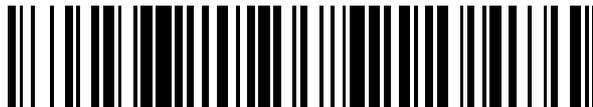


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 116**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.07.2014 PCT/EP2014/064100**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2015 WO15000980**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2014 E 14736735 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 3017306**

54 Título: **Perfil del metabolismo energético tumoral**

30 Prioridad:

04.07.2013 EP 13175028

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

08.03.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT HEIDELBERG (100.0%)
Grabengasse 1
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**ROTH, WILFRIED;
GDYNIA, GEORG y
SAUER, SVEN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 658 116 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

Perfil del metabolismo energético tumoral

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un método de diagnóstico para el pronóstico de la progresión tumoral (incluyendo la predicción de la probabilidad de existencia de metástasis y recaídas) en enfermedades relacionadas con un tumor en un mamífero y la provisión de una recomendación de una terapia para el paciente. Describe adicionalmente el uso de actividades enzimáticas de enzimas clave en el metabolismo energético para tomar una decisión sobre una terapia tumoral individualizada.

15 **Antecedentes de la invención**

Se ha ensayado a menudo la consideración de parámetros individuales del metabolismo energético para la evaluación del potencial de metástasis de tumores malignos, sin embargo sin la transferencia de los resultados del ensayo o los procedimientos del ensayo en la clínica de cada día (Novartis Foundation symposium 240, 251 (2001)). La concentración de sustratos y productos del metabolismo energético tal como glucosa, glutamina, cuerpos cetónicos, lactato y ATP se han determinado en las líneas celulares, en tumores xenoinjertados, en criomuestras tisulares de pacientes con tumores y también *in vivo* en vasos mayores que suministran un tumor (Cancer research 62, 6674 (15 de Nov., 2002)). Estas determinaciones se basan en métodos que se conocen en general en el análisis del metabolismo tales como los ensayos de actividad enzimática, ensayos de bioluminiscencia, NMR o espectrometría de masas. Actualmente, no existe un ensayo clínico en el que se ensayen todas las rutas del metabolismo energético esencial en el tejido tumoral para dar una prueba sobre un pronóstico individual de un tumor o sobre la quimiosensibilidad de un tumor.

Varias estrategias experimentales publicadas para la aplicación de ensayos de actividad enzimática de las enzimas del metabolismo energético no se han considerado en la terapia clínica de tumores malignos humanos a pesar del hecho de que estas actividades enzimáticas son diferentes en el tejido sano y el tumoral. Son necesarios métodos de determinación que permitan una decisión rápida sobre una terapia y que permitan un pronóstico fiable del desarrollo del tumor después del diagnóstico del tumor. Los métodos disponibles actualmente para el análisis del metabolismo energético de los tumores malignos no cumplen los requerimientos mencionados anteriormente.

Sería muy beneficioso si dichos métodos que se llevan a cabo en muestras de tejidos – en el presente documento, la expresión “muestras tisulares” comprende el tejido sólido y células individuales de un material líquido (por ejemplo, la sangre) – proporcionarían resultados que son idénticos a los *in vivo* de un paciente permiten una comparación cruzada interindividual de las actividades enzimáticas medidas. Esto no es posible en un análisis de tejido fijado con formalina, líneas celulares, esferoides y xenoinjerto de tumores. Una representación del metabolismo energético *in vivo* podría ser una criomuestra tisular tomada de un material de biopsia. Dichas muestras permiten la determinación de metabolitos; la determinación de actividades de las enzimas que se localizan en los compartimentos celulares o son parte de complejos multienzimáticos es limitada. Sin embargo, las mediciones en criotejidos tienen la desventaja de las diferencias individuales de los pacientes en la energía y el suministro de sustrato antes de tomar el material de biopsia de un paciente y los cambios en el metabolismo del tumor inducida por el cirujano durante la biopsia tienen influencia sobre la actividad enzimática. Dichas circunstancias no permiten la normalización y comparación cruzada interindividual de los datos metabólicos medidos. Ya la duración de la biopsia, el tipo y dosificación de un narcótico durante la biopsia o la administración de fármacos pueden influenciar de manera distinta el metabolismo energético en una célula (Resuscitation 19, 159 (Abril 1990)).

Otros métodos en los que la expresión de enzimas del metabolismo energético en el tejido de un paciente se determina mediante inmunohistoquímica o bioluminiscencia son semicuantitativos y no indican la actividad actual de las enzimas. En Nature Chemical Biology 1 130 (Ago. 2005) se describe el denominado “perfil del proteoma basado en la actividad” o su aplicación desarrollada posteriormente (química click) que muestra las enzimas activas en homogenados y tejido vivo; sin embargo, son semicuantitativos, que llevan mucho tiempo y son costosos.

Hasta ahora, ninguno de los métodos o combinación de dichos métodos mencionados anteriormente o representación del metabolismo energético completo de un tejido tumoral vivo. En particular, no se había considerado ni determinado aún la actividad de las enzimas clave implicadas en el metabolismo de todos los sustratos energéticos celulares relevantes para el pronóstico de la progresión tumoral o para la recomendación de una terapia.

60 **Sumario de la invención**

El problema que sustenta la invención es proporcionar un método de diagnóstico para el pronóstico de la progresión tumoral, incluyendo la predicción de probabilidad de la existencia de metástasis (en ganglios linfáticos y/o sitios distantes) y la recaída y la provisión de una recomendación de terapia. El método de diagnóstico será lo suficiente fácil para la práctica clínica diaria.

Este problema se resuelve con un método de diagnóstico para la predicción del pronóstico del tumor incluyendo la probabilidad de la formación de metástasis, existencia de recaídas, y/o recaída local y la provisión de una recomendación de una terapia que comprende las etapas de

- 5 (a) incubación de una muestra de material tumoral fresco del paciente y un material de muestra fresco comparativo del paciente en un medio de cultivo para permitir la eliminación de los efectos de la nutrición, fármacos y de la biopsia sobre el metabolismo energético de los materiales de muestra;
- (b) preparación de un homogenado celular y fracciones sub-celulares de los materiales de muestra de la etapa (a);
- 10 (c) determinación de actividades enzimáticas de al menos una enzima anaeróbica y al menos una enzima aeróbica claves para el metabolismo energético del homogenado celular o la fracción sub-celular y la determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima determinada en el material de muestra y el material de muestra comparativo;
- 15 (d) cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (c) en el material de muestra y el material de muestra comparativo.

en el que el material de muestra se selecciona de entre cortes de tejido, masas celulares tumorales y células aisladas y el material de muestra comparativo se selecciona de entre un corte de un tejido distante del tumor o un material que se incubaba en la etapa (a) en condiciones que regulen positivamente el metabolismo energético anaeróbico y se selecciona de un corte del tejido tumoral, masa celular tumoral y células aisladas.

La relación mencionada en la etapa (d) anteriormente también se puede calcular como la relación de ganancia energética aeróbica respecto a anaeróbica; o en otras palabras el valor recíproco de la relación definida en la etapa (d) anteriormente. El método descrito en el presente documento utiliza la desviación absoluta de la relación mencionada anteriormente desde un valor normal, es decir, el tejido distante del tumor y el tejido tumoral no se diferencian en metabolismo energético anaeróbico y aeróbico.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, la invención se dirige al uso de la relación de la actividad enzimática de al menos una enzima anaeróbica y al menos una enzima aeróbica de las enzimas clave del metabolismo energético determinadas (i) en el tejido tumoral y por comparación en el tejido distante del tumor o (ii) en el tejido tumoral o las células tumorales y por comparación en condiciones anóxicas como marcador o biomarcador de la predicción del pronóstico del tumor incluyendo la probabilidad de la formación de metástasis, la existencia de formación de metástasis, existencia de recaída, y/o recurrencia local.

Son características importantes de la invención que las muestras del paciente utilizadas en el método de la invención son muestras (tumorales) del paciente frescas. Antes de la determinación de la actividad enzimática las muestras del paciente se incuban durante un periodo de tiempo más largo. Finalmente, se proporciona un perfil energético del tumor que se utiliza para el pronóstico.

Sin embargo, también es posible y fiable analizar un tejido tumoral crioconservado o una masa celular tumoral crioconservada con el método analítico descrito en el presente documento. En este caso es importante que el tejido o la masa celular se almacenen a temperaturas en las que la actividad enzimática del material se ralentiza muy sustancialmente, se aceptan intervalos por debajo de $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$, se prefiere el almacenamiento a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en nitrógeno líquido (LN_2). La expresión "muestra fresca" incluye el tejido tumoral crioconservado o masa celular tumoral como se define en el presente documento.

Descripción de las realizaciones preferidas

Posteriormente, se explican las realizaciones del método de la invención que se describen con mayor detalle. Por lo tanto, los problemas mencionados anteriormente se resuelven con un primer método de la invención que comprende las etapas de

- 55 (a) incubación de un corte de tejido fresco que se toma de una muestra de un tejido tumoral y de un tejido distante del tumor de un paciente en un medio de cultivo celular para reducir los efectos de la nutrición, sustrato, fármacos y de la biopsia sobre el metabolismo energético del corte de tejido;
- (b) preparación de un homogenado celular y fracciones subcelulares en de los cortes de tejido de la etapa (a),
- (c) determinación de las actividades enzimáticas de al menos un enzima clave del metabolismo energético anaeróbico y al menos una del metabolismo energético aeróbico en el homogenado celular y/o en la fracción subcelular en el tejido tumoral y en el tejido distante del tumor y la formación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima determinada en el tejido tumoral y en el tejido distante del tumor;
- 60 (d) cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica basándose en el cociente determinado en la etapa (c) en el tejido tumoral y el tejido distante del tumor.

