

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 580**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2014 PCT/EP2014/067675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15024942**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2014 E 14755642 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2959021**

54 Título: **Métodos y kits para la subtipificación molecular de tumores**

30 Prioridad:

**19.08.2013 WO PCT/EP2013/002487**

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

**10.10.2018**

73 Titular/es:

**BIONTECH DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)**

**An der Goldgrube 12**

**55131 Mainz, DE y**

**STRATIFYER MOLECULAR PATHOLOGY GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WIRTZ, RALPH y**

**KNEIP, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**Observaciones :**

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

ES 2 685 580 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

Métodos y kits para la subtipificación molecular de tumores

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para estratificar a un paciente con cáncer de mama para la quimioterapia adyuvante.

Antecedentes de la invención

10 El pronóstico de tumores y la predicción de la respuesta a la terapia están estrechamente relacionados con el subtipo molecular del tumor. La metodología actual estándar aplicada a nivel mundial para la detección del estado del receptor de cánceres, por ejemplo, cánceres de mama, es la inmunohistoquímica (IHC) a partir de biopsia o tejido de resección fijados en formalina e incrustados en parafina (FFPE). Actualmente, la administración de tratamiento sistémico endocrino o dirigido (es decir, trastuzumab) se basa principalmente en IHC.

15 La preparación de muestra en FFPE y la posterior tinción inmunohistoquímica con anticuerpos específicos es una tecnología que actualmente solo se realiza en laboratorios de patología. A partir del examen microscópico de los tejidos tumorales por FFPE además de la interpretación de los resultados de la tinción, los patólogos derivan información clínica adicional esencial sobre la biología del tumor y la diseminación tumoral. Además, la interpretación del patólogo del examen de tejido FFPE se puede considerar una columna esencial en la toma de decisiones clínicas. En muchos países, los patólogos son una parte integral de la llamada conferencia de caso en las decisiones de gestión del cáncer de mama. Aunque la IHC podría realizarse fácilmente en entornos centralizados, la opinión personal y la experiencia del patólogo examinador son muy valoradas en la decisión individual del caso.

20 Sin embargo, varios estudios han demostrado una gran variabilidad interobservador y variabilidad técnica en hasta 40% de los resultados de inmunohistoquímica. Además, la inmunohistoquímica solo permite una declaración cualitativa o, en algunos casos, semicuantitativa con respecto al estado del receptor respectivo.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de un sistema de prueba fiable, objetivo, cuantitativo y reproducible para la subtipificación molecular de tumores, por ejemplo, tumores de mama, lo que facilita la selección de regímenes de tratamiento de tumores adecuados (estratificación del paciente), y permite el pronóstico y la predicción del éxito de la terapia y la evaluación del riesgo del paciente para la metástasis distante. Además, dicho sistema de prueba debería permitir pruebas descentralizadas que sean adecuadas para una proporción significativa de pacientes con cáncer.

30 Milde-Langosch et al. (Breast Cancer Res Treat, 2013, 137: 57-67) evalúa la validez de marcadores de proliferación específicos en subgrupos moleculares de cáncer de mama. Skarlos et al. (Cancer Chemother Pharmacol, 2012, 69: 533-546) se refiere a la subtipificación de tumores de cáncer de mama. Pliarchopoulou et al. (Cancer Chemother Pharmacol, 2013, 71: 245-255) evalúa la importancia pronóstica de la expresión de ARNm de RACGAP1 en cánceres de mama tempranos de alto riesgo. Wang et al. (Breast Cancer Res Treat, 2011, 130: 489-498) divulga un estudio retrospectivo de subtipos de cáncer de mama. El documento WO 2009/158143 A1 describe métodos para clasificar y para evaluar el pronóstico y el tratamiento del cáncer de mama. Cheang et al. (J Natl Cancer Inst, 2009, 101: 736-750) se refiere al índice Ki67, el estado HER2 y el pronóstico de pacientes con cáncer de mama luminal B.

Resumen de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

También se describe aquí un método *in vitro* para identificar un subtipo molecular de un tumor de mama en un paciente con cáncer de mama, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

- 40 (a) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en una muestra del tumor;
- (b) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor de estrógeno (ESR1) en una muestra del tumor;
- (c) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor de progesterona (PGR) en una muestra del tumor;
- y
- 45 (d) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del antígeno de proliferación Ki-67 (Ki67) en una muestra del tumor; y, opcionalmente,
- (e) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN de la proteína activadora de RacGTPasa 1 (RACGAP1) en una muestra del tumor,

en donde la muestra es ARN extraído del tumor, y

en donde el nivel de expresión del transcrito de ARN se determina mediante PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT).

5 En una realización, determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1 comprende determinar si el nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1 es menor o mayor que un umbral de expresión definido de transcripción de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1.

En una realización, la etapa (a) se realiza antes de las etapas (b), (c) y (d) y, opcionalmente, (e).

En una realización, la etapa (d) y, opcionalmente, la etapa (e) se realizan después de las etapas (a), (b) y (c).

10 En una realización, la etapa (a) se realiza antes de la etapa (b), la etapa (b) se realiza antes de la etapa (c), y la etapa (c) se realiza antes de la etapa (d) y, opcionalmente, la etapa (e)

En una realización, el subtipo molecular se selecciona del grupo que comprende HER2-positivo, triple-negativo, luminal A y luminal B.

15 En una realización, un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2 identifica el subtipo molecular del tumor como HER2-positivo.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

20 

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es más bajo o más alto que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

25 identifican el subtipo molecular del tumor como triple negativo.

En una realización, el subtipo molecular es luminal A o luminal B.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

30 

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

35 

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

40 

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

## ES 2 685 580 T3

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como A. luminal

En una realización,

- 5
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 10
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es más bajo o más alto que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

En una realización,

- 15
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 20
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

En una realización,

- 25
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 30
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como. Luminal A.

En una realización,

- 35
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 40
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

- 5 En una realización, el subtipo molecular luminal A se asocia con una probabilidad de supervivencia libre de recurrencia de distancia 5 años después del tratamiento que es al menos 11%, preferiblemente al menos 13% mayor que la probabilidad de supervivencia libre de recurrencia de distancia 5 años después tratamiento asociado con subtipo molecular luminal B y/o con probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento que es al menos 7%, preferiblemente al menos 9% mayor que la probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento asociado con subtipo molecular luminal B.
- En una realización, el método comprende la etapa (d), y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1 y
- 10 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- indica un mayor riesgo de resultados clínicos pobres para el paciente con cáncer, en particular un mayor riesgo de metástasis distante.
- 15 En una realización, el método comprende la etapa (e), y un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP1 indica un riesgo incrementado de resultado clínico pobre para el paciente con cáncer.
- En una realización, el método comprende las etapas (d) y (e), y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67 y
- 20 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP1
- indica un mayor riesgo de resultados clínicos pobres para el paciente con cáncer.
- En una realización, el método comprende las etapas (d) y (e), y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67 y
- 25 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP1
- indica un mayor riesgo de malos resultados clínicos para el paciente con cáncer.
- 30 En una realización, el resultado clínico pobre comprende una reducción relativa en o más de supervivencia, supervivencia libre de recurrencia y supervivencia libre de recurrencia de distancia.
- En una realización, el tumor es un tumor sólido.
- En una realización, la PCR cuantitativa es PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia.
- 35 En una realización, el método comprende el uso de cebadores específicos de ESR1 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o cebadores específicos de HER2 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o cebadores específicos de Ki67 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o cebadores específicos de PGR que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11, y/o cebadores específicos de RACGAP1 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 13 y 14.
- 40 En una realización, el método comprende el uso de una sonda específica de ESR1 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o una sonda específica de HER2 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 6, y/o una sonda específica de Ki67 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o una sonda específica de PGR que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 12, y/o una sonda específica de RACGAP1 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 15.
- 45

En una realización, el nivel de expresión se normaliza frente al nivel de expresión (media) de uno o más genes de referencia en la muestra del tumor.

En una realización, el uno o más genes de referencia se seleccionan del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH.

5 La invención se refiere a un método para estratificar a un paciente con cáncer de mama para quimioterapia adyuvante, comprendiendo dicho método, como primera etapa, identificar un subtipo molecular de un tumor de mama en el paciente con cáncer de mama usando el método *in vitro* como se define anteriormente y, como una segunda etapa, decidir a favor o en contra de la quimioterapia adyuvante con base en el subtipo molecular identificado por el método *in vitro*.

10 En una realización, el subtipo molecular se selecciona del grupo que comprende HER2-positivo, triple-negativo, luminal A y luminal B.

En una realización,

- el subtipo molecular es HER2-positivo, y el régimen de tratamiento tumoral comprende la administración de anticuerpos anti-HER2 y agentes quimioterapéuticos;
- 15 • el subtipo molecular es triple negativo, y el régimen de tratamiento del tumor comprende la administración de agentes quimioterapéuticos;
- el subtipo molecular es luminal A, y el régimen de tratamiento tumoral comprende terapia endocrina; o
- el subtipo molecular es luminal B, y el régimen de tratamiento tumoral comprende terapia endocrina y, opcionalmente, administración de agentes quimioterapéuticos.

20 En una realización, el subtipo molecular es el luminal B, y el régimen de tratamiento del tumor comprende la administración de agentes quimioterapéuticos.

En una realización, el subtipo molecular es el luminal B, y el régimen de tratamiento del tumor comprende la administración de un taxano, preferiblemente docetaxel.

En una realización, el taxano se administra en combinación con fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida (FEC).

En una realización, el tumor es un tumor sólido.

25 También se describe aquí un método de tratamiento del cáncer, comprendiendo dicho método, como primera etapa, estratificar a un paciente con cáncer para el tratamiento tumoral usando el método *in vitro* como se definió anteriormente, y, como segunda etapa, proporcionar régimen de tratamiento del tumor seleccionado para el paciente con cáncer.

