sentencia anterior, en donde los tumores de glándula mamaria son tumores intraductales de mama en incluye el diagnóstico del grado de malignidad de los mismos.

50 La presente invención es un método para el diagnóstico de tumor de glándula mamaria que incluye una tinción inmunológica del receptor de estrógeno, una tinción inmunológica del receptor de progesterona, una tinción inmunológica de HER2 y LAT1.

Efectos ventajosos de la invención

Según la presente invención, el diagnóstico se puede fácilmente llevar a cabo para mostrar las pautas para el tratamiento de tumores de glándula mamaria, lo que hasta ahora es difícil de hacer. Más específicamente, el

examen de la expresión de LAT1 en el cáncer de mama mediante tinción inmunológica que usa el anticuerpo anti-LAT1 de tumores de glándula mamaria permite dirigir una terapia contra el cáncer eficaz para los cánceres de mama para los cuales la diana es LAT1.

5 Según la presente invención, se puede realizar fácilmente la discriminación entre benignidad (papiloma intraductal de mama) y malignidad de tumores de mama intraductales (carcinoma ductal in situ), de los cuales era difícil el diagnóstico.

Se pueden proporcionar pautas altamente precisas del tratamiento en diagnóstico del cáncer de mama mediante el uso combinado de un anticuerpo monoclonal anti-LAT1 con ER, PgR y HER2 que han sido convencionalmente conocidos como marcadores.

10 En la presente invención, los tumores de glándula mamaria no están particularmente limitados siempre y cuando los tejidos de glándula mamaria contengan tumores. Ejemplos típicos incluyen, por ejemplo, tumores benignos como papiloma intraductal de mama, adenoma del pezón, y similares; tumores malignos como cánceres no infiltrantes (carcino intraductal in situ, y similares), carcinomas infiltrantes [carcinoma ductal in situ (carcinoma papilotubular, carcinoma tubular sólido, carcinoma escirroso), tipo específico], enfermedad de Paget, y similares. Además, los
15 tumores de glándula mamaria se dividen en cáncer de mama, que es un tumor maligno, y tumores benignos según otra clasificación.

Los tumores intraductales de mama no están particularmente limitados siempre y cuando los tumores estén contenidos dentro de los ductos mamarios. Ejemplos típicos incluyen, por ejemplo, papiloma intraductal de mama (tumor benigno) y carcinoma ductal in situ (tumor maligno).

20 **Breve descripción de las figuras**

La Fig. 1 muestra la línea de base de la intensidad de expresión de LAT1. La incidencia de LAT1 se determina en base al grado de esta tinción.

La Fig. 2 muestra la comparación de la expresión de LAT1 entre papiloma intraductal de mama y carcinoma ductal in situ.

25 La Fig. 3 muestra un caso que expresa LAT1 a un nivel alto en los tejidos de cáncer de mama triple negativo que es negativo para la totalidad de ER, PgR y HER2.

La Fig. 4 muestra un caso que expresa LAT1 en los tejidos de cáncer de mama negativo para HER2.

La Fig. 5 muestra un caso que expresa LAT1 en los tejidos de cáncer de mama positivo para HER2.

La Fig. 6 muestra la comparación de la expresión de LAT1 en las lesiones de tumor de glándula mamaria.

30 **Descripción de las realizaciones**

El LAT usado en la presente invención es una proteína funcional que tiene la capacidad de transportar a través de la membrana celular aminoácidos esenciales que son un requisito previo para la proliferación celular, especialmente el LAT expresado específicamente en células cancerosas es una proteína funcional que es idéntica en la función del
35 transporte a través de membrana celular de aminoácidos esenciales, lo que evidencia el crecimiento de las células cancerosas. Por lo tanto, el método descrito en la presente invención que usa más de dos LAT incluyendo estos distintos tipos de LAT no solamente permite la valoración de la presencia o ausencia de cáncer sino también la evaluación precisa de los grados de malignidad en el cáncer.

Una de las características de la presente descripción es que el examen de la expresión de LAT1 en el cáncer de mama mediante tinción inmunológica que usa el anticuerpo anti-LAT1 de tumores de glándula mamaria permite
40 realizar una terapia eficaz del cáncer para cánceres de mama de los cuales la diana es LAT1.

En la presente invención, el LAT que se expresa en células normales incluye, por ejemplo, LAT2.

Las muestras incluyen, por ejemplo, células tumorales de glándula mamaria de mamíferos que incluyen seres humanos. En la presente descripción, un método no está particularmente limitado siempre y cuando los métodos puedan detectar, identificar, o cuantificar LAT1 en muestras, un método preferible incluye un método para usar el
45 anticuerpo de LAT1. Como los anticuerpos de LAT1, siempre y cuando sean un anticuerpo que tiene reactividad con la longitud total o parcial de la proteína LAT1 y especificidad para LAT1, sin embargo no está particularmente limitado.

Se puede producir el anticuerpo según los métodos de producción de anticuerpos que se conocen públicamente. Específicamente, el anticuerpo contra LAT1 puede ser cualquiera de los siguientes; un tipo natural de anticuerpo que
50 se produce inmunizando con LAT1 o la parte de LAT1 en la presente invención (que incluye una forma natural, una forma recombinante, un compuesto químico) o células que expresan la proteína como un agente inmunogénico para mamíferos no humanos como ratones, ratas, hamsters, cobayas, pollos, conejos, cabras, y ovejas para obtener un

anticuerpo de tipo natural según un procedimiento común; un anticuerpo monoclonal quimera recombinante y un anticuerpo monoclonal de tipo humano recombinante que se produce usando una tecnología genética de recombinación (anticuerpo injertado con CDR); y un anticuerpo de tipo humano que se produce usando animales transgénicos y similares. Un anticuerpo monoclonal también incluye anticuerpos monoclonales que tienen cualquiera de los isotipos de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE. Preferiblemente, el isotipo del anticuerpo monoclonal es IgG o IgM.

El anticuerpo es preferible que sea marcado, o usado con una modificación que se pueda marcar con el fin de que se puede detectar, identificar, o cuantificar como señales el resultado obtenido en el estudio usando el anticuerpo. El anticuerpo marcado incluye un anticuerpo que está marcado con una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, biotina, avidina o radioisótopo como ^3H , ^{14}C , ^{125}I , o un anticuerpo que tiene una capacidad de unión con tales sustancias marcadas.