La provisión de un pronóstico y una recomendación de una terapia son posibles basándose en un perfil de la actividad enzimática obtenido en la etapa (d).

La relación mencionada en la etapa (d) anteriormente se puede calcular también como la relación de ganancia energética aeróbica respecto a anaeróbica; o en otras palabras el valor recíproco de la relación definida en la etapa (d) anterior. El método descrito en el presente documento utiliza la desviación absoluta de la relación mencionada anteriormente de un valor normal, es decir, el tejido distante del tumor y el tejido tumoral no se diferencian en el metabolismo energético aeróbico y anaeróbico.

La invención se dirige adicionalmente a un segundo método diagnóstico para el pronóstico de la progresión tumoral, incluyendo la predicción de la probabilidad de la existencia de metástasis y recaída y la provisión de una recomendación de la terapia en la que el material distante del tumor no biopsiado se utiliza para fines comparativos o de referencia. Este método de diagnóstico no solo usa muestras de tejido tumoral. Por lo tanto, este método es un método alternativo del primer método de la invención. Por lo tanto, la invención también se refiere a un método de diagnóstico que comprende las etapas de

- (a) incubación de un corte de tejido fresco tomado de un material de biopsia de un tejido tumoral de un paciente o una masa celular tumoral de un paciente en un medio de cultivo para reducir los efectos de la nutrición, sustrato, fármacos y biopsia en el metabolismo energético de los cortes tisulares;
- (b) incubación de un segundo corte de tejido del mismo material de biopsia en condiciones que regulen positivamente el metabolismo energético anaeróbico en el corte de tejido;
- (c) preparación de un homogenado celular y fracciones subcelulares de los cortes de tejido de la etapa (a) y (b),
- (d) determinación de la actividad enzimática de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético anaeróbico del homogenado celular y/o la fracción subcelular en el tejido tumoral y en la muestra de tejido tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente obtenido en la etapa (c) y la determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima en el tejido tumoral y en la muestra de tejido tumoral con el metabolismo energético regulado positivamente;
- (e) cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a aeróbica basándose en el cociente determinado en la etapa (c) y determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima del tejido tumoral y la muestra de tejido tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente.

La provisión de un pronóstico y una recomendación de una terapia es posible basándose en un perfil de actividad enzimática obtenida en la etapa (e).

La relación mencionada en la etapa (e) anterior también se puede calcular como la relación de ganancia energética aeróbica respecto a anaeróbica; o en otras palabras el valor recíproco definido en la etapa (e) anterior. El método descrito en el presente documento utiliza la desviación absoluta de la relación mencionada anteriormente de un valor normal, es decir los cortes tisulares cultivados en las condiciones descritas en (a) y (b) no se diferencian en metabolismo energético anaeróbico y aeróbico.

La materia objeto de una tercera realización de la invención es un tercer método que comienza con la masa celular tumoral recolectada del paciente en la que se determinan las actividades enzimáticas. Este tercer método de diagnóstico de la invención comprende las etapas de

- (a) incubación de una parte de la masa celular tumoral fresca tomada del paciente en un medio de cultivo celular para permitir la eliminación de los efectos de fármacos, nutrición, sustrato y biopsia sobre el metabolismo energético;
- (b) incubación de la otra parte de la masa celular tumoral tomada del paciente en condiciones que regulen positivamente el metabolismo energético anaeróbico;
- (c) preparación de fracciones subcelulares y un homogenado celular de la masa celular tumoral de las etapas (a) y (b),
- (d) determinación de la actividad enzimática de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético de la fracción subcelular o el homogenado celular en la masa celular tumoral de la etapa (a) y en la masa celular tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente y la determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima en la masa celular tumoral y en la masa celular tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente;
- (e) el cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica basándose en el cociente determinado en la etapa (d) en la masa celular tumoral y en la masa celular tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente.

La relación mencionada en la etapa (e) anteriormente también se puede calcular como la relación de ganancia energética aeróbica respecto a anaeróbica, o en otras palabras el valor recíproco de la relación definida en la etapa (e) anteriormente. El método descrito en el presente documento utiliza la desviación absoluta de la relación mencionada anteriormente de un valor normal, es decir, los cortes tisulares cultivados en las condiciones descritas en (a) y (b) no se diferencian en su metabolismo energético anaeróbico y aeróbico.

Una cuarta realización de la invención el método de diagnóstico para la predicción del pronóstico del tumor incluyendo la probabilidad de formación de metástasis, existencia de recaídas, y/o recurrencia local y la provisión de una recomendación de una terapia comprende las etapas de

- (a) aislamiento de las células de una muestra de tumor sólida o líquida tomada de un paciente, estimación del número de células aisladas, dilución de estas células e incubación de estas células en un medio de cultivo celular para permitir la eliminación de los efectos de fármacos, nutrición y biopsia sobre el metabolismo energético para permitir la proliferación de las células;
- 5 (b) incubación de la misma cantidad de células que se aislaron y se trataron como se ha descrito en (a) en condiciones que regulen positivamente el metabolismo energético anaeróbico;
- (c) preparación de fracciones subcelulares y un homogenado de las células aisladas de la etapa (a) y (b);
- 10 (d) determinación de la actividad enzimática de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético de la fracción subcelular o el homogenado celular en las células aisladas y en las células aisladas con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente y la determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima en las células aisladas de (a) y en las células aisladas con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente;
- 15 (e) el cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (d) en las células aisladas de la etapa (a) y en las células aisladas con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente.

Los métodos de la invención son métodos *ex vivo* e *in vitro*.

- 20 En el primer método de la invención se mide la actividad de enzimas clave relevantes en las rutas de provisión de energía de una célula. Las actividades enzimáticas se miden en un corte de tejido tumoral y en un corte de tejido de un tejido distante del tumor. Las enzimas están implicadas en la ganancia de energía anaeróbica y aeróbica de la célula. Para una enzima se forma el cociente de la actividad enzimática en el corte de tejido tumoral y en el corte de tejido distante del tumor. De los cocientes de las actividades enzimáticas de las enzimas implicadas en la ganancia de energía aeróbica y de enzimas implicadas en la ganancia de energía anaeróbica se calcula un perfil energético.
- 25 El perfil energético permite una predicción o pronóstico del tumor y la selección de una terapia individual para un paciente.

- 30 El segundo método es adecuado para todas las mediciones que se toman del tejido tumoral o las células tumorales para las cuales se puede obtener o no el tejido normal correspondiente (tejido libre de cáncer) o células normales no correspondientes (masa celular libre de cáncer/células no cancerosas). Por ejemplo, en el caso de un cáncer de próstata, es muy difícil diferenciar macroscópicamente entre tejido tumoral y libre de tumor. Adicionalmente, el tumor se puede distribuir sobre el órgano completo o la estructura completa (ganglio linfático), haciendo así imposible obtener un tejido libre de tumor. Los casos adicionales que se pueden considerar son en los que el tejido normal correspondiente no se puede identificar de ningún modo (CUP – cáncer de síndrome primario desconocido).
- 35 Finalmente este método alternativo de la invención es adecuado para enfermedades tumorales cancerosas sin tumores sólidos y en los que las células tumorales se mezclan con células no neoplásicas, haciendo difícil obtener células normales como referencia para la medición. En particular, este será el caso de enfermedades tumorales hematológicas.

- 40 El tercer método de la invención utiliza una masa celular tumoral en vez de un corte de tejido. Esto es importante para un tumor que no es sólido. Estos son tumores en los que las células tumorales están en una suspensión líquida. Este es, por ejemplo, el caso de cánceres de sangre.

- 45 La cuarta realización de la invención utiliza células aisladas de una muestra de tumor en vez de un corte de tejido o en vez de un alto número (hasta 5×10^6 células) de células tumorales. En el caso de las muestras de tumores sólidos es importante que la muestra tumoral no sea demasiado pequeña para cortarla con precisión. En el caso de muestras tumorales líquidas es importante que la muestra tumoral no contenga un número muy bajo de células. En ambos casos, es importante alcanzar un límite bajo de detección (LOD). Para este fin, las células se aíslan de las muestras de tumor sólido por métodos convencionales (por ejemplo, por digestión enzimática), entonces se diluyen en un medio de cultivo celular y se siembra en placas de cultivo celular (por ejemplo, en placas de cultivo celular de 95 pocillos). Se permite que las células aisladas proliferen durante hasta dos semanas. Las células aisladas de una muestra líquida de tumor se tratan de la misma manera; sin embargo, la etapa de aislamiento se lleva a cabo por centrifugación. Después, se llevan a cabo las mediciones mencionadas anteriormente. En el caso de la omisión de la etapa de proliferación celular debido a una aceleración deseada del método, se puede ampliar la detección de actividades enzimáticas utilizando sustratos enzimáticos fluorescentes o fluorogénicos u otros métodos de amplificación conocidos por los expertos en la técnica. En particular, este método modificado podría ser importante cuando se miden una material de biopsias por aspiración con aguja (incluyendo la biopsia por aspiración con aguja estereotáctica), por ejemplo de la próstata (por ejemplo, en el cáncer de próstata), el hígado (por ejemplo, en el carcinoma hepatocelular, la piel (por ejemplo, en melanoma maligno), el cerebro (por ejemplo, glioblastoma, o meduloblastoma) o líquido cefalorraquídeo (por ejemplo, que contiene células tumorales cerebrales malignas).
- 60

El método de la invención es adecuado para todo tipo de tumores que se conocen que forman metástasis o recurrencia local.