30 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un kit para estratificar a un paciente con cáncer de mama para la quimioterapia adyuvante de acuerdo con el método como se definió anteriormente, comprendiendo dicho kit:

- al menos un par de cebadores específicos de HER2 y al menos una sonda específica de HER2;
- al menos un par de cebadores específicos de ESR1 y al menos una sonda específica de ESR1;
- al menos un par de cebadores específicos de PGR y al menos una sonda específica de PGR; y
- al menos un par de cebadores específicos de Ki67 y al menos una sonda específica de Ki67; y, opcionalmente,
- 35 • al menos un par de cebadores específicos de RACGAP1 y al menos una sonda específica de RACGAP1.

En una realización, la PCR cuantitativa es PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia.

En una realización, la detección de la sonda se basa en el desplazamiento de la sonda mediado por amplificación.

En una realización, la sonda es una sonda de doble etiqueta que comprende una unidad estructural informadora de fluorescencia y una unidad estructural atenuadora de fluorescencia.

40 En una realización, el kit comprende además una transcriptasa reversa y una ADN polimerasa.

En una realización, la transcriptasa reversa y la polimerasa se proporcionan en forma de una mezcla de enzimas que permite una PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) de una etapa.

En una realización, el kit comprende además al menos un par de cebadores específicos de genes de referencia y al menos una sonda específica de genes de referencia.

En una realización, el gen de referencia es uno o más seleccionados del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH.

En una realización, el kit comprende además al menos una muestra de ARN de control.

En una realización, los cebadores proporcionan un tamaño de amplicón de menos de 120 pb.

5 En una realización, los cebadores específicos de ESR1 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o los cebadores específicos de HER2 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o los cebadores específicos de Ki67 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o los cebadores específicos de PGR tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11, y/o cebadores específicos de RACGAP1 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 13 y 14.

15 En una realización, la sonda específica de ESR1 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o la sonda específica de HER2 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos. y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 6, y/o la sonda específica de Ki67 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o la sonda específica de PGR tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 12, y/o la sonda específica de RACGAP1 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 15.

20 En una realización, el tumor es un tumor sólido.

También se divulga aquí el uso de un kit como se definió anteriormente para evaluar el riesgo de un paciente con cáncer de metástasis distante.

Breve descripción de las figuras

25 La Figura 1 representa usos potenciales para los métodos descritos en este documento como respaldo para métodos convencionales de clasificación de subtipos (por ejemplo, IHC) y como un complemento de métodos convencionales de estratificación de pacientes.

30 La Figura 2 representa una prueba de partición para evaluar el valor pronóstico y predictivo del nivel de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR, Ki67 y RACGAP1 para la tasa de supervivencia de 5 años de pacientes con cáncer de mama. Los datos disponibles de 855 tumores se estratificaron primero por el nivel de expresión de ARNm de HER2 para identificar tumores HER2-positivos (valor de corte  $\geq 38$ ). Los tumores HER2-negativos se estratificaron adicionalmente por el nivel de expresión del ARNm de ESR1. A: Los tumores ESR1-positivos (valor de corte  $\geq 34$ ) se estratificaron adicionalmente mediante el nivel de expresión del ARNm de Ki67 (valor de corte 31.7) seguido del nivel de expresión del ARNm de PGR (valor de corte 30.2). B: Alternativamente, los tumores ESR1-positivos (valor de corte  $\geq 34$ ) se estratificaron adicionalmente mediante el nivel de expresión del ARNm de PGR (valor de corte 30.2) seguido del nivel de expresión de ARNm de Ki67 (valor de corte 31.7). Los análisis de Kaplan-Meier de estos datos se muestran en las Figuras 3 y 4. C: Los tumores Ki67-positivos y Ki67-negativos se estratificaron por el nivel de expresión de ARNm de RACGAP1 (valor de corte 34.2). Para mejorar el número de pacientes para un análisis posterior de RACGAP1, no se dan datos para PGR en la imagen. La consideración adicional de la PGR no altera el resultado general con respecto a RACGAP1. Los datos (véase la Tabla 3) muestran que los niveles de expresión del ARNm de RACGAP1 por debajo o por encima del umbral definido están asociados con diferencias particularmente significativas en la tasa de supervivencia a 5 años.

40 La Figura 3 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia de pacientes con cáncer de mama con tumores HER2-positivo (HER2), luminal A (LumA), luminal B (LumB) o triple negativo (TNT), en los que se identificó el subtipo molecular del tumor de acuerdo con la presente descripción, con base en los niveles de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y Ki67. El subtipo luminal A, como se define en el presente documento, se asocia con una tasa de supervivencia global del 97% después de 5 años (frente al 87% para tumores luminal B y HER2 positivos y 84% para tumores triple negativos).

50 La Figura 4 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia libre de metástasis distante ("DMFS", recurrente distante X años después de la cirugía) de pacientes con cáncer de mama con HER2-positivo (HER2), luminal A (LumA), luminal B (LumB) o tumores triple-negativos (TNT), en los que el subtipo molecular del tumor se identificó de acuerdo con la presente descripción, con base en los niveles de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y Ki67. El subtipo luminal A, como se define por los presentes inventores, se asocia con una tasa de DMFS del 92% después de 5 años (frente al 78% para los tumores luminal B, HER2 positivo y triple negativo).

- 5 La Figura 5 representa un análisis de regresión de Cox multivariante de DMFS que compara la subtipificación molecular mediante inmunohistoquímica (Sotiriou et al (2009), N Engl J Med, 360(8): 790-800) con subtipificación molecular usando el método de acuerdo con la presente descripción, basado en los niveles de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y Ki67. El análisis muestra claramente la superioridad del método de la presente descripción, ya que la subtipificación inmunohistoquímica pierde su importancia cuando los resultados obtenidos por el método de la presente descripción se incluyen en el modelo de riesgos proporcionales de Cox.
- Las Figuras 6 a 9 muestran los valores  $40-\Delta\Delta CT$  de los marcadores HER2, ESR1, PGR y Ki67 determinados por RT-qPCR para muestras de pacientes 1 a 6 y lotes 1 a 3.
- 10 La Figura 10 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia global de pacientes con tumores luminal B. A: Cuando se define por RT-qPCR, los pacientes con cáncer luminal B tratados con docetaxel-FEC sobreviven significativamente más tiempo que cuando se trataron con vinorelbina-FEC (97% vs. 89% respectivamente, Hazard Ratio [HR] 0.241; IC: 0.090-0.642 ) B: cuando el subtipo de tumor está definido por IHC, no puede mostrarse el beneficio del docetaxel para los pacientes con luminal B (95% frente a 92%, HR 0.617; IC 0.235-1.623).
- 15 La Figura 11 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia global de pacientes con tumores luminal B, ajustados por tipo histológico tumoral mediante regresión de Cox como se especifica en el SAP. A: La predicción del beneficio de docetaxel mediante el kit RT-qPCR sigue siendo significativa (97% frente a 88%, HR 0.232; IC 0.087-0.624). B: La subtipificación por IHC no es predictiva de un beneficio de docetaxel (96% frente a 92%, HR 0.510, IC 0.184-1.414).
- 20 La Figura 12 representa un análisis de Kaplan Meier de supervivencia libre de metástasis distante (DMFS) de pacientes con tumor luminal B. A: Cuando se define por RT-qPCR, los pacientes con luminal B tienen una mayor probabilidad de permanecer libres de metástasis distante cuando se los trata con docetaxel-FEC en comparación con vinorelbina-FEC (89% vs. 78% respectivamente, HR 0.471; IC 0.263-0.843 ) B: Cuando los tumores luminal B se definen por IHC, las diferencias de supervivencia no se observan entre los diferentes regímenes de tratamiento (87% vs 86%, HR 0.938 IC 0.474-1.856).
- 25 La Figura 13 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia libre de metástasis distante de pacientes con tumores luminal B, ajustada para el número de ganglios linfáticos metastásicos, tamaño del tumor y tipo histológico por Regresión de Cox como se especifica en el SAP. A: Al utilizar el ensayo de subtipificación de la presente descripción, el efecto sigue siendo significativo (90 frente a 78%, HR 0.409; IC 0.219-0.764). B: Por el contrario, no hay ningún efecto cuando la subtipificación tumoral se produce por IHC (89% frente a 85%, HR 0.674; IC 0.307-1.481).
- 30 La Figura 14 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia global de pacientes con tumores HER2-positivos. A: Cuando se define por RT-qPCR, los pacientes HER2-positivos no tienen mejores tasas de supervivencia global cuando se los trata con docetaxel en comparación con vinorelbina (87 frente a 91%, HR 1.320; IC 0.556-3.132). B: Se muestran resultados similares para tumores subtipificados por IHC (86% frente a 89%, HR 1.175, IC 0.518-2.663).
- 35 La Figura 15 representa un análisis de Kaplan Meier de supervivencia libre de metástasis distante de tumores HER2-positivos. A: Cuando se define por el método de la presente descripción, los pacientes HER2-positivos no difieren en la supervivencia libre de metástasis distante cuando se tratan con docetaxel en comparación con vinorelbina (80 frente a 81%, HR 1.070; IC 0.551-2.076). B: De forma similar, cuando se define por IHC, los pacientes HER2 positivos tratados de forma diferente no muestran diferencias en la supervivencia (78% frente a 77%, HR 0.975; IC 0.516-1.843).
- 40 La Figura 16 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia global de los tumores luminal A. A: Cuando se define por RT-qPCR, los pacientes con luminal A tienden a tener tasas de supervivencia general inferiores cuando se los trata con docetaxel en comparación con vinorelbina (95% vs. 98%, HR 2.471; IC 0.477-12.809). B: Por el contrario, cuando se define por IHC, los pacientes con luminal A muestran una tendencia débil pero no significativa hacia una supervivencia general más prolongada (97 frente a 93% HR 0.443; IC 0.114-1.716) cuando se tratan con docetaxel en comparación con vinorelbina.
- 45 La Figura 17 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia libre de metástasis distante de pacientes con tumor luminal A. A: Cuando se define por RT-qPCR, los pacientes con luminal A no difieren en la supervivencia libre de metástasis distante con el tratamiento con docetaxel o vinorelbina (92% vs. 90%, HR 0.826; IC 0.336-2.033) B: pacientes subtitulados con IHC tratados con docetaxel en comparación con vinorelbina muestran una tendencia débil, pero no significativa hacia la supervivencia libre de metástasis distante más larga (93% frente a 88%, HR 0.553; IC 0.222-1.386).
- 50 La Figura 18 representa un análisis de Kaplan Meier de la supervivencia global de pacientes con tumores TNBC. A: Cuando se define por RT-qPCR, los pacientes portadores de CMTN no muestran diferencias en la supervivencia global tras el tratamiento con docetaxel o vinorelbina (84% frente a 83%, HR 0.949; IC 0.383-2.665). B: Cuando se define por IHC, los pacientes con TNBC muestran una tendencia débil pero no significativa hacia una supervivencia general más larga (88% frente a 80%, HR 0.552; IC 0.207-1.472).