Una "sustancia marcadora que permite obtener señales detectables por sí misma o que reacciona con otros materiales" para marcar el anticuerpo en la presente invención significa una sustancia que se usa para convertir la presencia del anticuerpo monoclonal para ser una señal detectable uniéndose al anticuerpo anterior mencionado física o químicamente. Específicamente, una sustancia de este tipo incluye una enzima, una sustancia fluorescente, una sustancia quimioluminiscente, biotina, avidina, el radioisótopo, o similares. Específicamente, los ejemplos incluyen enzimas como peroxidasa [por ejemplo, peroxidasa de rábano, etc.], fosfatasa alcalina, β -D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, penicilinas, catalasa, apoglucosa oxidasa, ureasa, luciferasa, o acetilcolinesterasa, y similares; sustancias fluorescentes como isotiocianato de fluoresceína, ficobiliproteína, quelato metálico de tierras raras, cloruro de dansilo, isotiocianato de tetrametilrodamina, y similares; radioisótopos como ^3H , ^{14}C , ^{125}I , y similares; biotina, avidina, o sustancias quimioluminiscentes.

En esta memoria, los radioisótopos y sustancias fluorescentes pueden irradiar independientemente señales detectables. Sin embargo, las enzimas, sustancias quimioluminiscentes, biotina, o avidina por sí solos no pueden irradiar señales detectables como son. Se pueden obtener señales detectables mediante reacción con una o más sustancias. Por ejemplo, en caso de que se use una enzima, es necesario al menos un sustrato para obtener señales detectables. Para este fin, se usan varios sustratos dependiendo de los métodos de medida de las actividades enzimáticas (un método colorimétrico, un método de fluorescencia, un método de bioluminiscencia o un método de quimioluminiscencia, y similares). Por ejemplo, en caso de que se use peroxidasa, se usa peróxido de hidrógeno como un sustrato. Además, en caso de que se use biotina, generalmente se hace reaccionar al menos avidina o enzima modificada con avidina (por ejemplo, estreptavidina- β -galactosidasa) como un sustrato pero no se limita a esto. Además, se usan varias sustancias cromogénicas dependiendo del sustrato cuando sea necesario. Por ejemplo, en caso de se usa como un sustrato para la biotina estreptavidina- β -galactosidasa, se puede usar 4-metil-umbeliferil- β -D-galactósido como una sustancia cromogénica.

El anticuerpo marcado se puede usar para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 en la presente invención, se pueden realizar métodos de medición para este fin usando técnicas inmunohistológicas ampliamente disponibles según un procedimiento común (por ejemplo, consúltese el volumen Experimental Medicine Supplemental, "Cell engineering Handbook", Yodosha Co. Ltd., pags. 201-213, 1992). Es más, el anticuerpo marcado se puede emplear no solamente para la prueba inmunohistológica, sino también para un método de transferencia de western, que incluye preparar una proteína de membrana soluble a partir de células, tejidos u órganos en muestras, o la parte de la misma según un procedimiento común, y confirmar la presencia o ausencia de LAT1 en la proteína de membrana soluble haciendo reaccionar el anticuerpo marcado con la proteína de membrana soluble. En el método de medición inmunológico, se puede usar el anticuerpo marcado con cualquier sustancia marcada mencionada anteriormente, un anticuerpo monoclonal marcado con una enzima como peroxidasa y similares, o se usa preferiblemente marcado con biotina en la luz de la sensibilidad de detección y de la sensibilidad de cualificación en el alto grado o la conveniencia de manipulación.

Se puede realizar un método para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 en la presente invención mediante la técnica inmunohistológica y similares. Específicamente, por ejemplo, se pueden enumerar métodos que contienen los siguientes procesos (1) y (2).

(1) Un proceso de poner en contacto el anticuerpo anti-LAT1 marcado de la presente invención con una muestra; y

(2) Un proceso de medir el anticuerpo marcado unido a LAT1 en la muestra detectando las intensidades de fluorescencia, quimioluminiscencia, o radioactividades dependiendo de los tipos de las sustancias marcadoras unidas al anticuerpo.

Más específicamente, por ejemplo, se pueden incluir los siguientes procesos.

(Proceso 1) Un proceso para preparar una muestra fijada que se extrae a partir de una muestra de ensayo, y fijada con paraformaldehído y similares;

(Proceso 2) Un proceso para someter la muestra fijada a una reacción antígeno-anticuerpo añadiendo el anticuerpo marcado en la presente invención, que está marcado con una enzima como biotina o peroxidasa;

(Proceso 3) Un proceso de añadir varios sustratos, avidina o enzima modificada con avidina como estreptavidina- β -galactosidasa, y similares dependiendo de los tipos de enzimas usadas, y además haciendo reaccionar el sustrato, avidina o enzima modificada con avidina con la sustancia marcadora del anticuerpo marcado después de lavar la muestra fijada cuando sea necesario;

- 5 (Proceso 4) Un proceso de añadir varios sustratos (por ejemplo, 4-metil-umbeliferil- β -D-galactósido, y similares) dependiendo de los tipos de enzimas para la modificación, y haciendo reaccionar la enzima unida a avidina con el sustrato en caso de que se añada enzima modificada con avidina en el Proceso 3;

(Proceso 5) Un proceso de lavar la muestra fijada cuando sea necesario, y detener la reacción enzimática y la reacción cromogénica; y

- 10 (Proceso 6) Un proceso de medir las intensidades colorimétricas, intensidades de fluorescencia o intensidades luminiscentes a través de la observación de la muestra fijada bajo microscopía.

El método para detectar, identificar, o cuantificar en la presente invención se explica adicionalmente en detalle por el ejemplo del método de detección de células cancerosas en tejidos de glándula mamaria usando una técnica de tinción inmunológica. El método de la presente invención es uno que detecta células cancerosas o fragmentos de las mismas en tejidos de glándula mamaria, y diagnostica el grado de su malignidad. Ya que el método de la presente invención puede proporcionar observación visual directa de la presencia o ausencia de LAT1 mediante tinción inmunológica, se puede llevar a cabo la evaluación ya sea negativa o positiva de la muestra de una manera simple y certera sin necesidad de conocimientos especiales.