- 65 La medición de las actividades enzimáticas y la preparación de muestras en el método de la invención cumplen los requerimientos de un ensayo clínico fiable y barato. El resultado del método de la invención mejora la decisión de la

terapia y el pronóstico de enfermedades tumorales malignas. Por el contrario con los métodos conocidos para determinar actividades enzimáticas en criobiopsias que como mucho solo permiten diferenciar entre tejido tumoral y tejido no tumoral en un paciente, el método de la invención permite una comparación de datos obtenidos de entre un grupo de diferentes pacientes. Esto apoya la seguridad de la selección de una terapia adecuada para un paciente.

5 Con el método de la invención se establece un perfil metabólico energético completo de un tumor respectivo basándose en las actividades enzimáticas de enzimas clave del metabolismo energético celular. Debido a su normalización este método permite una actuación rápida y es adecuado para la aplicación de la práctica clínica diaria para determinar un perfil energético completo e individual del tumor de un paciente. El procedimiento de la
10 invención permite una comparación cruzada interindividual de los parámetros debido al metabolismo energético normalizado controlado en las muestras procesadas.

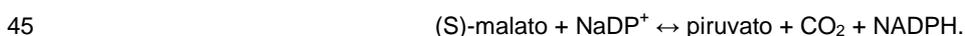
15 Un aumento del metabolismo energético anaeróbico en los cortes de tejido determinados de acuerdo con los métodos de la invención se correlaciona significativamente con la progresión tumoral. Por lo tanto, es la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica la que es predictiva de la probabilidad de metástasis, recaída o recurrencia local. Un pequeño número de subgrupos tumorales, tales como linfomas de Hodgkin podrían demostrar una dependencia más fuerte del metabolismo energético aeróbico. El método de la invención también es adecuado para estos casos ya que detecta un aumento del metabolismo energético anaeróbico sobre el aeróbico y
20 viceversa.

En el método de la invención se establece un perfil metabólico de un tumor específico basándose en las actividades enzimáticas de enzimas clave del metabolismo energético celular. El hallazgo esencial de la invención es establecer un perfil energético en un tejido tumoral metabólicamente activo *ex vivo* de todas las rutas metabólicas relevantes de la célula que proporcionan energía.

25 Las enzimas que se pueden considerar en el método de la invención son enzimas humanas clave en las rutas metabólicas que proporcionan energía anaeróbica y aeróbica. Estas rutas incluyen esencialmente la glucólisis, glutaminólisis, lipólisis, ciclo cítrico y fosforilación oxidativa (respiración mitocondrial).

30 Las enzimas clave del metabolismo energético de la célula y la célula tumoral adecuadas para los métodos de la invención incluyen, la enzima málica (ME), en particular ME1, lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato cinasa de baja afinidad (PKLA; preferentemente la PK-M2 dimérica), piruvato cinasa de alta afinidad (PKHA; preferentemente la PK-M2 tetramérica), hexocinasa y citocromo C oxidasa (COX). Estas son enzimas que están presentes en el cuerpo humano. Están presentes en tejidos sanos y en tejidos tumorales. La actividad enzimática específica se expresa en U/mg de proteína. De estas enzimas la enzima málica (ME), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato cinasa de baja
35 afinidad (PKLA o PK-M2 dimérica) y la hexocinasa se consideran las enzimas del metabolismo energético anaeróbico mientras que la piruvato cinasa de alta afinidad (PKHA, PK-M2 tetramérica) y citocromo C oxidasa (COX) se consideran las enzimas del metabolismo energético aeróbico.

40 La enzima málica (enzima malato descarboxilante) es una enzima clave de glutaminólisis. La glutaminólisis comprende una serie de reacciones bioquímicas en las que se degrada el aminoácido glutamina a glutamato, aspartato, CO₂, piruvato, lactato, alanina y citrato. La energía se puede proporcionar en esta ruta anaeróticamente. En particular la enzima málica cataliza la reacción química reversible:



La lactato deshidrogenasa (LDH) cataliza la última etapa de reacción en la glicólisis anaeróbica y en la glutaminólisis anaeróbica:



Por lo tanto, la L-lactato deshidrogenasa es la enzima que cataliza la oxidación de L-lactato a piruvato y simultáneamente la reducción de NAD⁺ a NADH/H⁺ así como su reacción inversa.

55 Las piruvato cinasas PKLA (piruvato cinasa de baja afinidad, por ejemplo la PK-M2 dimérica) y la PKHA (piruvato cinasa de alta afinidad, por ejemplo la PK-M2 tetramérica) son enzimas implicadas en la glicólisis. Catalizan la transferencia de un grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a ADP, dando lugar a una molécula de piruvato y una molécula de ATP. Por lo tanto, la actividad de PKLA proporciona información sobre la rama anaeróbica de la glicólisis. Por el contrario, la actividad de la PKHA proporciona información sobre la rama aeróbica de la glicólisis.

60 La hexocinasa cataliza la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato en presencia de ATP e iones Mg²⁺. Además de glucosa-6-fosfato se obtienen ADP y H⁺.

65 La medición de la actividad de la citocromo C oxidasa (COX) proporciona información sobre la fosforilación oxidativa, es decir, el consumo de oxígeno por las mitocondrias. Es la última enzima en la cadena de transporte de electrones respiratoria en la membrana mitocondrial. Para la determinación de la actividad enzimática de la citocromo C

oxidasa reducida se oxida el citocromo C.

Además, como marcador de la oxidación beta, es decir, el metabolismo de ácidos grasos, se pueden utilizar las acil-CoA deshidrogenasas mitocondriales, por ejemplo la palmitoil-CoA deshidrogenasa (acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga). La producción energética de la oxidación beta se produce mediante el ciclo cítrico y/o la cadena respiratoria mitocondrial, que se considera como una ruta de producción energética anaeróbica.

En una realización preferida de la invención se determina la actividad enzimática de al menos una enzima anaeróbica y la actividad enzimática de al menos una enzima aeróbica y se tienen en cuenta para la formación del cociente. Por lo tanto, para el fin de la invención se puede determinar la actividad de una o más de las enzimas que se seleccionan de entre enzima málica (ME), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato cinasa de baja afinidad (PKLA o PK-M2 dimérica), hexocinasa y una acil-CoA deshidrogenasa como enzimas para el metabolismo energético anaeróbico y la actividad de una o más de las enzimas seleccionadas de entre la piruvato cinasa de alta afinidad (PKHA; PK-M2 tetramérica), y citocromo C oxidasa (COX) como enzimas del metabolismo energético aeróbico. Las actividades determinadas sirven para formar el cociente como se ha definido anteriormente.

También es posible que el número de enzimas anaeróbicas y aeróbicas determinadas en el método de la invención sea diferente.

En una realización adicional preferida de la invención, se determina la relación de las enzimas detectables relativamente fácilmente (que significa que tienen actividades altamente específicas conocidas), PKLA, LDH y PKHA. La determinación de estas enzimas puede ser fiable en particular para la rutina de laboratorio diaria utilizando el método analítico descrito en el presente documento.

En una realización adicional preferida de la invención, se determina al menos la actividad enzimática de la enzima málica y al menos una enzima de producción de energía anaeróbica así como aeróbica y se tiene en cuenta para la formación de la relación. De acuerdo con una realización adicional preferida de la invención, las actividades enzimáticas que se tienen en cuenta son las de las enzimas ME1, COX, PKHA, PKLA y LDH.

La relación (razón) de la generación de energía anaeróbica respecto a aeróbica determinada en una muestra de tejido permite un pronóstico sobre la progresión de un tumor. En particular, el aumento del metabolismo energético anaeróbico en los cortes de tejido se correlaciona significativamente con la progresión tumoral.

Para la preparación de muestra tisular, se lleva a cabo una biopsia o una resección de parénquima y/o tejido conjuntivo (que contenga el tumor) en un paciente. Se puede aplicar varias técnicas de biopsia y operación para este fin. Estas técnicas son ampliamente conocidas y se utilizan desde hace muchos años. En uno de los métodos de la invención las muestras se toman del tejido tumoral y el tejido sano que pertenece al mismo órgano al que se hace referencia en la invención como tejido distante del tumor. Esto es importante debido a que se puede considerar la actividad enzimática de una enzima tanto en tejido tumoral como en el tejido sano. Por lo tanto, un tejido distante del tumor puede ser un tejido que se toma de un lugar adyacente al tumor pero que no es parte del tumor. Más preferentemente el tejido distante del tumor debería pertenecer al parénquima o tejido conjuntivo donde se origina el tumor.

La muestra o material de biopsia o masa celular que se somete a un método de la invención es material fresco. Fresco significa que el material tisular o masa celular no se ha sometido a congelación o fijación en formalina. La muestra o material de biopsia se añade a un medio de cultivo celular y se transfiere a un instrumento en el cual la muestra o material de biopsia se puede procesar en cortes de tejido finos. Una característica esencial de los métodos de la invención que el corte de tejido se toma de un tejido obtenido recientemente. Por lo tanto, ni el tejido tumoral original ni el corte de tejido se conserva o se congela o se trata con un material gelificante tal como la agarosa.

Preferentemente, el grosor del corte de tejido se selecciona para que permita la difusión de nutrientes desde el medio de cultivo celular en el interior del corte de tejido. Además, el grosor del corte de tejido se debería seleccionar para que mantenga la actuación metabólica del corte de tejido durante la incubación. Por lo tanto el grosor del corte tisular puede ser de 200 μm a 400 μm , preferentemente de 250 μm a 350 μm y más preferentemente aproximadamente 300 μm .