La Figura 19 representa un análisis de Kaplan Meier de supervivencia libre de metástasis distante de pacientes con tumor TNBC. A: Los pacientes tratados de forma diferente definidos por TNBC RT-qPCR no difieren significativamente en la supervivencia libre de metástasis distante (74% vs. 78%, HR 1.211; IC 0.523-2.802). B: los pacientes con TNBC definidos por IHC muestran una tendencia débil pero no significativa hacia la supervivencia libre de metástasis a mayor distancia (82% vs. 72%, HR 0.615; IC 0.284-1.333) cuando se los trata con docetaxel en comparación con vinorelbina.

La Figura 20 A muestra un diagrama de dispersión de las estimaciones continuas de Ki67 por IHC (como se representa por % de células positivas en el eje y) y RT-qPCR (como se representa por  $40-\Delta\Delta CT$  en el eje x). Las líneas ilustran los valores de corte predefinidos del plan de análisis estadístico (horizontal: IHC 20%; vertical: RT-qPCR 34.8  $40-\Delta\Delta CT$ ). B resume las concordancias y discordancias entre RT-qPCR y la categorización con base en IHC (positiva [pos] vs. negativa [neg]). C muestra las estadísticas de Kappa que revelan una correlación altamente significativa ( $p < 0.0001$ ), pero una concordancia moderada entre los métodos. D muestra el porcentaje de acuerdo positivo y negativo (PPA y NPA, respectivamente) cuando se prueba Ki67 mediante RT-qPCR frente a IHC.

La Figura 21 representa un análisis de Kaplan Meier de supervivencia libre de metástasis distante de pacientes con tumores positivos para receptores de estrógenos y resultados discordantes Ki67 entre RT-qPCR e IHC.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, en particular cuando se consideran junto con las figuras adjuntas.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen los mismos significados que los expertos en la técnica entienden comúnmente.

Preferiblemente, los términos usados en este documento se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, and H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basilea, Suiza, (1995).

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura en el campo (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Edición, J. Sambrook et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta especificación y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", implican la inclusión de un miembro, entero o una etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas, aunque en algunas realizaciones dicho otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pueden ser excluido, es decir, el objeto consiste en la inclusión de un miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas establecidos. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referencia similar utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben interpretarse para abarcar tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o sea claramente contradicho por el contexto. La citación de los rangos de valores en el presente documento está simplemente destinada a servir como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del rango. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la especificación como si se citara aquí individualmente. Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o un ejemplo de lenguaje (por ejemplo, "tal como"), proporcionado en el presente documento tiene la intención meramente de ilustrar mejor la invención y no representa una limitación en el alcance de la invención reivindicada de otro modo. Ningún lenguaje en la especificación debe interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

Se citan varios documentos a lo largo del texto de esta especificación, pero nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a anteceder a dicha divulgación en virtud de invención anterior.

Aquí se divulga un método *in vitro* para identificar un subtipo molecular de un tumor en un paciente con cáncer, comprendiendo dicho método las etapas siguientes:

(a) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en una muestra del tumor;

(b) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor de estrógeno (ESR1) en una muestra del tumor;

(c) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor de progesterona (PGR) en una muestra del tumor; y

(d) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del antígeno de proliferación Ki-67 (Ki67) en una muestra del tumor; y, opcionalmente,

5 (e) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN de la proteína activadora de RacGTPasa 1 (RACGAP1) en una muestra del tumor.

En una realización, dicho método no comprende la determinación del nivel de expresión, en particular el nivel de expresión del transcrito de ARN, de uno o más genes adicionales no de referencia. En otras palabras, no se determina ningún nivel de expresión, en particular, ningún nivel de expresión del transcrito de ARN, de un gen distinto de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1 y uno o más genes de referencia.

En una realización, dicho método no comprende ninguna otra etapa de diagnóstico, tal como clasificación histológica o determinación del estado ganglionar linfático.

El término "tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo el crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. En una realización de la presente invención, el tumor es un tumor sólido. De acuerdo con la presente invención, el tumor es un tumor de mama.

Como se usa en el presente documento, "cáncer" incluye una enfermedad caracterizada por un crecimiento, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración celulares regulados de manera aberrante. El término "cáncer" de acuerdo con la invención se refiere al cáncer de mama. Ejemplos de los mismos son carcinomas de mama.

El término "cáncer de mama" se refiere a un tipo de cáncer que se origina en el tejido mamario, más comúnmente del revestimiento interno de los conductos de la leche o los lóbulos que proveen los conductos con leche. Los cánceres que se originan en los conductos se conocen como carcinomas ductales, mientras que los que se originan en los lobulillos se conocen como carcinomas lobulares. Ocasionalmente, el cáncer de mama se presenta como enfermedad metastásica. Los sitios comunes de metástasis incluyen huesos, hígado, pulmón y cerebro. El cáncer de mama ocurre en humanos y otros mamíferos. Si bien la abrumadora mayoría de los casos en humanos ocurre en mujeres, también puede presentarse cáncer de mama masculino. El tratamiento del cáncer de mama puede incluir cirugía, medicamentos (terapia hormonal y quimioterapia), radiación y/o inmunoterapia/terapia dirigida.

El término "paciente", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier organismo tal como vertebrado, particularmente cualquier mamífero, que incluye un ser humano y otro mamífero, por ejemplo, un animal tal como un roedor, un conejo o un mono. El roedor puede ser un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una chinchilla. Preferiblemente, el paciente es un humano.

De acuerdo con la presente invención, el término "transcrito de ARN" incluye y preferiblemente se refiere a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcrito" que codifica un péptido o proteína. El ARNm típicamente comprende una región 5' no traducida (5'-UTR), una región codificante de proteína o péptido y una región 3' no traducida (3'-UTR). El ARNm tiene un tiempo medio limitado en las células e *in vitro*.

El gen HER2 (también denominado ERBB2; ubicación: 17q12, anotación: cromosoma: 17; NC\_000017.10) codifica un miembro de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de receptor de tirosina quinasa. La amplificación y/o sobreexpresión de este gen se ha informado en numerosos cánceres, incluidos los tumores de mama y de ovario. En la base de datos NCBI, se enumeran dos variantes de ARNm para HER2 que codifican para dos versiones de proteínas. Las secuencias de proteínas y ARNm pueden encontrarse bajo los números de acceso NM\_001005862.1 (receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2 isoforma b) y NM\_004448.2 (precursor de receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2 isoforma a). La amplificación del gen HER2 ocurre en aproximadamente 10-20% de los carcinomas de mama primarios.

El gen ESR1 (ubicación: 6q25, anotación: cromosoma 6, NC\_000006.11) codifica un receptor de estrógeno (ER), un factor de transcripción activado por ligando compuesto de varios dominios importantes para la unión de hormonas, unión al ADN y activación de la transcripción. Se sabe que los receptores de estrógenos están involucrados en procesos patológicos que incluyen cáncer de mama, cáncer de endometrio y osteoporosis. Se conocen cuatro variantes de ARNm de ESR1, en las que las variantes del transcrito difieren en la UTR 5' y/o usan diferentes promotores, pero cada variante codifica para la misma proteína. El 70-80% de todos los cánceres de mama son ER positivos.

El gen PGR (también denominado RP, ubicación: 11q22-q23, anotación: cromosoma: 11; NC\_000011.9) codifica el receptor de progesterona. Las hormonas esteroideas, como la progesterona y sus receptores, están implicadas en la regulación de la expresión del gen eucariótico y afectan la proliferación celular y la diferenciación en los tejidos diana. Este gen utiliza dos promotores y sitios de inicio de la traducción distintos en el primer exón para producir dos isoformas

de ARNm, A y B. Las dos isoformas son idénticas, excepto por los 165 aminoácidos adicionales que se encuentran en el extremo N de la isoforma B. El 40% de los tumores de mama son positivos para PGR.

5 El gen Ki-67 (Ki67; ubicación: 10q26.2, anotación: cromosoma: 10; NC\_000010.10) codifica una proteína nuclear que se asocia con y puede ser necesaria para la proliferación celular. Se han descrito dos variantes de ARNm. Existe un pseudogén relacionado en el cromosoma 10. Aproximadamente el 25% de los tumores de mama son positivos para Ki67.

El gen RACGAP1 (ubicación: 12q13.12, anotación: cromosoma: 12; NC\_000012.11) codifica para la proteína 1 activadora de RacGTPasa. Se han descrito tres variantes de corte y empalme, y todas codifican para la misma proteína. RACGAP1 es un componente del complejo espidlina central y desempeña un papel clave en el control de los procesos relacionados con el crecimiento y la diferenciación.

10 El término "nivel de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a la expresión de un gen particular (es decir, HER2, ESR1, PGR, Ki67 o RACGAP1) para producir transcrito y/o proteína. Según la presente invención, el nivel de expresión se determina en el nivel de transcrito de ARN, en particular nivel de ARNm (nivel transcripcional), por ejemplo, midiendo el ARNm transcrito (por ejemplo, mediante inmunotransferencia Northern) por PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) o por tinción directamente del ARNm (por ejemplo, mediante hibridación *in situ*).