- 20 Ejemplos especiales del método para detectar, identificar, o cuantificar en la presente invención incluyen, por ejemplo, los siguientes métodos descritos en (1) a (4) pero no particularmente limitados a estos.

(1) Detección de células cancerosas mediante tejidos y un método de frotis

Un tejido extraído se sometió a fijación con formalina e inclusión en parafina, y después se prepara una sección de tejido de 3 μ m de grosor y se coloca sobre un portaobjetos de vidrio. Después de desparafinar esta sección, se trata de modo independiente con anticuerpos anti-LAT1 y anti-LAT2 que se pueden unir específicamente a un transportador de aminoácidos (tratamiento de un anticuerpo primario). Después de tratar con el anticuerpo primario, la muestra se trata de modo independiente con un anticuerpo secundario, que se puede unir específicamente al anticuerpo primario, marcado con una enzima o colorante fluorescente como DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina), verde de metilo, Hematoxilina de Mayer, y similares (tratamiento del anticuerpo secundario marcado). Cuando se usa el anticuerpo secundario marcado con una enzima, se añade una solución de sustrato, posteriormente la mezcla de reacción produce color, y se evalúa a continuación ya sea positiva o negativa mediante la observación de las células usando un microscopio de luz. Cuando se usa el anticuerpo secundario marcado con colorante fluorescente, se evalúa la presencia o ausencia de células cancerosas después del tratamiento con el anticuerpo secundario mediante la observación con un microscopio de fluorescencia. En el método de frotis, la célula extraída se pega sobre el vidrio tal como es o se separa en un componente celular y un componente líquido con una centrífuga y entonces el componente celular (sedimento) se somete a tinción inmunológica. Es decir, el sedimento se pega sobre el portaobjetos de vidrio, y se fija después con una solución de etanol o una solución de formalina al 10%. Más tarde la sección de tejido se somete a tinción inmunológica y se evalúa.

(2) Detección de célula cancerosa mediante un método de crio-inclusión

El tejido extraído se congela rápidamente con nitrógeno líquido después de la inclusión con un Compuesto OCT, y luego se prepara un espécimen en portaobjetos cortando en finas láminas con un criostato. Este espécimen se fija con formalina al 10% o una solución de etanol y similares, y después se somete a tinción inmunológica con el método descrito en (1). En caso de que se usen células extraídas, las células se separan con una centrífuga y el sedimento resultante se fija con formalina al 10%, y las células se vuelven a centrifugar después desechando el sobrenadante para obtener un componente celular. Se añade agarosa al 2% (50 μ l) al componente celular mientras se calienta con un bloque caliente y se mezcla. Posteriormente, la célula se fija a una temperatura de 4°C y el componente sedimentario se encapsula en un gel. El gel solidificado se incluye con un Compuesto OCT, del que se prepara un bloque congelado, se prepara un portaobjetos con el espécimen cortando en finas láminas el bloque congelado con un criostato. Las células del portaobjetos con el espécimen se tratan según un método común y se tiñen con inmunohistoquímica de fluorescencia. El espécimen se observa después de la tinción bajo un microscopio de fluorescencia para evaluar la presencia o ausencia de células cancerosas.

(3) Detección de células cancerosas mediante un método de inclusión en parafina de la célula extraída

El gel incluido en el sedimento se trata mediante el método siguiente dependiendo de la situación, y se puede llevar también a cabo la evaluación de la presencia o ausencia de células cancerosas usando el espécimen parafinado. El gel se trata con formalina al 4% a una temperatura de 4°C durante toda la noche, y se lava después con PBS. Posteriormente se somete a deshidratación y penetración según un método convencional. Después de la penetración, el gel se incluye con parafina y se prepara un bloque de parafina. El bloque preparado se corta

finamente en láminas con un micrótopo, y se prepara el portaobjetos con el espécimen. El portaobjetos con el espécimen preparado se somete a tratamiento de desparafinización según un método convencional, y se lleva a cabo la inmunohistoquímica de fluorescencia. Posteriormente, se observa el espécimen bajo un microscopio de fluorescencia y se evalúa la presencia o ausencia de células cancerosas. Se pueden detectar tejidos de cáncer de mama mediante el método de la presente invención usando la técnica de inmunohistoquímica y similares.

(4) Detección de células cancerosas mediante un método que usa ELISA

Se pueden cuantificar los niveles de proteína de LAT1 en el tejido extraído mediante la detección de la proteína LAT1 presente en el tejido extraído por un método de ELISA, por lo tanto se hace factible una evaluación más cuantitativa. La muestra se trata con tensioactivo y ultrasonidos, y se separa con una ultracentrífuga a una temperatura de 4°C a 100.000 x g para obtener un sedimento de proteína desechando el sobrenadante. Al sedimento se le añade PBST/BSA al 10% en una cantidad apropiada y se resuspende por el tratamiento de ultrasonidos. Este se usa como una muestra y se lleva a cabo un método de ELISA.

En primer lugar, se añade la muestra a una placa inmunológica a una concentración de 100 µl/pocillo y se deja a temperatura de 4°C durante toda la noche. La solución de muestra se descarta y se añade una solución de bloqueo, y la placa se deja después a temperatura ambiente durante 1 hora. Se desecha la solución de bloqueo en el pocillo y se añade una solución de anticuerpo primario anti-LAT1 apropiadamente diluido, y la placa se deja después a temperatura ambiente durante 2 horas (durante esta reacción, el anticuerpo anti-LAT1 se une de forma independiente a la proteína LAT1 pegada sobre el fondo del pocillo). El anticuerpo primario se descarta y se lava con PBST, y después se añade un anticuerpo secundario marcado diluido arbitrariamente, y la placa se deja después a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lava el interior del pocillo con PBST y se añade una solución de sustrato para que produzca color o quimioluminiscencia. La presencia o ausencia de proteína LAT1 se confirma y se evalúa midiendo las cantidades de colorante o las intensidades de luminiscencia con un espectrofotómetro o con un luminómetro.

Una característica de la presente invención es que se pueden evaluar los grados de malignidad de tumores en tejidos intraductales de mama. El método de evaluación de los grados de malignidad de tumores en tumores intraductales de mama en la muestra incluye la medida cuantitativa de LAT1. Es decir, se puede obtener la cantidad de células normales cuantificando LAT1 expresado en células normales, y se puede obtener también la cantidad de células tumorales cuantificando LAT1 expresado en células tumorales. Además, estas células requieren el mismo tipo de LAT; por lo tanto los valores cuantitativos de ambas células pueden indicar el porcentaje de las células que se convierten en células tumorales. Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método de evaluación del grado de malignidad de las células tumorales de la muestra cuantificando LAT1 expresado en células tumorales.