El aparato para seccionar el material de biopsia fresco puede ser un cortador de tejido. Un cortador de tejidos para la preparación de los cortes tisulares está disponible en Leica Microsysteme Vertrieb GmbH, 35578 Wetzlar. Por ejemplo, el microtomo de cuchilla VT 1200S vibratome® es adecuado para el fin de obtener cortes de tejido para los métodos de la invención. También es adecuado un cortador de tejidos disponible en Leica Microsysteme Vertrieb GmbH y el cortador de tejidos Mcllwain de Campden Instruments, Ltd., Loughborough, Leics, UK. El denominado cortador de tejidos permite una preparación rápida de los cortes de tejido.

Una característica esencial de la invención es que los cortes de tejido se incuban en un medio de cultivo celular durante un cierto periodo de tiempo. Esta incubación permite la degradación o metabolización de fármacos en los

5 cortes tisulares que se hayan dado al paciente antes de tomar la biopsia y para eliminar los efectos de la biopsia sobre el metabolismo energético de los cortes de tejido inducidos por la cirugía o por el cuerpo del paciente, por ejemplo, el estatus de nutrición del paciente, la medicación o las enfermedades crónicas. Durante la incubación, los cortes tisulares recuperados de los efectos de la nutrición fármacos y cirugía sobre el tejido. Después de la incubación de los cortes tisulares dichos efectos sobre el corte tisular se deberían eliminar. Después de la incubación de los cortes tisulares de acuerdo con la invención los efectos de la nutrición, medicación o cirugía no tendrán ninguna influencia en la actividad enzimática de las enzimas clave en el metabolismo energético de los cortes de tejido. Este es el estado en el que se alcanzará para la determinación de las actividades enzimáticas de acuerdo con la invención. Por esta razón la incubación se lleva a cabo y se considera una etapa esencial en el procedimiento de la invención.

15 El experto en la técnica entenderá que la duración del periodo de incubación puede variar de tipo y dosificación del medicamento que se administraba al paciente antes de la biopsia/cirugía y de las influencias del tipo de biopsia o cirugía, pero es plausible una normalización para un periodo de tiempo definido.

20 En consecuencia, la duración mínima de este periodo debería ser tan larga como se necesite para conseguir que la condición del tejido en la influencia de sustratos o fármacos sobre las enzimas del perfil del metabolismo energético se pueda excluir esencialmente. En consecuencia, el periodo de incubación, por ejemplo, puede ser de 16 a 28 horas. Preferentemente, se puede seleccionar un periodo de incubación de 24 horas para el fin de la invención. La invención sugiere un periodo de incubación de 24 horas. Lo más probable es que después del periodo de tiempo de incubación los efectos de fármacos y la cirugía sobre la actividad enzimática en el corte de tejido se puedan despreciar.

25 Para la incubación de la muestra o el material de biopsia y los cortes de tejido son adecuados medios de cultivo celular habituales. Dichos medios de cultivo celular están disponibles en el mercado. El medio de cultivo celular PRMI 1640 es un medio que se puede utilizar en el almacenamiento y transporte de la muestra o material de biopsia y la incubación de los cortes de tejido. La incubación de una muestra de tejido para normalizar la condición metabólica de las muestras es una importante característica del método de la invención.

30 Para la incubación, las muestras se mantienen en una atmósfera normal. Si de acuerdo con un método alternativo de la invención los cortes de tejido se incubarán en condiciones anaeróbicas o anóxicas para fines de referencia, las muestras de tejido se pueden mantener en una atmósfera de nitrógeno o dióxido de carbono o que carezca de oxígeno. Se prefiere una atmósfera de dióxido o nitrógeno, sin o sustancialmente sin oxígeno. Particularmente se prefiere el dióxido de carbono.

35 Después de la incubación en el medio de cultivo celular los cortes de tejido se procesan a homogenados celulares seguido por el fraccionamiento del homogenado celular a citosol y componentes subcelulares. La preparación del homogenado celular se lleva a cabo en un tampón de desintegración con aparato adecuado para la rotura celular suave. Para este fin un se puede utilizar una picadora de Potter para tejidos para la homogeneización de tejidos y células. Es importante que las paredes celulares se rompan pero no las membranas mitocondriales. Dichos aparatos se describen en Nature Protocols 7, 1235-1246 (2012) y están disponibles, por ejemplo, en Sartorius AG, Alemania. Por ejemplo, se pueden romper los cortes de tejido de tejido tumoral con un homogeneizador de Potter-Elvehjem. Un tampón de desintegración adecuado es, por ejemplo, un denominado tampón A, que consiste en 250 mM de sacarosas, 50 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 20 mM de Tris/HCl, y agua a pH 7,4 mediante doce aplastamientos sin dañar la integridad de las mitocondrias. Las mitocondrias y el citosol se pueden acumular por centrifugación diferencial (600 g, 5 minutos, sobrenadante 10.000 g, 10 minutos, el aglomerado es la fracción mitocondrial, el sobrenadante es la fracción citosólica). En el caso de cantidades limitadas de muestra, se pueden utilizar homogenados tisulares o celulares para la medición de las actividades enzimáticas. Estos homogenados se pueden ganar por destrucción celular mecánica (es decir por picadora tisular de Potter o sonicación) o química (es decir, detergentes).

55 Las actividades enzimáticas se pueden medir por reacciones conocidas y bien descritas basándose en las reacciones mencionadas anteriormente. Dichas reacciones se habían descrito en los libros de texto anteriormente. Posteriormente se indican posibles concentraciones de reactivos para la detección de actividad enzimática de un grupo de enzimas clave del metabolismo energético.

Enzima	Tampón A con los aditivos:	Enzima (Sigma-Aldrich)	Principio de medición
Hexocinasa	1 mM glucosa 0,5 mM NADP 1 mM ATP	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa Reserva 2 U/ml	NADP-reducción
Malato descarboxilasa	2 mM malato 0,5 mM NADP		NADP-reducción

Piruvato cinasa de baja afinidad	10 mM PEP 1 mM ADP 0,5 mM NADH	Lactato deshidrogenasa Reserva 6 U/ml	NADH-oxidación
Piruvato cinasa de alta afinidad	0,1 mM PEP 1 mM ADP 0,5 mM NADH	Lactato deshidrogenasa 6 U/ml	NADH-oxidación
Lactato deshidrogenasa	1 mM piruvato 0,5 mM NADH		NADH-Oxidación
Complejo IV	120 mM CPI 0,05 % Lauril-maltósido	3 µl de citocromo C reducido (5 mM) por pocillo	Oxidación de citocromo C reducido

La determinación del Complejo IV se llevó a cabo a 25 °C, en una placa de 96 pocillos durante 10 minutos a 540-550 nm; la determinación del resto de enzimas en placa de 96 pocillos a 37 °C durante 30 minutos (simultánea) a 340-400 nm, tipo de fotómetro SPECTRAMax® PLUS 384 de Molecular Devices.

5 Para la determinación de la actividad del complejo IV el citocromo C en forma reducida se oxida. Para proporcionar citocromo C reducido como sustrato para la reacción de oxidación mencionada anteriormente el citocromo C se trata con una solución de ditionita sódica. Por ejemplo, se pueden tratar 2,7 ml de una solución de reserva de citocromo C (oxidado) con 0,3 ml de una solución de ditionita sódica 1 M. Esta solución de reserva se puede almacenar en un
10 tampón de fosfato 20 mM que se mantienen en una atmósfera de nitrógeno. Para la purificación de la solución de reserva se pueden utilizar columnas Econo®-Pc 10DG.

15 En una realización particular preferida de la invención, los reactivos necesarios para la determinación de la actividad enzimática se depositan como sólidos en el fondo y/o la pared de placas con pocillos. Las placas con pocillos tratadas de esta manera permiten la adición de la muestra en un tampón de muestra y la medición fotométrica de la actividad de diferentes enzimas de las muestras en los pocillos de la placa.

20 Las placas con pocillos con los reactivos depositados en las paredes y/o fondo de los pocillos se pueden obtener, por ejemplo, por tratamiento de los pocillos de una placa con pocillos con una cierta cantidad de una solución tampón con los reactivos necesarios para la determinación de la actividad enzimática en una concentración adecuada. Los pocillos tratados al vacío se secan de esta manera a una temperatura baja para evaporar el agua de la solución tampón. Los reactivos secados para la determinación de la actividad enzimática de una enzima específica se adhieren al fondo y las paredes del pocillo.

25 La próxima etapa en los métodos de la invención se generar el cociente de las actividades enzimáticas específicas en la muestra de tejido tumoral y en la muestra de tejido distante del tumor o en el tejido tumoral normóxico (masa celular) y el tejido tumoral anóxico (masa celular).

30 Si, por ejemplo, se consideran las actividades enzimáticas de las enzimas ME1, LDH, PKLA como enzimas anaeróbicas y las enzimas aeróbicas PKHA, COX, en cada uno de los tejidos tumorales y tejido distante del tumor de un paciente, primero se forman los cocientes de las actividades enzimáticas medidas de ME1/ME1, LDH/LDH, PKLA/PKLA, PKHA/PKHA y COX/COX y en la próxima etapa, se ponen en una relación (razón) entre ellas como se forma en la siguiente ecuación:

$$\frac{ME1 + LDH + PKLA}{COX + PKHA}$$

35 El valor obtenido de esta ecuación es indicativo de la formación de metástasis en un paciente. Tanto los valores muy altos y muy bajos pueden reflejar un mal pronóstico, mientras que los valores intermedios reflejan un pronóstico favorable.