15 De acuerdo con la presente invención, el término "muestra del tumor" se refiere al ARN (total) extraído de la muestra de tejido tumoral. En una realización particularmente preferida, la muestra del tumor es ARN (total) extraído de una muestra de tejido tumoral FFPE. Los expertos en la materia pueden realizar procedimientos de extracción de ARN. Por ejemplo, el ARN total de una viruta de 5 a 10 µm de tejido tumoral FFPE se puede extraer usando el High Pure RNA Paraffin Kit (Roche, Basilea, Suiza) o, preferiblemente, el XTRAKT RNA Extraction Kit XL (Stratifyer Molecular Pathology, Colonia, Alemania). También es posible almacenar el material de muestra por usar/probar en un congelador y llevar a cabo el método de la presente invención en un momento apropiado después de descongelar el material de muestra respectivo. La muestra puede obtenerse del paciente con cáncer antes del inicio de un tratamiento terapéutico, durante el tratamiento terapéutico, y/o después del tratamiento terapéutico, es decir, antes, durante o después de la administración de la terapia contra el cáncer.

25 El término "subtipo molecular de un tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a subtipos de un tumor que se caracterizan por perfiles moleculares distintos, por ejemplo, perfiles de expresión génica. En una realización, el subtipo molecular se selecciona del grupo que comprende HER2-positivo, triple-negativo (también denominado "basal"), luminal A y luminal B. El término "de tipo basal" se refiere al hecho de que tales tumores tienen cierta similitud en la expresión génica a la de las células epiteliales basales. El término "luminal" se deriva de la similitud en la expresión génica entre los tumores y el epitelio luminal.

30 Los subtipos moleculares difieren notablemente en el resultado clínico y la respuesta a la terapia. En una realización, el subtipo molecular luminal A, como se define aquí, se asocia con una probabilidad de supervivencia libre de recurrencia de distancia 5 años después del tratamiento que es al menos 11%, preferiblemente al menos 13% mayor que la probabilidad de supervivencia libre de recurrencia de distancia 5 años después del tratamiento asociado con el subtipo molecular luminal B y/o con probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento que es al menos 7%, preferiblemente al menos 9% mayor que la probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento asociado con el subtipo molecular luminal B.

35 El término "tratamiento (terapéutico)", en particular en relación con el tratamiento del cáncer tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier tratamiento que mejore el estado de salud y/o prolongue (aumente) la vida de un paciente. Dicho tratamiento puede eliminar el cáncer, reducir el tamaño o el número de tumores en un paciente, detener o retrasar el desarrollo de cáncer en un paciente, inhibir o retrasar el desarrollo de un nuevo cáncer en un paciente, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un paciente, y/o disminuir las recurrencias en un paciente que actualmente tiene o que ha tenido cáncer anteriormente. En una realización, los términos "tratamiento" y "tratamiento terapéutico" se refieren a uno o más de la extirpación quirúrgica del tumor primario, quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia e inmunoterapia/terapia dirigida.

45 La terapia adyuvante es un tratamiento que se administra además del tratamiento primario, principal o inicial. Las cirugías y los regímenes de tratamiento complejos utilizados en la terapia contra el cáncer han llevado a que el término se use principalmente para describir los tratamientos adyuvantes contra el cáncer. Un ejemplo de terapia adyuvante es el tratamiento adicional (por ejemplo, quimioterapia) generalmente administrado después de la cirugía (postquirúrgicamente), donde se ha eliminado toda la enfermedad detectable, pero donde permanece un riesgo estadístico de recaída debido a una enfermedad oculta. La terapia neoadyuvante es el tratamiento administrado antes del tratamiento primario, principal o inicial (por ejemplo, quimioterapia prequirúrgica).

55 De acuerdo con la presente invención, la etapa de "determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN" puede comprender (i) medir el nivel de expresión del transcrito de ARN y (ii) analizar el nivel de expresión del transcrito de ARN medido (por ejemplo, en comparación con un nivel de expresión de referencia, como un umbral de expresión definido), en

donde el orden de medición del nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1 es independiente del orden de análisis del nivel de expresión medido de la transcripción de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1.

5 En una realización, determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1 comprende determinar si el nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1 es inferior o superior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1. En los casos en que el nivel de expresión es igual al umbral de expresión definido, se considera que el nivel de expresión pertenece al grupo de niveles de expresión que son más altos que el umbral de expresión definido. Por lo tanto, la expresión "mayor que un umbral de expresión definido", tal como se usa en el presente documento, incluye niveles de expresión que son superiores o iguales al umbral de expresión definido. Los niveles de expresión que son "superiores a un umbral de expresión definido" también pueden denominarse "expresión positiva", mientras que los niveles de expresión que son "inferiores a un umbral de expresión definido" también pueden denominarse "expresión negativa".

15 El término "umbral de expresión definido de la transcripción de ARN", como se usa en el presente documento, puede referirse al valor de corte medio (abreviando: corte) calculado a partir de un número de muestras, obteniéndose dicho número de muestras de un número de sujetos, en particular, sujetos que tienen cáncer. Para obtener el umbral, el número de sujetos puede incluir sujetos que tienen tumores de diferentes subtipos moleculares, por ejemplo, sujetos que tienen tumores HER2 positivos y/o sujetos que tienen tumores triple negativos y/o sujetos que tienen tumores luminal A y/o sujetos que tienen tumores luminal B. El umbral puede representar una cantidad o concentración del transcrito de ARN. 20 En una realización, el umbral se da como valor de CT (umbral del ciclo) (véase a continuación). En una realización, el nivel de expresión (relativo) y el umbral de expresión se expresan como valores  $40-\Delta CT$  o  $40-\Delta\Delta CT$  (véase a continuación).

25 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier organismo tal como vertebrado, particularmente cualquier mamífero, que incluye tanto un ser humano como otro mamífero, por ejemplo, un animal como un roedor, un conejo o un mono. El roedor puede ser un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una chinchilla. Preferiblemente, el sujeto es un humano. En una realización, un sujeto es un sujeto con o de quien se sospecha que tiene una enfermedad, en particular cáncer, también designado como "paciente" en este documento. Para la determinación del valor medio de corte, al menos dos sujetos, preferiblemente al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 900, al menos 1000, al menos 1500, o al menos 2000 sujetos, son probados.

35 Dado que ya se han realizado varios estudios clínicos con los marcadores de genes usados de acuerdo con la presente invención, un estudio de concordancia en un entorno de prueba de entrenamiento será suficiente para la definición y validación de un corte/umbral clínico para la dicotomización de resultados cuantitativos en "expresión positiva" o "expresión negativa". Por lo tanto, en una realización, el punto de corte/umbral se define con base en uno o más estudios clínicos previos. Además, se pueden realizar estudios clínicos adicionales para el establecimiento y la validación del corte/umbral /umbral. El corte/umbral puede determinarse/definirse mediante técnicas conocidas en la técnica.

40 En una realización, el corte/umbral se determina/define sobre la base de parámetros clínico-patológicos, tales como IHC-ISH, y/o los datos de supervivencia global (SG), supervivencia libre de enfermedad (DFS), y supervivencia libre de metástasis distante (DMFS), y supervivencia específica de enfermedad (DSS) en cohortes de entrenamiento (por ejemplo, HE10-97, Pentheroudakis et al (2009), Breast Cancer Res Treat, 116: 131-143), por pruebas de división en porciones (por ejemplo, SAS Software JMP® 9.0.0) y validadas en cohortes de ensayos clínicos independientes, por ejemplo, muestras de tejido FFPE del estudio FinHER (Joensuu et al. (2006), N Engl J Med, 354: 809-820).

45 En una realización, el valor de  $40-\Delta CT$  se calcula de la siguiente manera:  $40 - [CT \text{ del biomarcador respectivo (es decir, HER2, ESR1, PGR y Ki67 y/o RACGAP1) de una muestra de paciente} - CT \text{ de un gen de referencia (por ejemplo, CALM2) de una muestra de paciente}]$  (= método de cálculo 1). Si se usa más de un gen de referencia, el valor de  $40-\Delta CT$  se calcula como sigue:  $40 - (CT \text{ del biomarcador respectivo de una muestra de paciente} - CT \text{ media de genes de referencia seleccionados de una muestra de paciente})$  (= método de cálculo 2). Alternativamente, se puede usar un valor de  $40-\Delta\Delta CT$ , en donde  $40-\Delta\Delta CT$  puede calcularse de la siguiente manera:  $\Delta\Delta CT = 40 - [(biomarcador \text{ de CT de una muestra de paciente} - biomarcador \text{ de CT de una muestra de referencia}) - (gen \text{ de referencia de CT de muestra de paciente} - gen \text{ de referencia de CT de una muestra de referencia})]$  (= método de cálculo 3); por ejemplo,  $40-\Delta\Delta CT = 40 - [(CT \text{ Ki67 muestra de paciente} - CT \text{ Ki67 referencia de muestra}) - (CT \text{ CALM2 de una muestra de paciente} - CT \text{ CALM2 de una muestra de referencia})]$ . En una realización, CALM2 se usa como gen de referencia.

55 En una realización de ejemplo, el valor de corte medio se da como un valor de  $40-\Delta CT$  según el método de cálculo 2, en donde el valor de corte medio para HER2 es un valor de  $40-\Delta CT$  de 38, el corte medio el valor de desconexión para ESR1

es un valor de  $40-\Delta CT$  de 34, el valor de corte medio para PGR es un valor de  $40-\Delta CT$  de 30.2, el valor de corte medio para Ki67 es un valor de  $40-\Delta CT$  de 31.7 , y el valor de corte medio para RACGAP1 es un valor  $40-\Delta CT$  de 34.2.