Como la mayoría de cánceres de mama triple negativos expresan LAT1 a un nivel alto, se encuentra que el tratamiento que se dirige a LAT1 es eficaz para el cáncer de mama triple negativo para el que no hay tratamiento apropiado hasta ahora. Es más, si el cáncer de mama en general es triple negativo o no, el tratamiento que se dirige a LAT1 es eficaz probando la presencia o ausencia de la expresión de LAT1.

Una característica de la presente invención es que el diagnóstico del cáncer de mama puede ser factible combinando una tinción inmunológica de ER (receptor de estrógeno), una tinción inmunológica de PgR (receptor de progesterona), una tinción inmunológica de HER2, y una tinción inmunológica de LAT1. En la presente invención, el diagnóstico del cáncer de mama se puede realizar de modo más preciso mediante la tinción inmunológica de LAT1 que usa el anticuerpo monoclonal anti-LAT1 además de la tinción inmunológica que usa ER, PgR y HER2. Se pueden usar materiales comercialmente disponibles para la tinción inmunológica de ER, PgR y HER2. Por ejemplo, se puede usar un sistema Ventana XT (Ventana Japan, Tokio, Japón) para la tinción inmunológica de ER y PgR; además, se puede usar un kit DAKO EGFR pharm Dx (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, E.E.U.U.) como kit de tinción inmunológica para HER2. Sin embargo, no se limita a estos siempre y cuando signifique que pueden medir ER, PgR y HER2. En caso de que se usen estrógeno, progesterona o análogos de estas hormonas, se puede estimar el efecto de la terapia hormonal evaluando la presencia o ausencia de la expresión de ER y PgR. El efecto de agentes farmacéuticos anti-HER2 en el cáncer de mama se puede estimar evaluando la presencia o ausencia de la expresión del gen HER2. Similar a estos, se puede estimar el efecto de agentes reguladores del transportador LAT1 evaluando la presencia o ausencia de la expresión de LAT1 mediante un kit de tinción inmunológica de LAT1 que usa el anticuerpo monoclonal anti-LAT1. Se puede realizar esta tinción inmunológica al mismo tiempo o de modo independiente.

(Kit)

Además, la presente invención proporciona el uso de un kit de diagnóstico para realizar cualquiera de los métodos de la presente invención previamente mencionado. Es decir, la presente invención se refiere al uso de un kit para el diagnóstico que incluye un anticuerpo monoclonal anti-LAT1 para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 para el diagnóstico de tumores de glándula mamaria. Un kit de diagnóstico de este tipo puede ser uno para diagnosticar los grados de malignidad en tumor de glándula mamaria, en donde el tumor de glándula mamaria es un tumor intraductal de mama, o cáncer de mama triple negativo que es negativo para todos los receptores de estrógeno, receptor de progesterona y HER2. Es más, la presente invención se refiere al uso de un kit para el diagnóstico de

tumor de glándula mamaria que incluye la combinación de un kit de tinción inmunológica del receptor de estrógeno, un kit de tinción inmunológica del receptor de progesterona y un kit de tinción inmunológica de HER2 y un kit de tinción inmunológica de LAT1. También, la presente invención se refiere al uso de un kit para identificar la expresión de LAT1 si el resultado del receptor de estrógeno, el receptor de progesterona y HER2 en tumores de glándula mamaria es o positivo o negativo.

El kit para el diagnóstico con el fin de detectar, identificar, o cuantificar LAT1 incluye materiales que pueden detectar, identificar, o cuantificar LAT1. Por ejemplo, contiene el anticuerpo marcado y similares, que incluyen las etapas de marcar con una sustancia marcadora por sí misma o que reacciona con otras sustancias que pueden proporcionar señales detectables. En el kit de la presente invención, tanto un kit para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 expresado en células normales como un kit para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 expresado en células tumorales son un tipo de kit para detectar, identificar, o cuantificar LAT1. Se usa preferiblemente un grupo del mismo tipo de kit para la medición con el fin de cuantificar LAT1 pero no se limita a este.

Por ejemplo, mientras que puede estar contenido en el kit un material marcado con sustancia fluorescente para detectar, identificar, o cuantificar LAT2 expresado en células normales, puede estar contenido en el kit un material radioisótopo marcado para detectar, identificar, o cuantificar LAT1 expresado en células tumorales. Sin embargo, el anticuerpo marcado con radioisótopo es preferiblemente diferente del anticuerpo marcado con una sustancia fluorescente con una diferente longitud de onda en el kit.

(Métodos experimentales)

En la presente invención se explica además en detalle el efecto de LAT1. En primer lugar, los autores de la presente invención revisaron un estudio inmunohistológico de LAT1. Se extraen células tumorales de glándula mamaria en un procedimiento quirúrgico y se preparó un espécimen de tejido incluido en parafina. El espécimen de tejido incluido en parafina de células tumorales de glándula mamaria se somete a las etapas de desparafinar y bloquear, y tratar con un anticuerpo anti-LAT1 a la concentración final de 2 µg/ml (para el estudio de LAT1, se usó un anticuerpo monoclonal de ratón anti-LAT1 humano (consúltese la Bibliografía de No Patente 1, pag. 23, en la Fig. 3A pag. 631), se usó un anticuerpo de conejo policlonal anti-LAT2 humano para el estudio de LAT2 (anticuerpo anti-hEST3A-N, TransGenic Inc., Kumamoto)) a una temperatura de 4°C durante toda la noche. Después de lavar el espécimen con PBS, se añade un anticuerpo universal contenido en un kit ChemMate DAKO ENVISION System (kit de DAKO ChemMate ENVISION System HRP) al espécimen de tejido en cualquiera de los casos de estudio de LAT1 o de LAT2, y se trata el espécimen de tejido con el anticuerpo universal a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se desarrolla el color mediante la reacción con una solución de sustrato DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina).