40 De manera alternativa, en el caso en el que el tejido distante del tumor no está disponible para la generación del cociente mencionado anteriormente, se compara la actividad de la enzima específica en condiciones normales de oxígeno con la actividad de la enzima específica en condiciones anaeróbicas máximas y se expresa como un valor en porcentaje. Por lo tanto, la actividad enzimática específica en la muestra de tejido tumoral en condiciones
45 anaeróbicas máximas se considera que es el 100 %. Basándose en el valor del 100 %, se calcula el valor del porcentaje de la actividad enzimática específica obtenido después de la incubación sin ajustar una condición anaeróbica (contenido de oxígeno regular) en la muestra de tejido tumoral. Por lo tanto, también en este método alternativo se forma un cociente de la medida de la actividad enzimática en presencia de oxígeno y sin oxígeno. Los cocientes se ponen en una ecuación como se ha mostrado anteriormente. El valor resultante (relación) es indicativo

del pronóstico incluyendo la predicción de la probabilidad de la formación de metástasis, recaída o recurrencia local en un paciente.

5 Para la evaluación de la situación patológica del paciente puede ser ventajoso un valor de corte. El denominado valor de corte se obtiene por análisis estadístico de una gran cohorte de pacientes (500 y más pacientes) en consideración de los cocientes o resultados de los métodos de la invención.

10 Posteriormente la invención se explica adicionalmente basándose en las Figuras y la Tabla desvelada en el presente documento. En la tabla el estado N significa pacientes con metástasis en ganglios linfáticos y/o distante ($N \geq 1$) y sin metástasis (NO).

15 Para los datos presentados en la Tabla 1, se midió la actividad enzimática específica de enzimas clave de todos los metabolismos energéticos esenciales en la célula. La actividad de ME1 proporciona datos sobre la glutaminólisis. Con la actividad de LDH se proporcionan los datos de la última etapa de la reacción de glicólisis anaeróbica y la glutaminólisis anaeróbica. La actividad de PKLA proporciona datos sobre la rama anaeróbica de la glicólisis. La actividad de PKHA proporciona datos de la rama aeróbica de la glicólisis y la actividad de COX proporciona datos sobre la fosforilación oxidativa (consumo de oxígeno mitocondrial).

20 La Tabla 1 muestra los datos medidos de todas las relaciones posibles combinatoriamente de las enzimas anaeróbicas (ME1, LDH, PKLA) en relación con las enzimas aeróbicas (PKHA, COX). La relación de ganancia de energía anaeróbica respecto a aeróbica en pacientes con cáncer de colon con un estado de $N \geq 1$ aumenta significativamente (nº 15, nº 17-18, nº 20 y nº 26) como se muestra por los valores el ensayo-t de la diferencia absoluta (dif) o relativa (razón). Esto es plausible.

25 Es posible una evaluación del riesgo basándose en los valores medidos y basándose en el nivel ya calculado de significación con un cociente, por ejemplo, en el que se incluye la enzima ME1 y al menos una enzima del metabolismo energético anaeróbico y aeróbico medido.

30 En resumen, se puede concluir, que el aumento de ganancia energética anaeróbica en los cortes de tejido se correlaciona significativamente con la progresión tumoral mientras que el metabolismo en las criobiopsias (de los mismos pacientes), si acaso, solo permite diferenciar entre tejido tumoral y tejido no tumoral. Además, los valores obtenidos de las criobiopsias muestran una disminución de la ganancia de energía anaeróbica (nº 6, nº 8-9, nº 11-12, nº 14-15, nº 17-18, nº 20-21, nº 23-24 y nº 26) o aeróbica (nº 4, nº 5) cuando aumenta la progresión tumoral lo que, basándose en el conocimiento general de la biología tumoral, no es posible. La razón para esta incapacidad de las mediciones en los cortes de criotejidos para diferenciar entre el estado N0 y $\geq N1$ basándose en su perfil energético puede carecer de normalización en el método de medición.

40 De acuerdo con la invención los cortes de tejido metabolizan en condiciones estrictamente normalizadas (grosor de corte de difusión activa de 300 μm , medio RPMI, 37 $^{\circ}\text{C}$, un 5 % de CO_2 , tiempo de incubación de 24 h) mientras que las muestras tomadas de criobiopsias inmediatamente antes de la medición de la actividad enzimática puede sufrir de ofrecer sustratos individuales profundamente diferentes y e influencias diversas adicionales fuertemente variables tales como los hábitos alimentarios, enfermedades crónicas, estación, edad, género y estado hormonal del cuerpo de los respectivos pacientes. Las mediciones muestran que solo el tratamiento y el procedimiento de medición de las muestras normalizadas permite un pronóstico significativo del riesgo de progresión de un carcinoma que tenga sentido biológicamente basándose en el conocimiento de los tumores.

50 Se utilizan las siguientes abreviaturas en la Tabla 1: N = estado de los ganglios linfáticos de acuerdo con la clasificación TNM de la OMS (7ª edición), media = valor medio, SD = desviación típica, n = número de pacientes, los valores de p (probabilidad) $< 0,05$ se consideraban estadísticamente significativos (ensayo T emparejado, de dos colas, tipo 2, software utilizado: Excel®. ME1: enzima málica 1, LDH: lactato deshidrogenasa, PKLA: piruvato cinasa de baja afinidad (dímero fosforilado de PK-M2), PKHA: piruvato cinasa de alta afinidad (tetramero no fosforilado de PK-M2), COX: Citocromo C oxidasa.

55 Todas las actividades enzimáticas se dan como una relación de la actividad enzimática respectiva del tumor de colon y el tejido distante del tumor en la Tabla 1. Esto servirá para considerar diferencias potenciales en el metabolismo de pacientes individuales y para considerar la influencia estadística de una enzima con actividad específica baja en general.

60 La Fig. 1 muestra una presentación gráfica de los valores de la muestra nº 26 de la Tabla 1. Estos son los cocientes obtenidos del tejido tumoral y el tejido distante del tumor de un paciente y las actividades enzimáticas de enzimas del metabolismo energético anaeróbico y aeróbico. En un grupo, se obtienen los datos de actividad enzimática a partir de cortes de tejido de acuerdo con el método de la invención después de 24 horas de incubación. En el otro grupo se miden las actividades enzimáticas de la misma manera pero el corte de tejido es un tejido de criobiopsia sin la incubación de 24 horas. La Fig. 1 muestra que en vista de la discriminación entre el estado de N0 (sin metástasis en ganglios linfáticos) y $\geq N1$ (presencia de metástasis en ganglios linfáticos) en pacientes de cáncer de colon los datos obtenidos de acuerdo con la invención son superiores que los obtenidos de la criobiopsia. En un tumor con

metástasis en ganglios linfáticos el metabolismo energético de las muestras de tejido de criobiopsia es cada vez más anaeróbico. Esto no se establece sin embargo en la relación de metabolismo energético anaeróbico/aeróbico para las muestras de tejido de criobiopsia en la Fig. 1, debido a los valores altos de p en comparación con los valores de p de las muestras de tejido fresco acondicionados de acuerdo con el procedimiento de la invención.

5 La Fig. 2 muestra una presentación gráfica de los cocientes individuales del metabolismo energético anaeróbico y aeróbico sin un tejido normal como referencia de once pacientes con un carcinoma de colon y de siete pacientes con leucemia linfocítica crónica utilizando la relación nº 26 de la tabla 1. Las actividades enzimáticas (mU/mg de proteína) de las enzimas indicadas se midió en condiciones de contenido de oxígeno regular y en anoxia. La condición de anoxia se estableció mediante la incubación de las muestras de tejido en bolsas que contenían CO₂ durante un periodo de tiempo de 24 horas. Se formó un cociente individual de la actividad enzimática que se medía en una muestra de tejido anaeróbico y en una muestra de tejido incubada en presencia de contenido regular de oxígeno. La representación gráfica muestra los valores medidos en condiciones de contenido regular de oxígeno como parte (veces de cambio) del valor obtenido en condiciones de anoxia. El valor medio para los pacientes de carcinoma colorrectal (sin metástasis de ganglios linfáticos y sin metástasis distante) alcanzaban $0,77 \pm 0,36$ (veces de cambio) y el valor medio de los pacientes con carcinoma colorrectal (con metástasis en ganglios linfáticos y/o metástasis distante) alcanza $1,57 \pm 0,54$ (veces de cambio) del valor de referencia individual máximo en condiciones de anoxia de las muestras de tejido (Fig. 2A, n = 11, p = 0,04; ensayo T de doble lado, tipo 2, software: Excel®). La Fig. 2B muestra la distribución de las valoraciones individuales del paciente para los carcinomas colorrectales (n = 11).

El valor medio para los pacientes con leucemia linfocítica crónica (sin factores de alto riesgo: inactivación de la mutación TP53 y/o del(17p) y/o refractaria a las terapias convencionales actuales y/o remisión a corto plazo (<2 años)) alcanzaba $1,49 \pm 0,16$ (veces de cambio) y el valor medio de leucemia linfocítica crónica (con factores de alto riesgo: inactivación de la mutación TP53 y/o del(17p) y/o refractaria a las terapias convencionales actuales y/o remisión a corto plazo (<2 años)) alcanza $2,28 \pm 0,33$ (veces de cambio) de la referencia individual máxima obtenida en condiciones anóxicas de las muestras de tejido (Fig. 2 C, n = 7, p = 0,006, Ensayo-t, de doble lado, tipo 2, software: Excel®). La Fig. 2D muestra la distribución de las valoraciones individuales del paciente para la leucemia linfocítica crónica (n = 7). Por lo tanto, este método es adecuado para los fines de la invención en los que no existe un tejido normal como muestra de referencia.