5 En otra realización, el nivel de expresión relativa de los biomarcadores se da como un valor de  $40-\Delta\Delta CT$ , que se calcula de la siguiente manera:  $40 - [(Biomarcador\ de\ CT\ de\ una\ muestra\ de\ paciente - gen\ de\ referencia\ de\ CT\ de\ la\ muestra\ del\ paciente) - (Biomarcador\ de\ CT\ de\ una\ muestra\ de\ control - gen\ de\ referencia\ de\ CT\ de\ la\ muestra\ de\ control)]$  (= método de cálculo 4); por ejemplo,  $40-\Delta\Delta CT = 40 - [(CT\ Ki67,\ muestra\ de\ paciente - CT\ Mean\ CombRef,\ muestra\ de\ paciente) - (CT\ Ki67,\ muestra\ de\ control,\ CT\ Mean\ CombRef,\ muestra\ de\ control)]$ . En una realización, la CT es la mediana de la CT. La CT del gen de referencia puede ser la CT de un único gen de referencia o la CT media de dos o más genes de referencia (denominado Mean CombRef). Preferiblemente, la misma muestra de control (también denominada calibrador) se usa en todos los análisis y conduce a los mismos resultados de RT-qPCR o qPCR. En una realización, la muestra de control es un ARN de línea celular, un ARN artificial transcrito *in vitro* o una mezcla equimolar de oligonucleótidos de ADN, que representa el biomarcador de ARNm o ADNc o el amplicón de biomarcador o una parte del amplicón de biomarcador con una relación constante. En una realización, se usan CALM2 y B2M como genes de referencia y se usa un control positivo (por ejemplo, ARN artificial transcrito *in vitro*) como muestra de control (calibrador).

10 En una realización de ejemplo, el valor de corte medio se da como un valor de  $40-\Delta\Delta CT$  según el método de cálculo 4, en donde el valor de corte medio para HER2 es un valor de  $40-\Delta\Delta CT$  de 40.90, el valor de corte medio para ESR1 es un valor de  $40-\Delta\Delta CT$  de 38.20, el valor de corte medio para PGR es un valor de  $40-\Delta\Delta CT$  de 34.90 y el valor de corte medio para Ki67 es un valor de  $40-\Delta\Delta CT$  de 34.80 en un módulo Versant kPCR Instrument AD (Siemens).

20 En otra realización a modo de ejemplo, el valor de corte medio se da como un valor  $40-\Delta\Delta CT$  según el método de cálculo 4, en donde el valor medio de corte para HER2 es un valor  $40-\Delta\Delta CT$  de 41.1, el límite el valor para ESR1 es un valor  $40-\Delta\Delta CT$  de 38.00, el valor de corte para PGR es un valor  $40-\Delta\Delta CT$  de 35.50 y el valor de corte para Ki67 es un valor  $40-\Delta\Delta CT$  de 35.50 en un instrumento LightCycler® 480 II (Roche).

25 En una realización, las etapas (a), (b), (c) y (d) y, opcionalmente, (e) se realizan en orden aleatorio. En una realización, la etapa (a) se realiza antes de las etapas (b), (c) y (d) y, opcionalmente, (e). En una realización, la etapa (d) y, opcionalmente, la etapa (e) se realizan después de las etapas (a), (b) y (c). En una realización, la etapa (a) se realiza antes de la etapa (b), la etapa (b) se realiza antes de la etapa (c) y la etapa (c) se realiza antes de la etapa (d) y, opcionalmente, la etapa (e).

En una realización, un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2 identifica el subtipo molecular del tumor como HER2-positivo.

30 En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 35 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es más bajo o más alto que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como triple negativo.

40 En una realización, el subtipo molecular es luminal A o luminal B.

En una realización,

45 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

5 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

10 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal A.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

15 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

20 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es más bajo o más alto que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

25 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

30 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;

35 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

40 • un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67

identifican el subtipo molecular del tumor como A. luminal

En una realización,

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 5
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.
- 10
- En una realización, el método comprende la etapa (d), y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1 y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- 15
- indica un mayor riesgo de resultados clínicos pobres para el paciente con cáncer, en particular un mayor riesgo de metástasis distante.
- En una realización, el método comprende la etapa (e), y un nivel de expresión de transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que un umbral de expresión definido de transcripción de ARN de RACGAP1 indica un riesgo incrementado de resultado clínico pobre para el paciente con cáncer ( en comparación con el riesgo de un paciente de cáncer con un tumor que tiene un nivel de expresión de transcripción de ARN de RACGAP1 que es menor que el umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP1).
- 20
- La determinación del nivel de expresión del transcrito de ARN tanto de Ki67 como de RACGAP1 proporciona información más precisa con respecto al resultado clínico de un paciente con cáncer, en donde, generalmente, un nivel de expresión incrementado de transcripción de ARN de Ki67 o RACGAP1 indica un riesgo incrementado de un resultado clínico pobre para el paciente con cáncer (comparado con el riesgo de un paciente con cáncer con un nivel de expresión de transcripción de ARN de Ki67 o RACGAP1 que es menor que el umbral de expresión definido del transcrito de ARN de Ki67 o RACGAP1).
- 25
- En una realización, el método comprende las etapas (d) y (e), y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67 y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP1
- 30
- indica un mayor riesgo de resultados clínicos pobres para el paciente con cáncer.
- En una realización, el método comprende las etapas (d) y (e), y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67 y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP1
- 35
- indica un mayor riesgo de resultados clínicos pobres para el paciente con cáncer (en comparación con el mayor riesgo de un paciente con cáncer con un tumor con un nivel de expresión del transcrito de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definida de transcripción de ARN de Ki67 y un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP1 que es mayor que el umbral de expresión definido del transcrito de ARN de RACGAP1, en donde, preferiblemente, el aumento adicional se refiere a un aumento en al menos 5%, más preferiblemente en al menos 10%).
- 40
- El término "resultado clínico" se define como el resultado clínico de una enfermedad, en particular después de un tratamiento, por ejemplo, reducción o mejora de los síntomas. En una realización, el resultado clínico pobre comprende una reducción relativa en o más de supervivencia, supervivencia libre de recurrencia y supervivencia libre de recurrencia de distancia. El término "recurrencia" con respecto al cáncer incluye la reaparición de células tumorales en el mismo sitio
- 45

y órgano de la enfermedad de origen, metástasis que pueden aparecer incluso muchos años después del diagnóstico inicial y el tratamiento del cáncer, o eventos locales como la infiltración de las células tumorales en los ganglios linfáticos regionales. "Recurrencia de distancia" se refiere a un escenario en donde las células cancerosas se han diseminado (metástasis) a una parte distante (es decir, a otro órgano) del cuerpo más allá de los ganglios linfáticos regionales. La supervivencia libre de recurrencia generalmente se define como el tiempo desde la aleatorización hasta el primero de recurrencia, recaída, segundo cáncer o muerte.

El término "metástasis" se refiere a la propagación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de la metástasis es un proceso muy complejo y depende de la separación de células malignas desde el tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para entrar en la cavidad del cuerpo y los vasos, y luego, después de haber sido transportados por la sangre, infiltración de órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la eliminación del tumor primario porque las células o los componentes del tumor pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico.

En una realización, un "riesgo incrementado de resultado clínico pobre" se refiere a una probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento que es al menos un 20% menor, preferiblemente al menos un 25% menor que la probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento de un paciente de cáncer con un tumor que tiene

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67 y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP 1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP 1.

En una realización, un "mayor riesgo adicional de resultado clínico pobre" se refiere a una probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento que es al menos un 30% menor, preferiblemente al menos un 35% menor que la probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento de un cáncer paciente con un tumor que tiene

- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67 y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de RACGAP 1 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de RACGAP 1.

De acuerdo con la presente invención, el nivel de expresión del transcrito de ARN se determina por PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) (RT-qPCR). Como el ARN no puede amplificarse directamente en la PCR, debe transcribirse de forma inversa en el ADNc utilizando la enzima transcriptasa reversa. Para este fin, se puede utilizar un RT-qPCR de una sola etapa, que combina las reacciones de transcripción reversa con amplificación de ADN mediante PCR en la misma reacción. En RT-qPCR de una sola etapa, el molde de ARN se mezcla en una mezcla de reacción que contiene transcriptasa reversa, ADN polimerasa, cebadores y sondas, dNTP, sales y detergentes. En una primera etapa de PCR, el ARN diana se transcribe de forma inversa mediante transcriptasa reversa usando los cebadores inversos específicos de la diana. Después, el ADNc se amplifica usando los cebadores/sondas y la ADN polimerasa.

En una realización, la PCR cuantitativa es PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia. La PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia comprende el uso de una sonda marcada fluorescentemente. Preferiblemente, la sonda marcada fluorescentemente consiste en un oligonucleótido marcado tanto con un colorante informador fluorescente como con un colorante apagador (= sonda de etiqueta doble). Indicadores fluorescentes adecuados y colorantes/unidades estructurales atenuadores son conocidos por una persona experta en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, los informadores colorantes/unidades estructurales 6-FAM<sup>TM</sup>, JOE<sup>TM</sup>, Cy5<sup>®</sup>, Cy3<sup>®</sup> y los colorantes/unidades estructurales atenuadores dabcyI, TAMRA<sup>TM</sup>, BHQ<sup>TM</sup>-1, -2 o -3. La amplificación del producto específico de la sonda causa la escisión de la sonda (= desplazamiento de la sonda mediada por amplificación), generando de este modo un aumento en la fluorescencia del informador. El aumento de la fluorescencia en la reacción es directamente proporcional al aumento de los objetivos amplificados. Al utilizar el sistema LightCycler 480 II (Roche) o el sistema Versant kPCR (Siemens) o el sistema Mx3005P (Agilent Technologies) o instrumentos equivalentes en tiempo real para la detección de fluorescencia que se originan en la sonda, se puede medir el aumento de la fluorescencia en tiempo real. El resultado del análisis es un valor CT de cada objetivo. El valor CT (umbral del ciclo) está determinado por el número de ciclos de amplificación PCR, después de lo cual la señal de fluorescencia de la sonda supera una determinada señal de fondo, donde el valor CT es una medida de la cantidad de moléculas diana en la muestra antes de la amplificación por PCR. Preferiblemente, los valores de CT se analizan adicionalmente con un software apropiado (por ejemplo, Microsoft Excel<sup>TM</sup>) o paquetes de software estadístico (por ejemplo, SAS JMP<sup>®</sup> 9.0.0, GraphPad Prism4, Genedata Expressionist<sup>TM</sup>). El valor de CT puede convertirse a una cantidad de molécula diana absoluta (por ejemplo, ng/μl o moléculas/μl) basándose en los resultados de CT de una curva estándar con concentraciones diana conocidas. Alternativamente, la cantidad objetivo puede informarse como el número de veces de disminución o aumento de la cantidad con base en una referencia (= ΔCT). Los