Como resultado, mientras que se reconoció la tinción específica por reacción con el anticuerpo LAT1 en el espécimen preparado a partir de células cancerosas, no se encontró la tinción específica por reacción con LAT2. Las Figs. de 1 a 5 muestran los resultados de las pruebas de tinción que usan el anticuerpo monoclonal anti-LAT1. Por ejemplo, la Fig. 1 muestra fotos que indican la línea de base para las intensidades de expresión de LAT1, la Fig. 2 muestra un caso que expresa LAT1 en carcinoma ductal in situ maligno, la Fig. 3 muestra un caso con la sobreexpresión de LAT1 en cáncer de mama triple negativo, la Fig. 4 muestra un caso que expresa LAT1 en cáncer de mama HER2 negativo, la Fig. 5 muestra un caso que expresa LAT1 en cáncer de mama HER2 positivo. De aquí en adelante, se explica cada uno de ellos.

La Fig. 1 muestra la línea de base que indica las intensidades de expresión de LAT1. La expresión de LAT1 se obtiene a partir del valor obtenido de la multiplicación de la intensidad de expresión (intensidad) [0 (negativo), 1 (positivo débil), 2 (positivo moderado), 3 (intensamente positivo)] y el área de región de expresión (área) [0 (negativo), 1 (regional, la región de expresión es menor del 10%), 2 (parcial, la región de expresión es mayor del 10% y menor del 30%) y 3 (difusa, la región de expresión es mayor del 30%)] como un valor evaluado (puntuación) mediante un método modificado (consúltese la Bibliografía de No Patente 4) de un método de Sinicrope (consúltese la Bibliografía de No Patente 11). La incidencia de LAT1 se determina en base al grado de esta tinción. La Fig. 1 indica las intensidades de expresión de LAT1 como referencia que muestra la intensidad 0, intensidad 1, intensidad 2, e intensidad 3 desde la izquierda de la foto.

(Discriminación entre malignidad y benignidad en tumores intraductales de mama)

La Fig. 2 muestra una comparación entre papiloma intraductal de mama y carcinoma ductal in situ, que son ambos categorizados como tumor intraductal de mama. En la parte superior de la foto se muestra la tinción HE (hematoxilina-eosina), en la parte inferior de la foto se muestra el resultado de una tinción inmunológica tratada con LAT1. La parte superior izquierda es una foto de tinción HE de papiloma intraductal de mama, que es benigno, y la parte superior derecha es la de carcinoma ductal in situ, que es maligno. En la izquierda, la foto muestra el papiloma intraductal de mama tratado con la tinción inmunológica de LAT1; en la parte inferior derecha de la foto es la de carcinoma ductal in situ. Como es obvio en la Fig. 2, mientras que la expresión de LAT1 es poco frecuente en el papiloma intraductal de mama, la intensa expresión de LAT1 se observa en la membrana celular del carcinoma ductal in situ. Las puntuaciones de la expresión de LAT1 en el grupo de carcinoma ductal in situ son significativamente más altas en comparación con aquellas del grupo de papiloma intraductal de mama. Por lo tanto,

la aplicación de LAT1 como un biomarcador permite el diagnóstico del papiloma intraductal de mama y del carcinoma ductal in situ en un método simple, para los que la discriminación de estos era hasta ahora difícil.

Entre los tumores intraductales de mama, la discriminación en el diagnóstico de tejidos entre el papiloma intraductal de mama, que es benigno, y el carcinoma ductal in situ, que es maligno, es importante y esencial para juzgar el requisito de resección operativa. Sin embargo, en caso de un método histopatológico que usa especímenes tratados con una tinción HE convencional para discriminar entre los dos tumores, los elementos definidos de la discriminación no están claros, y existen una gran cantidad de lesiones donde es difícil la discriminación. La presente invención ha encontrado que la expresión de LAT1 era extremadamente baja en papiloma intraductal de mama benigno, que estaba en claro contraste con el carcinoma ductal in situ maligno que presentaba la expresión de LAT1 en un nivel alto. Por lo tanto, la evaluación de la expresión inmunohistológica de LAT1 permite la discriminación entre benignidad y malignidad.

(Diagnóstico del cáncer de mama triple negativo)

La Fig. 3 muestra hallazgos de la expresión de LAT1 en células de cáncer de mama triple negativo, que son negativas para todos los ER (receptor de estrógeno), PgR (receptor de progesterona), y HER2. Los hallazgos en el caso de tinción HE (hematoxilina-eosina) (tinción estándar), y tratado con HER2, ER, PgR, y LAT1 se muestran en orden a partir de la izquierda. Este es un caso que se muestra positivo a LAT1 a la intensidad de 3 (alta intensidad) en células de cáncer de mama triple negativo que son negativas a la totalidad de ER, PgR y HER2. Ya que 14 de 17 casos en el grupo de triple negativo (aproximadamente 83%) tienen la expresión de LAT1 en un nivel alto (puntuación de 6 o más), se cree que LAT1 es un biomarcador útil para el cáncer de mama triple negativo.

Entre los cánceres infiltrantes, no había una terapia molecular dirigida para cánceres de mama triple negativos hasta ahora. Sin embargo, la expresión de LAT1 en un nivel alto se reconoció en muchos en el grupo de cáncer de mama triple negativo. Ya que muchos pacientes con cánceres de mama triple negativos tienen clínicamente un mal pronóstico, este hallazgo es consistente con el hecho de que pacientes con cáncer de próstata cuya expresión de LAT1 estaba en un nivel alto tenían un mal pronóstico en comparación con casos que expresan LAT1 en un nivel bajo. Por consiguiente, se ha sugerido que la terapia molecular dirigida anti-LAT1 (que incluye sustancias que reaccionan con anticuerpo anti-LAT1, transportador LAT1, y similares) sería útil para el tratamiento de cánceres de mama triple negativos, y cabría esperar en un futuro la introducción de quimioterapia cuya diana es LAT1.

La Fig. 4 muestra un caso de cáncer de mama con HER2 negativo (puntuación 0 en un Hercep Test) y LAT1 positivo entre los cánceres infiltrantes. En orden a partir de la izquierda, un panel muestra los casos tratados con ER, PgR, HER2 y LAT1. Este caso mostró positividad para ER y PgR, y negatividad para HER2 en el núcleo, positividad para LAT1 (intensidad 2) en la membrana celular.