Posteriormente, la invención y su aplicación a un paciente se explican adicionalmente en los siguientes ejemplos. Se debería entender que estos ejemplos son solamente con fines ilustrativos y no se consideran como limitantes de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplo 1

Recomendación de terapia para un paciente con carcinoma de colon (paciente A) en estadio II según UICC sin factores de riesgo después de la resección de colon curativa basándose en su perfil metabólico energético.

De acuerdo con las directrices S3 de "Kolarektales Karzinom" 2004/2008 (que resultan de las evidencias basadas en las conferencias de consenso 06./07.02.2004 y 08./09.06.2007, "S3 guideline "Colorectal Cancer" 2004/2008) es posible llevar a cabo una quimioterapia adyuvante en un paciente que tiene un carcinoma colorrectal con una resección curativa en estadio II (grado de recomendación 0, evidencia 1b, fuerte consenso). Sin embargo, el uso obligatorio de una quimioterapia adyuvante (postoperatoria) en este estadio puede que no se derive actualmente de los presentes estudios aleatorios. En consecuencia, en el presente caso, la recomendación es que se debería al menos tener en cuenta una terapia y que se debería discutir individualmente. Esto significa que los profesionales de la salud actuales no están seguros si seleccionar una opción de terapia y si el caso es afirmativo cual opción de terapia deberían seleccionar y cómo puede ser el pronóstico de dichos pacientes. Como factores de riesgo en el estadio II de UICC se definen un estadio R7, una perforación tumoral o una laceración tumoral, una cirugía en condiciones de emergencia y un número demasiado limitado de ganglios linfáticos examinados. El paciente A se codifica en la clasificación pT3, pN0 (0/31), G2, R0 de TNM y de acuerdo con las directrices S3 dicho paciente no está en situación de riesgo.

El tejido de cáncer de colon o tejido distante del tumor de colon de dicho paciente se sometió al método de la invención y se determinaron las siguientes actividades enzimáticas (las mediciones se llevaron a cabo en condiciones normóxicas): tejido distante del tumor de colon: COX = 0,93 mU/mg, LDH = 245 mU/mg, ME1 = 0,84 mU/mg, PKLA 226 mU/mg, PKHA = 43 mU/mg; tejido de cáncer de colon: COX = 0,93 mU/mg, LDH = 220 mU/mg, ME1:1,2 mU/mg, PKLA = 211 mU/mg, PKHA = 29 mU/mg; cociente (ME1+LDH+PKLA)/(COX+PKHA) = 3,50.

Con determinaciones paralelas de la actividad enzimática de acuerdo con el método alternativo de la invención se obtuvieron los siguientes valores en condiciones anóxicas en el tejido de cáncer de colon: COX=2,29 mU/mg, LDH = 565 mU/mg, ME1 = 2,74 mU/mg, PKLA = 528 mU/mg, PKHA = 109 mU/mg, la relación (ME1+LDH+PKLA)/(COX+PKHA) es 1,8.

En consecuencia, la relación basada en el metabolismo energético anaeróbico respecto a aeróbico en tejido distante del tumor de colon es de 3,50. Teniendo en cuenta la combinación de enzimas seleccionadas de este ejemplo para la determinación del cociente, un valor de 1,50 se corresponde con un equilibrio igual entre el metabolismo energético anaeróbico y aeróbico (numerador = 1,0 + 1,0 + 1,0; denominador = 1,0 + 1,0; el cociente es 1,5).

5 Basándose en su tejido normal, la relación de metabolismo energético anaeróbico respecto a aeróbico es más de 2,3 veces mayor en el tejido tumoral del paciente A. Basándose en la relación de su tejido tumoral tratado anóxicamente la relación de metabolismo energético anaeróbico respecto a aeróbico del paciente A es más de 1,2 veces mayor. Si se tiene en cuenta valores de corte para el método que se lleva a cabo en el tejido normal distante del tumor de 3,0 (los valores $\geq 3,0$ se asocian con un peor pronóstico) y de 1,0 con el método con el tejido tumoral

10 tratado anóxicamente (valores $\geq 1,0$ se asocian con un peor pronóstico), el resultado de ambos métodos de la invención para el paciente A se asocian con un peor pronóstico.

Basándose en la invención, la recomendación para el paciente A en consecuencia es la aplicación de una terapia adyuvante que contenga oxaliplatino. Esta terapia es obligatoria para los pacientes en estadio III de UICC. Los

15 pacientes en estadio III de UICC formalmente tienen un peor pronóstico en comparación con la evaluación del paciente A de acuerdo con las directrices válidas actualmente. Por lo tanto, basándose en los resultados del método de la invención, la terapia para el paciente A sería de acuerdo con el protocolo de quimioterapia de las directrices S3 para los pacientes en estadio III de UICC aunque, a pesar del hecho de que no hay metástasis en ganglios linfáticos en el momento de la cirugía y a pesar del hecho de que de acuerdo con las directrices los factores de riesgo de este

20 paciente son bajos, el hecho es que este paciente tiene que esperar la metástasis o una recaída con un curso finalmente letal.

Ambos valores de corte se seleccionan como ejemplos pero son realistas.

25 Ejemplo 2

Pronóstico y recomendación de terapia para un paciente asintomático de CLL (leucemia linfocítica crónica) (paciente B) basándose en su perfil metabólico energético tumoral

30 El paciente B se diagnosticó por primera vez con CLL asintomática en 1994. Aunque en esa época el paciente no presentaba ningún síntoma. De acuerdo con las directrices en esa época (<http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/ctl>) y se seleccionó tener una actitud observadora en vez de una terapia a condición de que no se produjeran síntomas (“eyo”, “esperar y observar”). Desde entonces los análisis citogenéticos molecular FISH (hibridación *in situ* de fluorescencia) basados en la detección de una mutación de eliminación de 17p13 y *TP53* eran negativos. Los pacientes con mutación de eliminación de 17p13 y mutación inactivante *TP53*

35 muestran tasas de respuesta baja y de supervivencia libre de progresión y supervivencia total más cortas de acuerdo con las directrices de la CLL. En 2010 el paciente se diagnosticó de una mutación clónica *TP53* rara (en 2,51 % de las células tumorales) pero seguía siendo asintomático. En el momento de la transferencia del material de la muestra de tejido el paciente B para su examen, el paciente había llegado a ser clínicamente sintomático.

40 En este caso, se llevó a cabo el método alternativo de la invención con mediciones adicionales de la actividad enzimática en condiciones anóxicas, ya que este tumor no permite la obtención de las correspondientes células normales. Se purificaron 2×10^7 células tumorales de acuerdo con un procedimiento convencional con gradientes de Ficoll® a partir de una muestra de sangre del paciente y se proporcionaron para su examen en medio de cultivo celular RPMI-1640. Paralelamente, el hospital llevó a cabo un análisis de aberración cromosómica, análisis de eliminación y análisis de mutación genética con un material de muestra del paciente B. De acuerdo con el método

45 alternativo de la invención descrito anteriormente se determinaron las siguientes actividades enzimáticas en la masa celular del tumor leucémico (se indican entre paréntesis las actividades enzimáticas en condiciones de contenido normal de oxígeno y anóxica): COX = 0,86 (0,71) mU/mg, LDH = 89 (82) mU/mg, ME1 = 0,19 (0,07) mU/mg, PKLA = 159 (132) mU/mg, PKHA = 13 (16) mU/mg;

50

$$\text{relación (ME1 + LDH + PKLA) / (COX + PKHA) = 2,51.}$$

Basándose en este análisis y en consideración del tumor el valor de corte a modo de ejemplo, pero realista es de

55 2,0. Esto significa que valores mayores de 2,0 se asocian con un pronóstico peor; en consecuencia el pronóstico para la paciente B (cociente 2,51) es bastante malo.

Por el contrario, las directrices actuales de CLL consideran para el paciente B, que se consideró clínicamente como apto (“go go”), dos opciones de terapia, que dependen del resultado del análisis cromosómico. En el caso en el que

60 el paciente B no tenga una eliminación del cromosoma 17 (del(17p)) se tiene que seleccionar el llamado esquema FCR para la terapia (Fluradabina, Ciclofosfamida, Rituximab). Con del(17p) se debería seleccionar una terapia alternativa de acuerdo con las directrices para la CLL. En este caso las directrices para CLL recomiendan la administración de Alemtuzumab con trasplante posterior de células madre sanguíneas alogénicas debido a que esta terapia puede permitir una supervivencia libre de enfermedad más larga. Una mutación *TP53* inactivante a menudo

65 acompaña una del(17p), sin embargo una mutación inactivante *TP53* sin una del(17p) es bastante rara. No obstante una mutación inactivante *TP53* por sí misma se asocia con un pronóstico muy malo y con tasas de respuesta

menores al esquema denominado FCR. Las directrices de CLL, sin embargo, no dan una clara recomendación de la terapia preferida para los pacientes de CLL con la mutación *TP53*.

5 Basándose en el método de la invención la recomendación para el paciente B es la administración de Alemtuzumab con el posterior trasplante de células madre sanguíneas alogénicas consolidantes. Esta recomendación es válida a pesar de la falta de *del(17p)*. En el caso que nos ocupa las directrices sugieren una progresión de la enfermedad más favorable y una mejor respuesta a un esquema de terapia diferente del esquema FCR. Entre tanto, el diagnóstico clínico para el paciente B revelaba que había ocurrido una expansión clónica de las células mutantes de *TP53*. Finalmente la recomendación de terapia basándose en el método de la invención habría sido conforme a la de las directrices de CLL. Este caso muestra que utilizando el método de la invención era posible recomendar una terapia y dar un pronóstico correspondiente a las directrices en solo 24 h. Por el contrario, el diagnóstico cromosómico y el análisis de mutación (ensayos clínicos habituales) como se llevó a cabo en el paciente B necesitan hasta dos semanas y son muy caros. Por lo tanto, el método reivindicado es mucho más barato y rápido.