valores bajos de  $\Delta CT$  (diferencia pequeña) indican mayores cantidades de diana con respecto a la referencia en comparación con  $\Delta CT$  alta (diferencia grande). Es adecuado recalcular el  $\Delta CT$  restándolo de un valor fijo (como el número de ciclos de PCR, por ejemplo 40). El resultado es un valor con correlación directa con la cantidad diana (valor alto = cantidad alta) y expresado como valores  $40 - \Delta CT$ , donde un número entero se refiere a una duplicación de la cantidad diana (por ejemplo, un valor de 34 indica una cantidad que es tanto como dos veces un valor de 33). Dependiendo de la reproducibilidad y precisión deseadas del sistema, es posible agrupar múltiples ensayos de referencia o recalcular/normalizar el  $\Delta CT$  de la muestra con el  $\Delta CT$  de un calibrador (calibración de 1 punto; Pfaffl (2001), *Nucleic Acid Res.*, 29(9): e45). Al usar diferentes fluoróforos para sondas específicas, también es posible multiplexar diferentes ensayos diana en la misma reacción. Durante la PCR, cada objetivo en el múltiplex se amplifica en paralelo, pero se detecta por separado utilizando la emisión fluorescente diferente.

Preferiblemente, los cebadores para uso de acuerdo con la presente invención tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos, en particular desoxirribonucleótidos. En una realización, los cebadores están diseñados para (1) ser específicos para la secuencia de ARNm diana (es decir, HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1), (2) proporcionar un tamaño de amplicón de menos de 120 pb (preferiblemente menos de 100 pb), (3) detectar todas las variantes conocidas de empalme de codificación de proteínas, (4) no incluir polimorfismos conocidos (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido, SNP), (5) ser específicos de ARNm (consideración de exones/intrones, preferiblemente sin amplificación de ADN), (6) no tener tendencia a dimerizarse y/o (7) tener una temperatura de fusión  $T_m$  en el intervalo de 58°C a 62°C (preferiblemente,  $T_m$  es aproximadamente 60°C).

Como se usa en el presente documento, el término "nucleótido" incluye nucleótidos nativos (de origen natural), que incluyen una base nitrogenada seleccionada del grupo que consiste en adenina (A), timidina (T), citosina (C), guanina (G) y uracilo (U), un azúcar seleccionado del grupo de ribosa, arabinosa, xilosa y piranosa, y desoxirribosa (la combinación de la base y azúcar generalmente referida como un "nucleósido"), y de uno a tres grupos fosfato, y que puede formar enlaces internucleosídico fosfodiéster. Además, como se usa en este documento, "nucleótido" se refiere a análogos de nucleótidos. Como se usa en el presente documento, "análogo de nucleótido" significará un análogo de A, G, C, T o U (es decir, un análogo de un nucleótido que comprende la base A, G, C, T o U) que es reconocido por ADN o ARN polimerasa (cualquiera que sea aplicable) e incorporado en una cadena de ADN o ARN (cualquiera que sea apropiado). Ejemplos de dichos análogos de nucleótidos incluyen, sin limitación, 5-propinil pirimidinas (es decir, 5-propinil-dTTP y 5-propinil-dCTP), 7-deaza purinas (es decir, 7-deaza-dATP y 7-deaza-dGTP), aminoalil-dNTPs, biotin-AA-dNTPs, 2-amino-dATP, 5-metil-dCTP, 5-yodo-dUTP, 5-bromo-dUTP, 5-fluoro-dUTP, N4-metil-dCTP, 2-tio-dTTP, 4-tio-dTTP y alfa-tio-dNTP. También se incluyen análogos etiquetados, por ejemplo análogos fluorescentes tales como DEAC-propilendiamina (PDA)-ATP, análogos basados en análogos de nucleósidos morfolino así como análogos de ácido nucleico bloqueado (LNA).

La expresión "específico para la secuencia de ARNm diana", como se usa en conexión con cebadores para uso de acuerdo con la presente invención, se refiere a la capacidad del cebador para hibridar (es decir, aparearse) con el ADNc de la secuencia de ARNm en condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en solución, en particular condiciones de PCR. Las condiciones de temperatura y la fuerza iónica de la solución determinan la calidad restrictiva de la hibridación. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos (es decir, cebador y ADNc) contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la calidad restrictiva de la hibridación, son posibles los desapareamientos entre las bases. En una realización, "condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en solución" se refieren a una temperatura en el intervalo de 58°C a 62°C (preferiblemente una temperatura de aproximadamente 60°C) y una concentración de fuerza iónica comúnmente utilizada en mezclas de reacción de PCR. En una realización, la secuencia del cebador es 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementario a la secuencia correspondiente del ADNc de la secuencia de ARNm diana, como se determina mediante algoritmos de comparación de secuencias conocidos en la técnica.

En una realización, el cebador se hibrida con el ADNc de la secuencia de ARNm diana en condiciones de hibridación restrictivas o moderadamente restrictivas. Las "condiciones de hibridación restrictivas", como se definen en este documento, implican hibridación a 68°C en 5x SSC/5x solución de Denhardt/1.0% SDS, y lavado en 0.2x SSC/0.1% SDS a temperatura ambiente, o implican su equivalente reconocido en la técnica (por ejemplo, condiciones en las que se lleva a cabo una hibridación a 60°C en 2.5 x regulador SSC, seguido de varias etapas de lavado a 37°C en una baja concentración de regulador, y permanece estable). Las "condiciones de hibridación moderadamente restrictivas", tal como se definen en el presente documento, implican incluir lavado en 3x SSC a 42°C, o el equivalente reconocido en la técnica del mismo. Los parámetros de concentración de sal y temperatura pueden variarse para alcanzar el nivel óptimo de identidad entre el cebador y el ácido nucleico diana. La orientación con respecto a tales condiciones está disponible en la técnica, por ejemplo, en Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel et al. (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley and Sons, N.Y.).

En una realización, el método de la presente invención comprende el uso de cebadores específicos de ESR1 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o cebadores específicos de HER2 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al

5 menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o cebadores específicos de Ki67 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o cebadores específicos de PGR que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11, y/o cebadores específicos de RACGAP1 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 13 y 14. En una realización, los cebadores específicos comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias indicadas anteriormente.

10 En una realización, el método comprende el uso de cebadores específicos de ESR1 que tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o cebadores específicos de HER2 que tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o cebadores específicos de Ki67 que tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o cebadores específicos de PGR que tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11, y/o cebadores específicos de RACGAP1 que tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 13 y 14.

15 Preferiblemente, las sondas para uso de acuerdo con la presente invención tienen una longitud de 20 a 35 nucleótidos, en particular desoxirribonucleótidos. En una realización, las sondas están diseñadas para (1) ser específicas para la secuencia de ARNm diana (es decir, HER2, ESR1, PGR y Ki67 y/o RACGAP1), (2) no incluir polimorfismos conocidos (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido, SNP) y/o (3) tienen una temperatura de fusión  $T_m$ , que es aproximadamente de 5°C a 8°C más alta que la temperatura de fusión  $T_m$  de los cebadores correspondientes.

20 La expresión "específica para la secuencia de ARNm diana", como se usa en conexión con las sondas para uso de acuerdo con la presente invención, se refiere a la capacidad de la sonda para hibridar (es decir, fusionarse) con el ADNc (amplificado) de la secuencia de ARNm diana en condiciones apropiadas de temperatura y concentración de la fuerza iónica, en particular condiciones de PCR. Las condiciones de temperatura y la fuerza iónica de la solución determinan la calidad restrictiva de la hibridación. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos (es decir, sonda y ADNc) contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo de la calidad restrictiva de la hibridación, son posibles las no coincidencias entre las bases. En una realización, "condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en solución" se refieren a una temperatura en el intervalo de 63°C a 70°C y una resistencia iónica a la solución comúnmente utilizada en las mezclas de reacción de PCR. En una realización, la secuencia de la sonda es 80%, preferiblemente 85%, más preferiblemente 90%, incluso más preferiblemente 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% complementarios a la secuencia correspondiente de ADNc (amplificado) de la secuencia de ARNm diana, según se determina mediante algoritmos de comparación de secuencias conocidos en la técnica.

30 En una realización, la sonda se hibrida con el ADNc (amplificado) de la secuencia de ARNm diana en condiciones de hibridación restrictivas o moderadamente restrictivas como se definió anteriormente.

35 En una realización, el método comprende el uso de una sonda específica de ESR1 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o una sonda específica de HER2 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 6, y/o una sonda específica de Ki67 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o una sonda específica de PGR que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 12, y/o una sonda específica de RACGAP1 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 15. En una realización, las sondas específicas comprenden al menos 20 nucleótidos contiguos de las secuencias indicadas anteriormente.

40 En una realización, el método comprende el uso de una sonda específica de ESR1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o una sonda específica de HER2 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6, y/o una sonda específica de Ki67 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o una sonda específica de PGR que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12, y/o una sonda específica de RACGAP1 que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15.

45 Preferiblemente, las sondas como se definieron anteriormente son sondas de doble etiqueta que comprenden una unidad estructural informadora de fluorescencia y una unidad estructural atenuadora de fluorescencia.