La Fig. 5 muestra un caso de cáncer de mama con HER2 positivo (puntuación 3 en el Hercep Test) y LAT1 positivo a una alta expresión entre los cánceres infiltrantes. En orden a partir de la izquierda, la figura muestra el caso tratado con tinción HE (hematoxilina-eosina), tratado con HER2 y LAT1. Como resultado, se reconoció una fuerte tinción de la muestra tratada con el anticuerpo LAT1 a la intensidad de 3 (alta intensidad) en el caso de HER2 positivo (puntuación 3 en el Hercep Test). Entre los cánceres infiltrantes en las Figs. 4 y 5, las puntuaciones de expresión de LAT1 en el grupo de casos HER2 positivos (puntuación 3 en el Hercep Test) fueron significativamente más altas en comparación con aquellas en el grupo de casos HER2 negativos (puntuación 0 en el Hercep Test).

A partir de estos resultados, LAT1 puede ser una nueva herramienta de diagnóstico para discriminar entre benignidad y malignidad de tumores intraductales de mama que son difíciles de diagnosticar hasta ahora. Es más, LAT1 puede ser un biomarcador extremadamente prometedor para el tratamiento de cánceres de mama triple negativos, que son negativos para la totalidad de ER, PgR y HER2.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se explica específicamente mediante los Ejemplos. La presente invención, sin embargo, no se limita a esos ejemplos.

Ejemplo de referencia 1. Extracción de muestras experimentales

Se extrajeron aleatoriamente lesiones neoplásicas de glándulas mamarias, que se extirparon quirúrgicamente entre 2005 y 2009 en una instalación donde pertenecían los presentes inventores. Se usaron muestras patológicas de materiales quirúrgicos en un total de 87 casos que incluyen 10 casos de papiloma intraductal de mama, 10 casos de carcinoma ductal in situ (DCIS), y 67 casos de cáncer infiltrante (carcinoma invasivo). Entre ellos, 17 casos eran carcinomas infiltrantes triple negativos que eran negativos para la totalidad de ER, PgR, y HER2.

Ejemplo 1. Tinción que usa un anticuerpo anti-LAT1

Todas las lesiones neoplásicas extraídas de glándulas mamarias en el Ejemplo de Referencia 1 se sometieron a fijación con formalina al 10% y se preparó un bloque incluido en parafina, se preparó además una sección finamente laminada con 3 μ m de espesor a partir de un bloque típico que tenía un cara dividida máxima de lesiones

neoplásicas. Además, después de la activación con microondas durante 5 minutos, se incubó la sección laminada con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-LAT1 (consúltese la Bibliografía de No Patente 1, pag. 23, en la Fig. 3A pag. 631) preparado por los autores de la presente invención a una temperatura de 4°C o más baja durante toda la noche. Además, se le añadió a la sección un anticuerpo universal contenido en un kit DAKO ChemMate ENVISION System HRP, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos, y luego se desarrolló el color mediante la reacción con una solución de sustrato DAB (tetrahidrocloruro de 3,3'-diaminobencidina). Para la tinción del núcleo, se llevó a cabo la tinción con verde de metilo o con Hematoxilina de Mayer. Para la tinción inmunológica de ER y PgR, se usó un sistema Ventana XT (Ventana Japan, Tokio, Japón), y se llevó a cabo la tinción inmunológica de HER2 usando un kit DAKO EGFR pharmDx (Dako North America Inc., Carpinteria, CA, E.E.U.U.). Se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-LAT2 humano (anticuerpo anti-hEST3A-N, TransGenic Inc., Kumamoto) para la tinción inmunológica de LAT2.

Como resultado, se encontró la expresión de LAT1 (las puntuaciones de expresión de LAT1 estaban en el intervalo de 0 a 9) en muchas de las células de cáncer de mama, LAT2 también estaba expresado aunque era débil (las puntuaciones de expresión de LAT2 estaban en el intervalo de 0 a 3). Mientras tanto, las puntuaciones de expresión de LAT1 en células normales estaban en el intervalo de 0 a 1, las puntuaciones para LAT2 estaban en el intervalo de 1 a 4.

La expresión de LAT1 se obtuvo mediante multiplicación de la intensidad de expresión (intensidad) [0 (negativo), 1 (positivo débil), 2 (positivo moderado), 3 (intensamente positivo)] y el área de la región de expresión (área) [0 (negativo), 1 (regional, la región de expresión es menor de 10%), 2 (parcial, la región de expresión es 10% y, menos de 30%), 3 (difusa, la región de expresión es 30% o más)] como un valor evaluado (puntuación) mediante un método modificado (consúltese la Bibliografía de No Patente 4) de un método de Sinicrope (consúltese la Bibliografía de No Patente 11). Se llevó a cabo el tratamiento estadístico de manera que los valores se expresaron como media \pm SD en cada grupo. Se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Mann-Whitney U para comparar los dos grupos, y se determinó un nivel de significancia que era menos del 5%.

25 Resultados

El resultado obtenido en el Ejemplo 1 se muestra en la Fig. 6, que muestra la comparación de la expresión de LAT1 en tumores de glándula mamaria.

(1) Comparación de las expresiones de LAT1 entre los grupos de carcinoma ductal in situ y papiloma intraductal de mama.

30 La puntuación de la expresión de LAT1 en el grupo de carcinoma ductal in situ (DCIS), que es maligno, era significativamente alta ($p = 0,0156$) que indicaba $5,1 \pm 3,2$ en comparación con $1,5 \pm 2,1$ en el grupo de papiloma intraductal de mama (papiloma intraductal de mama), que es benigno.

(2) La comparación de las expresiones de LAT1 entre casos con HER2 positivo y negativo.

35 Entre los cánceres infiltrantes (carcinoma invasivo), la puntuación de la expresión de LAT1 fue de $6,6 \pm 2,8$ en el grupo de casos con HER2 positivo (puntuación 3 en Hercep Test), que fue significativamente mayor en comparación con $3,6 \pm 2,4$ en el grupo de casos con HER2 negativo (puntuación 0 en Hercep Test) ($p = 0,0008$). A partir de este resultado, la puntuación de LAT1 es alta en los casos con HER2 positivo, y se dice que los grados de malignidad son altos en términos de proliferación celular.