15 En una pequeña cohorte de siete pacientes de CLL era posible identificar dos pacientes (el paciente B y el paciente C) con una precisión del 100 % que tienen un pronóstico bastante peor. El paciente C no respondía a la terapia y de acuerdo con las directrices del CLL del paciente C tenía un tiempo de supervivencia estadístico de 1 a 2 años. Con el método de la invención basado en la actividad enzimática medida en condiciones normales de oxígeno y en condiciones anóxicas se obtuvieron los siguientes valores (los valores para la anoxia están entre paréntesis): COX = 1,16 (1,38) mU/mg, LDH = 125 (126) mU/mg, ME1 = 0,25 (0,23) mU/mg, PKLA = 108 (106) mU/mg, PKHA = 12 (18) mU/mg; ratio $(ME1+LDH+PKLA)/(COX+PKHA) = 2,04$.

25 Basándose en los análisis y en la consideración de un valor de corte realista seleccionado a modo de ejemplo para este tumor de 2,0 (valores > 2,0 se asocian con peor pronóstico, el pronóstico para el paciente C es bastante malo).

30 Para los siete pacientes de CLL examinados el valor medio del cociente para los pacientes con un buen pronóstico verificable era de $1,49 \pm 0,16$. Para los pacientes con un pronóstico verificable bastante peor (mutación *TP53* o sin respuesta a la terapia) el valor medio del cociente era de $2,28 \pm 0,33$. La distinción estadística de la diferencia de los valores medios era altamente significativa con una $p = 0,006$ ($p < 0,05$, ensayo, de doble lado, tipo 2, software: Excel®). Un cociente sorprendentemente bajo del metabolismo energético anaeróbico respecto al aeróbico está presente en el paciente D; el valor era de 1,24, es decir, claramente por debajo de 2,0. La recomendación de terapia para el paciente D sintomático es el esquema de tratamiento FCR, su curso de enfermedad es bastante favorable. Como se correlaciona con las mediciones, de acuerdo con el método de la invención, se esperaría que idealmente el análisis clínico del cromosoma y mutación idealmente no presente cambios. De hecho, el análisis clínico confirmaba que los pacientes de CLL examinados solamente el paciente D presentaba no solo ninguna presencia de *del(17p)* ni una mutación *TP53*, sino también ninguna aberración cromosómica en absoluto. De acuerdo con las directrices de CLL se puede esperar una patogénesis bastante favorable para el paciente D.

Nº	Relación enzimática [(mU/mg proteina)/ (mU/mg proteina)]	crifo biopsia						Cortes de tejido								
		N=0			N>1			n	Valor p (razón)	Valor p (dif)	N=0		N>1		Valor p (razón)	n
		media	SD	media	SD	media	SD				media	SD				
1	ME1 _{tu} /ME1 _{co}	1,23	0,32	1,46	0,28	0,44	6	0,40	0,44	1,22	0,34	0,37	0,40	11		
2	LDH _{tu} /LDH _{co}	1,79	0,88	2,25	0,19	0,53	6	0,43	0,53	1,53	0,43	0,33	0,30	9		
3	PKLA _{tu} /PKLA _{co}	1,46	0,56	2,07	1,06	0,38	6	0,70	0,38	1,37	0,57	0,40	0,45	9		
4	PKHA _{tu} /PKHA _{co}	1,12	0,46	2,53	0,84	0,05	6	0,09	0,05	0,82	0,54	0,21	0,13	9		
5	COX ⁺ /COX ⁻	0,54	0,20	0,66	0,69	0,76	6	0,83	0,76	0,48	0,14	0,23	0,27	8		
6	(ME1 _{tu} /ME1 _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co})	1,28	0,67	0,63	0,32	0,28	6	0,21	0,28	1,79	0,67	0,07	0,39	8		
7	(ME1 _{tu} /ME1 _{co})/(COX _{tu} /COX _{co})	2,56	1,20	5,38	6,05	0,37	6	0,68	0,37	2,56	0,34	0,29	0,12	8		
8	(ME1 _{tu} /ME1 _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co}) ⁺	0,75	0,22	0,54	0,35	0,40	6	0,33	0,40	1,02	0,28	0,05	0,96	8		
9	(LDH _{tu} /LDH _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co})	1,70	0,73	0,93	0,23	0,24	6	0,18	0,24	2,23	1,00	0,08	0,65	8		
10	(LDH _{tu} /LDH _{co})/(COX _{tu} /COX _{co})	3,82	2,25	7,22	7,25	0,39	6	0,58	0,39	3,38	1,11	0,28	0,19	8		
11	(LDH _{tu} /LDH _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co}) ⁺	1,07	0,49	0,78	0,31	0,51	6	0,45	0,51	1,29	0,45	0,08	0,81	8		
12	(PKUV/PKLA ⁺)/(PKHA _{tu} /PKHA _{co})	1,35	0,34	0,79	0,15	0,10	6	0,07	0,10	1,90	0,84	0,10	0,75	8		
13	(PKUV/PKLA ⁺)/MCOX ⁺ /COX ⁺	3,23	2,00	5,10	3,72	0,44	6	0,51	0,44	2,93	1,15	0,35	0,22	8		
14	(PKLA _{tu} /PKLA _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co})	0,86	0,28	0,65	0,02	0,36	6	0,37	0,36	1,10	0,35	0,08	0,68	8		
15	(ME1 _{tu} /ME1 _{co}) ⁺ (LDH _{tu} /LDH _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co})	2,99	1,28	1,56	0,55	0,22	6	0,18	0,22	4,02	1,47	0,05	0,04	8		
16	(ME1 _{tu} /ME1 _{co}) ⁺ (LDH _{tu} /LDH _{co})/(COX _{tu} /COX _{co})	6,38	3,41	12,60	13,30	0,38	6	0,62	0,38	5,94	1,20	0,24	0,14	8		
17	(ME1 _{tu} /ME1 _{co}) ⁺ (LDH _{tu} /LDH _{co})/(PKHA ⁺ /PKHA ⁺ WCOX ⁺ /COX ⁺)	1,82	0,66	1,32	0,66	0,44	6	0,36	0,44	2,31	0,60	0,04	0,06	8		
18	(ME1 _{tu} /ME1 _{co}) ⁺ (PKLA _{tu} /PKLA _{co})/(PKHA _{tu} /PKHA _{co})	2,53	0,90	1,42	0,17	0,15	6	0,11	0,15	3,69	1,30	0,06	0,04	8		

Nº	Relación enzimática [(mU/mg proteína)/(mU/mg proteína)]	crio biopsia				Cortes de tejido								
		N=0		N>1		N=0		N>1		Valor p (razón)	n			
		media	SD	media	SD	media	SD	media	SD					
19	$[(ME1_{tu}/ME1_{co})+(PKLA_{tu}/PKLA_{co})]/(COX_{tu}/COX_{co})]$	5,79	3,17	10,48	9,77	0,39	0,55	4,16	1,97	5,49	1,13	0,26	0,15	8
20	$[(ME1_{tu}/ME1_{co})+(PKLA_{tu}/PKLA_{co})]/[(PKHA_{tu}/PKHA_{co})+(COX_{tu}/COX_{co})]$	1,61	0,41	1,19	0,32	0,28	0,22	1,16	0,45	2,11	0,46	0,03	0,03	8
21	$[(LDH_{tu}/LDH_{co})+(PKLA_{tu}/PKLA_{co})]/(PKHA_{tu}/PKHA_{co})]$	3,05	1,06	1,72	0,08	0,17	0,11	1,72	1,03	4,13	1,80	0,08	0,05	8
22	$[(LDH_{tu}/LDH_{co})+(PKLA_{tu}/PKLA_{co})]/(COX_{tu}/COX_{co})]$	1,93	0,75	12,31	10,96	0,41	0,54	4,20	3,11	6,30	2,17	0,30	0,16	8
23	$[(LDH_{tu}/LDH_{co})+(PKLA_{tu}/PKLA_{co})]/[PKHA_{tu}/PKHA_{co}+WCOX_{tu}/COX_{tu}]$	1,93	0,75	1,43	0,29	0,44	0,41	1,18	0,73	2,39	0,77	0,07	0,24	8
24	$[(ME1_{tu}/ME1_{co})+(LDH_{tu}/LDH_{co})+(PKLA_{tu}/PKLA_{co})]/(PKHA_{tu}/PKHA_{co})]$	4,33	1,57	2,35	0,40	0,17	0,13	2,59	1,27	5,92	2,22	0,06	0,05	8
25	$[(ME1_{tu}/ME1_{co})+(LDH_{tu}/LDH_{co})+(PKUV/PKLA_{tu})+MCOX_{tu}/COX_{tu}]$	9,61	5,35	17,70	17,02	0,39	0,56	6,34	3,74	8,86	2,18	0,26	0,16	8
26	$[(ME1_{tu}/ME1_{co})+(LDH_{tu}/LDH_{co})+(PKUV/PKLA_{tu})/(PKHA_{tu}/PKHA_{tu})+HCOX_{tu}/COX_{tu}]$	2,68	0,90	1,97	0,64	0,39	0,32	1,77	0,87	3,40	0,87	0,04	0,03	8