50 En una realización, el nivel de expresión se normaliza frente al nivel de expresión (media) de uno o más genes de referencia en la muestra del tumor. El término "gen de referencia", como se usa en este documento, se refiere a un gen que tiene un nivel de expresión relativamente invariable en el nivel de transcripción de ARN/ARNm en el sistema que se está examinando, es decir, cáncer. Tal gen puede denominarse gen de mantenimiento. En una realización, el uno o más genes de referencia se seleccionan del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH, preferiblemente CALM2 y/o B2M.

55 Como se usa en este documento, CALM2 se refiere a calmodulina-2, fosforilasa quinasa, delta (Ref.Seq. (ARNm): NM\_001743), B2M se refiere a beta-2 microglobulina (Ref.Seq. (ARNm): NM\_004048), RPL37A se refiere a 60S proteína ribosómica L37a (Ref.Seq. (ARNm): NM\_000998), GUSB se refiere a beta-glucuronidasa (Ref.Seq. (ARNm):

NM\_000181), HPRT1 se refiere a hipoxantina-fosforibosil-transferasa 1 (Ref.Seq. (ARNm): NM\_000194) y GAPDH se refiere a gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (Ref.Seq. (ARNm): NM\_002046).

5 También se describe aquí un método para estratificar a un paciente con cáncer de mama para el tratamiento tumoral, comprendiendo dicho método, como primera etapa, identificar un subtipo molecular de un tumor de mama en el paciente con cáncer de mama usando el método *in vitro* como se define anteriormente y, como segunda etapa, seleccionar un régimen de tratamiento tumoral basado en el subtipo molecular identificado por el método *in vitro*.

La "estratificación de un paciente con cáncer para el tratamiento tumoral" de acuerdo con la presente divulgación comprende la asignación del paciente con cáncer a un grupo de pacientes que tiene un subtipo de tumor molecular particular, que luego permite al médico seleccionar el régimen de tratamiento tumoral más adecuado.

10 En una realización, dicho método de estratificación de un paciente con cáncer de mama para el tratamiento tumoral no comprende ninguna otra etapa de diagnóstico, como la clasificación histológica o la determinación del estado ganglionar linfático, además de la etapa de identificar el subtipo molecular del tumor de mama en el paciente con cáncer de mama usando el método *in vitro* como se define arriba.

15 En una realización, el subtipo molecular se selecciona del grupo que comprende HER2-positivo, triple-negativo, luminal A y luminal B.

En una realización,

- el subtipo molecular es HER2-positivo, y el régimen de tratamiento tumoral comprende la administración de anticuerpos anti-HER2 y agentes quimioterapéuticos;
- 20 • el subtipo molecular es triple negativo, y el régimen de tratamiento del tumor comprende la administración de agentes quimioterapéuticos;
- el subtipo molecular es luminal A, y el régimen de tratamiento tumoral comprende terapia endocrina; o
- el subtipo molecular es luminal B, y el régimen de tratamiento tumoral comprende terapia endocrina y, opcionalmente, administración de agentes quimioterapéuticos.

25 Los anticuerpos monoclonales anti-HER2 incluyen trastuzumab (Herceptin®) y pertuzumab (Perjeta®), que se pueden administrar solos o en combinación. Trastuzumab es efectivo solo en cánceres donde HER2 está sobreexpresado. Otros anticuerpos monoclonales, como ertumaxomab (Rexomun®), están siendo sometidos a ensayos clínicos. Los anticuerpos anti-HER2 pueden modificarse adicionalmente para que comprendan una unidad estructural/agente terapéutico, tal como un agente citotóxico, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor), un agente quimioterapéutico o un radionúclido, o un radioisótopo. Una citotóxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial y, en particular, mata las

30 células. Ejemplos incluyen mertansina (DM1), taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina, diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, amanitina, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Otros agentes terapéuticos adecuados para formar conjugados de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo descarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepaclorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antracilinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En otra realización más, el agente terapéutico es GM-CSF. En una realización preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A. Las unidades estructurales terapéuticas adicionales incluyen unidades estructurales terapéuticas que actúan sobre la síntesis de ARNm y/o proteína. Se conocen varios inhibidores de la

40 transcripción. Por ejemplo, la actinomicina D, que es tanto un inhibidor de la transcripción como un agente de daño del ADN, se intercala en el ADN y por lo tanto inhibe la etapa de iniciación de la transcripción. El flavopiridol se dirige a la etapa de elongación de la transcripción. La  $\alpha$ -arnanitina se une directamente a la ARN polimerasa II, lo que conduce a la inhibición de las etapas de iniciación y elongación. Los anticuerpos anti-HER2 también pueden conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos. Una

45 alternativa a la administración de anticuerpos anti-HER2 es la administración de compuestos pequeños que se dirigen a HER2, como lapatinib (Tykerb® o Tyverb®).

Los agentes quimioterapéuticos según la invención incluyen compuestos citostáticos y compuestos citotóxicos. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales actúan al matar las células que se dividen rápidamente, una de las principales

- propiedades de la mayoría de las células cancerosas. De acuerdo con la invención, el término "agente quimioterapéutico" incluye taxanos, compuestos de platino, análogos de nucleósidos, análogos de camptotecina, antraciclinas y análogos de antraciclina, etopósido, bleomicina, vinorelbina, ciclofosfamida, antimetabolitos, antimetabólicos y agentes alquilantes, que incluyen los agentes divulgados anterior en conexión con conjugados de anticuerpos y combinaciones de los mismos. De
- 5 acuerdo con la invención, una referencia a un agente quimioterapéutico es incluir cualquier profármaco tal como éster, sal o derivado tal como un conjugado de dicho agente. Ejemplos son conjugados de dicho agente con una sustancia vehículo, por ejemplo, paclitaxel unido a proteína tal como paclitaxel unido a albúmina. Preferiblemente, las sales de dicho agente son farmacéuticamente aceptables. Los agentes quimioterapéuticos a menudo se administran en combinaciones, generalmente durante 3-6 meses. Uno de los tratamientos más comunes es la ciclofosfamida más doxorubicina
- 10 (adriamicina, que pertenece al grupo de antraciclinas y análogos de antraciclina), conocida como AC. A veces, se agrega un fármaco de taxano, como docetaxel, y el régimen se conoce como CAT; el taxano ataca a los microtúbulos en las células cancerosas. Otro tratamiento común, que produce resultados equivalentes, es ciclofosfamida, metotrexato, que es un antimetabolito, y fluorouracilo, que es un análogo de nucleósido (CMF). Otro tratamiento quimioterapéutico estándar comprende fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida (FEC), que se pueden complementar con docetaxel o vinorelbina.
- 15 La terapia endocrina (tratamiento antihormonal) se dirige a los cánceres que requieren estrógeno para seguir creciendo mediante la administración de medicamentos que bloquean/regulan negativamente los receptores de estrógeno y/o progesterona, por ejemplo, tamoxifeno (Nolvadex<sup>®</sup>) o fulvestrant (Faslodex<sup>®</sup>) o alternativamente bloquean la producción de estrógeno con un inhibidor de la aromatasas, por ejemplo, anastrozol (Arimidex<sup>®</sup>) o letrozol (Femara<sup>®</sup>). Los inhibidores de la aromatasas, sin embargo, solo son adecuados para pacientes posmenopáusicas. Esto se debe a que la aromatasas activa en mujeres posmenopáusicas es diferente de la forma prevalente en mujeres premenopáusicas, y por lo tanto estos
- 20 agentes son ineficaces en la inhibición de la aromatasas predominante de mujeres premenopáusicas.
- En una realización, el subtipo molecular es el luminal B, y el régimen de tratamiento del tumor comprende la administración de agentes quimioterapéuticos.
- 25 En una realización, el subtipo molecular es luminal B, y el régimen de tratamiento de tumor comprende la administración de un taxano, preferiblemente docetaxel.
- En una realización, el taxano se administra en combinación con fluorouracilo, epirrubicina y ciclofosfamida (FEC).
- También se describe aquí un método de tratamiento de cáncer, comprendiendo dicho método, como primera etapa, estratificar a un paciente con cáncer para tratamiento tumoral usando el método *in vitro* como se definió anteriormente, y, como segunda etapa, proporcionar el régimen de tratamiento tumoral seleccionado al paciente con cáncer. El régimen de
- 30 tratamiento tumoral se selecciona con base en el subtipo molecular identificado por el método *in vitro* como se definió anteriormente.
- Opcionalmente, dicho método comprende usar resultados cuantitativos obtenidos por el método *in vitro* como se definió anteriormente para la toma de decisiones directa a favor o en contra de la quimioterapia adyuvante/neoadyuvante.
- 35 También se describe aquí el uso de un kit para identificar un subtipo molecular de un tumor de mama en un paciente con cáncer de mama por medio de PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT), comprendiendo dicho kit:
- al menos un par de cebadores específicos de HER2 y al menos una sonda específica de HER2;
  - al menos un par de cebadores específicos de ESR1 y al menos una sonda específica de ESR1;
  - al menos un par de cebadores específicos de PGR y al menos una sonda específica de PGR; y
  - al menos un par de cebadores específicos de Ki67 y al menos una sonda específica de Ki67; y, opcionalmente,
  - 40 • al menos un par de cebadores específicos de RACGAP1 y al menos una sonda específica de RACGAP1.
- En una realización, la PCR cuantitativa es PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia.
- En una realización, la detección de la sonda se basa en el desplazamiento de la sonda mediado por amplificación.
- En una realización, la sonda es una sonda de doble etiqueta que comprende una unidad estructural informadora de fluorescencia y una unidad estructural atenuadora de fluorescencia.
- 45 En una realización, el kit comprende además una transcriptasa reversa y una ADN polimerasa.
- En una realización, la transcriptasa reversa y la polimerasa se proporcionan en forma de una mezcla de enzimas que permite una PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) de una etapa.

## ES 2 685 580 T3

En una realización, el kit comprende además al menos un par de cebadores específicos de genes de referencia y al menos una sonda específica de genes de referencia. En una realización, el gen de referencia es uno o más seleccionados del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH, preferiblemente CALM2 y/o B2M.