(3) Expresión de LAT1 en el grupo de cánceres de mama triple negativos

40 Muchos cánceres de mama triple negativos, que eran negativos para la totalidad de ER, PgR y HER2, fueron los casos con LAT1 sobreexpresado (14 de 17 casos tuvieron la puntuación 6 o más, p. ej., aproximadamente el 83%), las puntuaciones de expresión de LAT1 en los 17 casos fue de $6,8 \pm 2,6$ en un nivel alto. A partir de este resultado, muchos de los cánceres de mama triple negativos tienen LAT1 con una alta puntuación, y por lo tanto, la terapia molecular dirigida cuya diana es LAT1 parece ser eficaz para los cánceres de mama triple negativos.

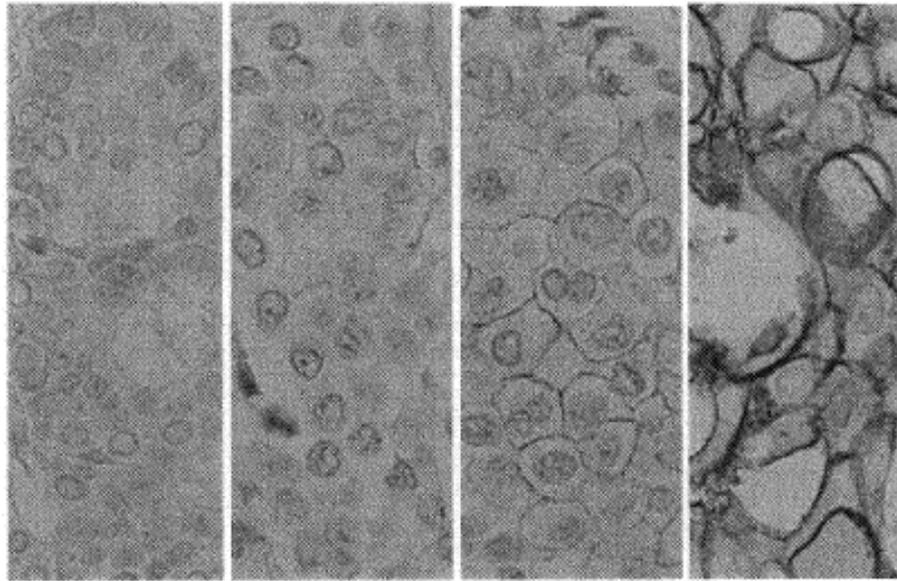
45

REIVINDICACIONES

1. Uso de un kit para el diagnóstico del tumor de glándula mamaria, en donde el tumor de glándula mamaria es cáncer de mama triple negativo que es negativo para el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, y HER2, comprendiendo el kit un anticuerpo monoclonal anti-LAT1 para detectar, identificar, o cuantificar LAT1.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tumor de glándula mamaria es un tumor intraductal de mama, y se diagnostica el grado de malignidad en el tumor de glándula mamaria.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el uso comprende además un kit de tinción inmunológica para el receptor de estrógeno, un kit de tinción inmunológica para el receptor de progesterona y un kit de tinción inmunológica para HER2.
- 10 4. Un método para el diagnóstico del tumor de glándula mamaria que comprende: poner en contacto un anticuerpo monoclonal anti-LAT1 con un tejido de glándula mamaria extraído de un sujeto; y detectar, identificar, o cuantificar LAT1 en el tejido, en donde el tumor de glándula mamaria es un cáncer de mama triple negativo que es negativo para el receptor de estrógeno, el receptor de progesterona, y HER2.
- 15 5. El método para el diagnóstico del tumor de glándula mamaria de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el tumor de glándula mamaria es un tumor intraductal de mama, y se diagnostica el grado de malignidad en el tumor de glándula mamaria.
- 20 6. Un método para el diagnóstico del tumor de glándula mamaria que comprende: hacer una tinción inmunológica de un tejido de glándula mamaria extraído de un sujeto para detectar, identificar, o cuantificar los niveles de expresión del receptor de estrógeno, del receptor de progesterona, HER2, y LAT1, en donde el tumor de glándula mamaria es cáncer de mama triple negativo que es negativo para el receptor de estrógeno, para el receptor de progesterona, y para HER2.

[Fig. 1]

[Fig. 1]



LAT1
Intensidad 0

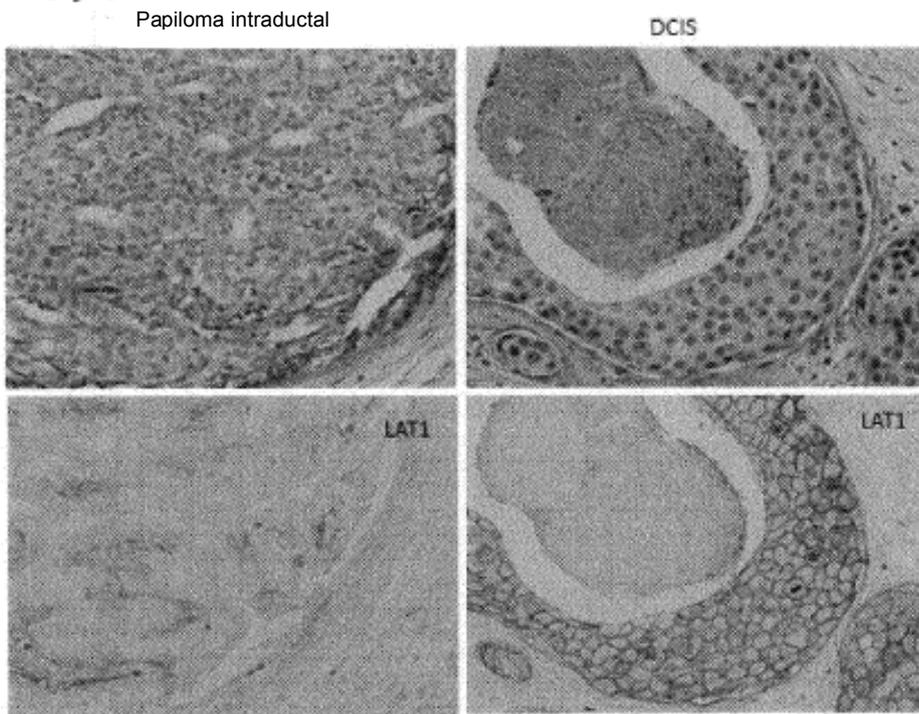
LAT1
Intensidad 1

LAT1
Intensidad 2

LAT1
Intensidad 3

[Fig. 2]