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico para la predicción del pronóstico de un tumor, que incluye la probabilidad de formación de metástasis, la aparición de recaídas y/o la recurrencia local y la provisión de una recomendación de una terapia, que comprende las etapas de
- (a) incubación de un material de muestra tumoral fresco del paciente y un material de muestra fresco comparativo del paciente en un medio de cultivo para permitir la eliminación de los efectos de la nutrición, de los fármacos y de la biopsia sobre el metabolismo energético en los materiales de muestra;
- (b) preparación de un homogenado celular y fracciones subcelulares a partir de los materiales de muestra de la etapa (a);
- (c) determinación de las actividades enzimáticas de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético del homogenado celular o de la fracción subcelular y determinación de un cociente de la actividad enzimática que se determina en el material de muestra y el material de muestra comparativo;
- (d) cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (c) en el material de muestra y en el material de muestra comparativo.
- en el que el material de muestra del paciente se selecciona de entre cortes de tejido, una masa celular tumoral y células aisladas y el material de muestra comparativo se selecciona de entre un corte de tejido distante del tumor o un material que en la etapa (a) se ha incubado en condiciones que regulan positivamente el metabolismo energético anaeróbico y se selecciona de entre un corte de tejido tumoral, una masa celular tumoral y células aisladas.
2. Un método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de
- (a) incubación de cortes de tejido tomados de un material de biopsia de un tejido tumoral y de un tejido distante del tumor de un paciente en un medio de cultivo que permita la eliminación de los efectos de la nutrición, de los fármacos y de la biopsia sobre el metabolismo energético de los cortes de tejido;
- (b) preparación de un homogenado celular y fracciones subcelulares a partir de los cortes de tejido de la etapa (a);
- (c) determinación de actividades enzimáticas de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético del homogenado celular o de la fracción subcelular en el tejido tumoral y el tejido distante del tumor y determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima que se determina en el tejido tumoral y el tejido distante del tumor;
- (d) cálculo de la relación de ganancia de energía anaeróbica respecto a la aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (c) en el tejido tumoral y el tejido distante del tumor.
3. Un método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de
- (a) incubación de un corte de tejido tomado de un material de biopsia de un tejido tumoral de un paciente en un medio de cultivo celular para permitir la eliminación de los efectos de un fármaco, de la nutrición y de la biopsia sobre el metabolismo energético de los cortes de tejido;
- (b) incubación de un segundo corte de tejido del mismo material de biopsia en condiciones que regulen positivamente el metabolismo energético anaeróbico en el corte de tejido;
- (c) preparación de un homogenado celular y fracciones subcelulares a partir de los cortes de tejido de la etapa (a),
- (d) determinación de las actividades enzimáticas de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético del homogenado celular o de la fracción subcelular en el tejido tumoral y en una muestra de tejido tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente y formación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima en el tejido tumoral y en la muestra de tejido tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente;
- (e) cálculo de la relación de la ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (c) en el tejido tumoral y en la muestra de tejido tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente.
4. Un método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende las etapas de
- (a) incubación de una parte de una masa celular tumoral tomada de un paciente en un medio de cultivo que permita la eliminación de los efectos de un fármaco, de la nutrición y de la biopsia sobre el metabolismo energético;
- (b) incubación de la otra parte de la misma masa celular tumoral tomada del paciente en condiciones para regular positivamente el metabolismo energético anaeróbico;
- (c) preparación de un homogenado celular y fracciones subcelulares de la masa celular tumoral de la etapa (a),
- (d) determinación de la actividad enzimática de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético de la fracción subcelular o del homogenado celular en la masa celular tumoral y en la masa celular tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente y determinación de un

cociente de la actividad enzimática de una enzima en la masa celular tumoral y en la masa celular tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente;

(e) cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a la aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (c) en la masa celular tumoral de la etapa (a) y en la masa celular tumoral con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente.

5

5. Un método de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las etapas de

(a) aislamiento de células de una muestra sólida o líquida de un tumor tomada de un paciente, estimación del número de células aisladas, dilución de estas células e incubación de estas células en un medio de cultivo celular que permita la eliminación de los efectos de un fármaco, de la nutrición y de la biopsia sobre el metabolismo energético y para permitir la proliferación de las células;

10

(b) incubación de la misma cantidad de células que se aislaron y trataron como se ha descrito en (a) en condiciones que regulen positivamente el metabolismo energético anaeróbico;

15

(c) preparación de fracciones subcelulares y de un homogenado celular a partir de las células aisladas de las etapas (a) y (b);

(d) determinación de la actividad enzimática de al menos una enzima clave anaeróbica y al menos una aeróbica del metabolismo energético de la fracción subcelular o del homogenado celular en las células aisladas y en las células aisladas con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente y determinación de un cociente de la actividad enzimática de una enzima en las células aisladas de (a) y en las células aisladas con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente;

20

(e) cálculo de la relación de ganancia energética anaeróbica respecto a aeróbica o viceversa basándose en el cociente determinado en la etapa (d) en las células aisladas de la etapa (a) y en las células aisladas con el metabolismo energético anaeróbico regulado positivamente.

25

6. El método de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se seleccionan al menos una enzima anaeróbica y al menos una enzima aeróbica de las enzimas clave del metabolismo energético de la célula.

7. El método de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las enzimas clave del metabolismo energético de la célula se seleccionan de entre una o más de enzima málica (ME), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato cinasa de baja afinidad (PKLA o PK-M2 dimérica), hexocinasa y una acil-CoA deshidrogenasa y de una o más de las enzimas seleccionadas de entre piruvato cinasa de alta afinidad (PKHA; PK-M2 tetramérica) y citocromo C oxidasa (COX).

30

8. El método de diagnóstico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los reactivos para la determinación de la actividad enzimática se pre-depositan en las paredes de los pocillos de una placa con pocillos.

35

9. El uso del cociente de la actividad enzimática de al menos una enzima anaeróbica y al menos una enzima aeróbica de las enzimas clave del metabolismo energético determinado (i) en un tejido tumoral fresco y en comparación en un tejido fresco distante del tumor o (ii) en un tejido tumoral o células tumorales y en comparación con condiciones anóxicas determinadas por el método de las reivindicaciones 1 a 8, como un marcador o biomarcador para la predicción del pronóstico del tumor incluyendo la probabilidad de la formación de metástasis, la aparición de recaídas y/o la recurrencia local.

40

10. El uso de acuerdo con la reivindicación 9 en el que se seleccionan una o más enzimas de entre el grupo de enzima málica (ME), lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato cinasa de baja afinidad (PKLA o PK-M2 dimérica), hexocinasa y una acil-CoA deshidrogenasa como enzima anaeróbica y una o más seleccionadas de entre el grupo de piruvato cinasa de alta afinidad (PKHA; PK-M2 tetramérica) y citocromo C oxidasa (COX) como enzima aeróbica.

45

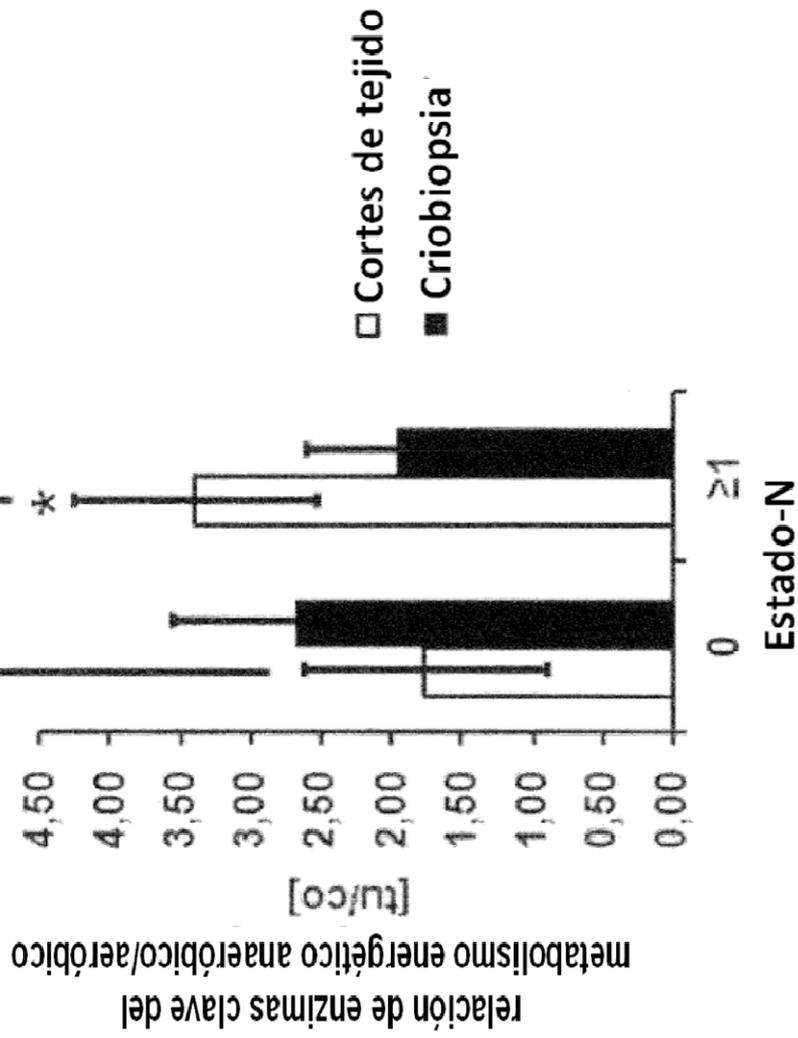


Figura 1

Figura 2