[Fig. 2]



Papiloma intraductal

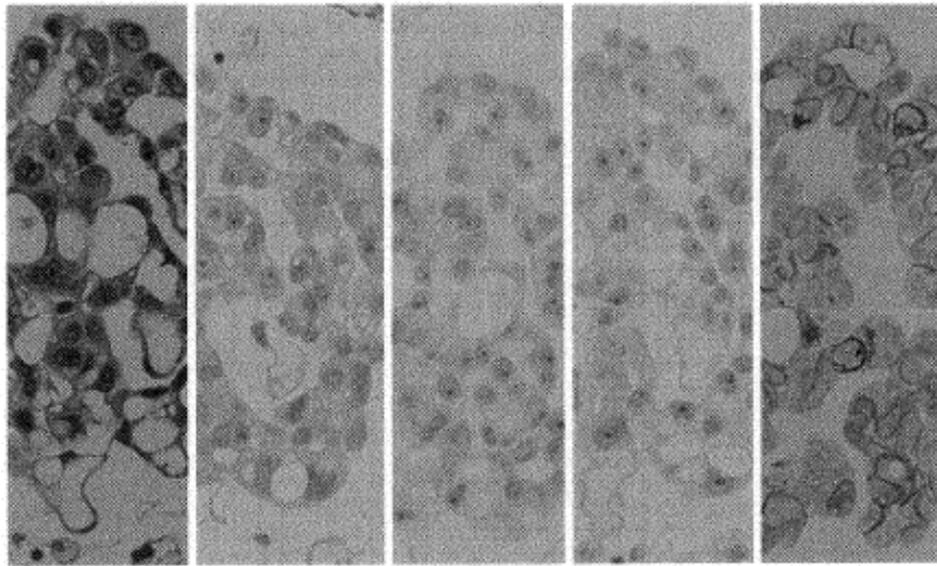
DCIS

LAT1

LAT1

[Fig. 3]

[Fig. 3]



HE

HER2
Hercep Test 0

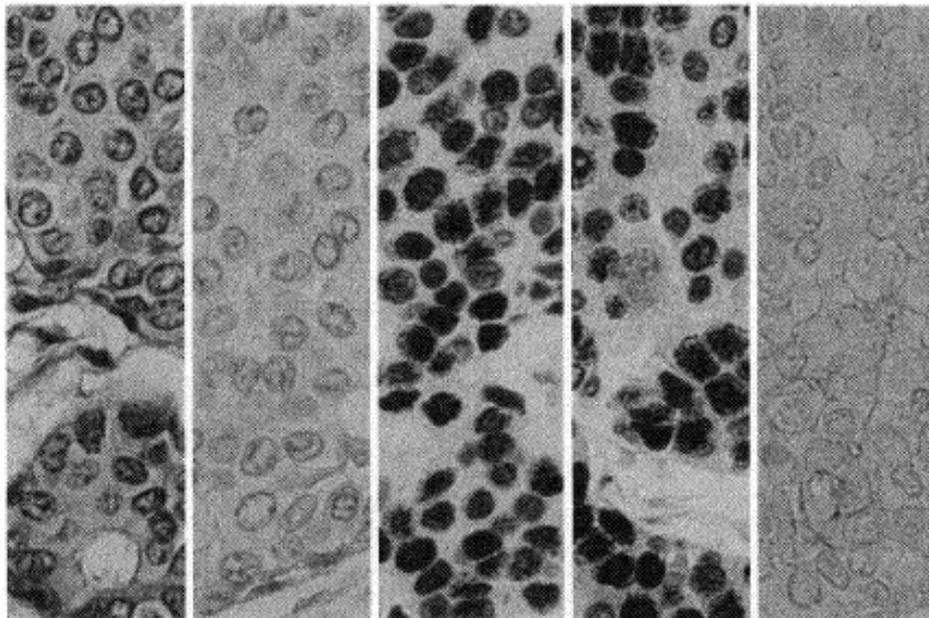
ER (-)

PgR (-)

LAT1
Intensidad 3

[Fig. 4]

[Fig. 4]



HE

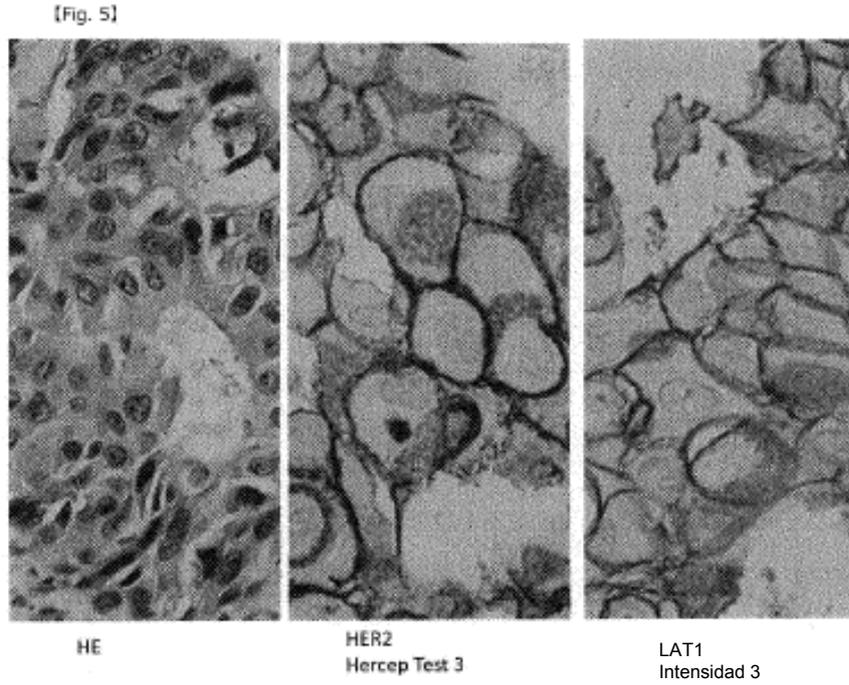
HER2
Hercep Test 0

ER (+)

PgR (+)

LAT1
Intensidad 2

[Fig. 5]



[Fig. 6]

[Fig. 6]

Expresión de LAT1 con reacción inmunológica en lesiones neoplásicas de glándula mamaria