5 En una realización, el kit comprende además al menos una muestra de ARN de control. En una realización, la al menos una muestra de ARN de control se usa como control positivo y/o muestra de control (calibradora), en donde, preferiblemente, la al menos una muestra de ARN de control comprende ARNm sintético que codifica uno o más productos génicos (o partes de los mismos) de uno o más genes seleccionados del grupo que comprende HER2, ESR1, PGR, Ki67, RACGAP1 y uno o más genes de referencia. En una realización, el uno o más genes de referencia se seleccionan del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH, preferiblemente CALM2 y/o B2M.

10 En una realización, el kit puede comprender además una DNasa y un regulador de reacción de ADNasa.

Preferiblemente, los cebadores y las sondas son como se definieron anteriormente en conexión con el método *in vitro* de la presente descripción.

En una realización, los cebadores proporcionan un tamaño de amplicón de menos de 120 pb, preferiblemente menos de 100 pb.

15 En una realización, los cebadores específicos de ESR1 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o los cebadores específicos de HER2 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o los cebadores específicos de Ki67 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o los cebadores específicos de PGR tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11, y/o los cebadores específicos de RACGAP1 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 13 y 14. En una realización, los cebadores específicos comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos de las secuencias indicadas anteriormente.

20 En una realización, los cebadores específicos de ESR1 tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o los cebadores específicos de HER2 tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o los cebadores específicos de Ki67 tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o los cebadores específicos de PGR tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11, y/o los cebadores específicos de RACGAP1 tienen las secuencias de SEQ ID NOs: 13 y 14.

25 En una realización, la sonda específica de ESR1 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o la sonda específica de HER2 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEQ ID NO: 6, y/o la sonda específica para Ki67 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o la sonda específica de PGR tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 12, y/o la sonda específica de RACGAP1 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 15. En una realización, las sondas específicas comprenden al menos 20 nucleótidos contiguos de las secuencias indicadas anteriormente.

30 En una realización, la sonda específica de ESR1 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o la sonda específica de HER2 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 6, y/o la sonda específica de Ki67 tiene la secuencia de SEQ. ID NO: 9, y/o la sonda específica de PGR tiene la secuencia de SEQ ID NO: 12, y/o la sonda específica de RACGAP1 tiene la secuencia de SEQ ID NO: 15.

35 Preferiblemente, las sondas como se definieron anteriormente son sondas de doble etiqueta que comprenden una unidad estructural informadora de fluorescencia y una unidad estructural atenuadora de fluorescencia.

En una realización, el tumor es un tumor sólido.

40 Como se usa en el presente documento, el término "kit de partes (en resumen: kit)" se refiere a un artículo de fabricación que comprende uno o más contenedores y, opcionalmente, un soporte de datos. Dichos uno o más contenedores pueden llenarse con uno o más de los medios o reactivos mencionados anteriormente. Se pueden incluir recipientes adicionales en el kit que contienen, por ejemplo, diluyentes, reguladores y otros reactivos tales como dNTP. Dicho soporte de datos puede ser un soporte de datos no electrónico, por ejemplo, un soporte de datos gráficos tal como un folleto de información, una hoja de información, un código de barras o un código de acceso, o un soporte de datos electrónicos como un disco, un disco compacto (CD), un disco de vídeo digital (DVD), un microchip u otro soporte de datos electrónicos basado en semiconductores. El código de acceso puede permitir el acceso a una base de datos, por ejemplo, una base de datos de Internet, una base de datos centralizada o descentralizada. Dicho soporte de datos puede comprender instrucciones para el uso del kit en los métodos de la invención. El soporte de datos puede comprender un valor umbral o nivel de referencia de transcripción de ARN, por ejemplo, ARNm. En caso de que el soporte de datos comprenda un código de acceso que

permita el acceso a una base de datos, dicho valor umbral o nivel de referencia se deposita en esta base de datos. Además, el soporte de datos puede comprender información o instrucciones sobre cómo llevar a cabo los métodos de la presente invención.

5 También se divulga aquí el uso de un kit como se define anteriormente para evaluar el riesgo de un paciente con cáncer de metástasis distante.

La presente invención supera las principales desventajas del método estándar actual de diagnóstico e inmunohistoquímica de la técnica actual y métodos más recientes.

La presente invención permite la subtipificación molecular fiable de tumores de mama, que luego permite al médico seleccionar el régimen de tratamiento tumoral más adecuado.

10 Gracias al orden preferido de la evaluación de los cuatro o cinco marcadores (preferiblemente, se determina primero el nivel de expresión de la transcripción de ARN de HER2) no hay clasificación errónea de HER2-positivo en subtipos luminal A y B, un problema que a menudo ocurre si la subtipificación se basa en análisis de conglomerados jerárquicos o análisis de correlación (Perou et al (2000), Nature, 406: 747-752; TCGA (Cancer Genome Atlas Network) (2012), Nature, 490: 61-70). Además, no existe una clasificación errónea de tumores falsos positivos y clínicamente negativos para HER2, que, según Perou et al., pueden ocurrir en hasta 30% de estos casos.

15 La presente descripción proporciona métodos y usos de kits para confirmar/reevaluar resultados inciertos o contradictorios de un análisis inmunoquímico, especialmente en los siguientes grupos de pacientes con cáncer de mama identificados por IHC: ESR1/PGR negativo (aproximadamente 30% de todos los pacientes con cáncer), ESR1/PGR débilmente positivo (aproximadamente 15% de todos los pacientes con cáncer de mama), HER2 3+ (biopsia tumoral IHC, no confirmada por ICH de disección tumoral, aproximadamente 15% de todos los pacientes con cáncer de mama) y HER 2+ (aproximadamente el 20% de todos los pacientes con cáncer de mama).

20 Los métodos y kits usados de acuerdo con la presente invención facilitan la toma de decisiones directa a favor o en contra de la quimioterapia adyuvante en el cáncer de mama luminal debido a la distinción de los subtipos luminal A y luminal B mediante la detección confiable de la transcripción de ARN Ki67 y RACGAP1. Esto es particularmente útil para pacientes con tumores ESR1/PGR positivos y hasta grado 2 (aproximadamente el 50% de todos los pacientes con cáncer de mama).

25 La presente invención permite una distinción entre los tumores luminal A y luminal B con tasas de supervivencia libre de metástasis distante y supervivencia general claramente diferentes. Mientras que los pacientes con luminal B tienen un riesgo continuamente alto de metástasis, particularmente en los primeros cinco años después del tratamiento (por ejemplo, cirugía), el riesgo de pacientes con luminal A es constante y claramente más bajo. Por lo tanto, los métodos y kits descritos en este documento también permiten la evaluación del riesgo de un paciente de metástasis distante.

30 Mediante el uso de los métodos descritos en el presente documento, aproximadamente el 77% de los tumores luminales en el estudio FinHER (Joensuu et al. (2006), N Engl J Med, 354: 809-820) se asignan al grupo de bajo riesgo luminal A y no hay grupos de riesgo intermedios. Además, la clasificación en luminal A y luminal B reduce la importancia de la clasificación histológica y el estado ganglionar, dos parámetros que suelen ser muy importantes para el pronóstico tumoral. Por lo tanto, las incertidumbres con respecto a la terapia de los tumores de grado 2 se resuelven de una manera clínicamente relevante.

35 Los métodos y kits usados de acuerdo con la presente descripción también permiten la predicción de la respuesta a la terapia sistémica gracias a la determinación cuantitativa del nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1, HER2, Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1. Esto es particularmente útil para pacientes que tienen cáncer de mama invasivo >1 cm con IHC incierta (aproximadamente 40% de todos los pacientes con cáncer de mama).

40 Las novedades de la presente divulgación incluyen no solo la estimación con base en ARNm de biomarcadores de cáncer de mama, sino también la definición algorítmica de subtipos. La inclusión de la positividad de PGR obligatoria para la definición luminal A además de la baja Ki67 es un criterio original, no incluido en las guías clínicas de 2011 de St. Gallen en el momento de la invención. Además, los tumores que muestran expresión de ARNm de HER2 que excede el límite predefinido se clasifican como positivos a HER2 independientemente del estado de ESR1/PGR, que también se desvía de las directrices internacionales de 2011, que todavía están vigentes. Todos estos nuevos aspectos contribuyen al valor predictivo del enfoque y kit basados en RT-qPCR usados de acuerdo con la presente invención. De hecho, estas novedades, técnicas en términos de estimación de biomarcadores con base en RT-qPCR y teóricas en términos del algoritmo de clasificación, proporcionan una subtipificación más precisa y significativa de los pacientes en el ensayo clínico FinHer, que en última instancia proporciona una herramienta predictiva para el beneficio de docetaxel en un entorno de terapia adyuvante.

Considerada en conjunto, la presente invención satisface en la actualidad las necesidades clínicas ampliamente insatisfechas para una evaluación fiable, reproducible y cuantitativa del pronóstico y la predicción del éxito de la terapia en al menos el 50% de todos los pacientes con cáncer de mama (véase también la Figura 1).

5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitativos del alcance de la invención.

#### Ejemplos

Ejemplo 1: Determinación de los niveles de expresión de ARNm por PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) (RT-qPCR)

10 Se aisló ARN a partir de tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (= tejidos FFPE). Más particularmente, se extrajo el ARN total de una viruta de 5 a 10  $\mu\text{m}$  de tejido tumoral FFPE usando el kit High Pure RNA Paraffin (Roche, Basilea, Suiza) o el XTRAKT RNA Extraction Kit XL (Stratifyer Molecular Pathology, Colonia, Alemania), cuantificado mediante el ensayo de cuantificación de ARN Ribogreen (Molecular Probes, Eugene, OR) y calificado mediante RT-PCR de fluorescencia en tiempo real de un fragmento del gen de referencia RPL37A. Se reconoció que existen diferencias entre diferentes tecnologías de extracción cuando se comparan datos cuantitativos de genes diana de cortes secuenciales por diferentes metodologías. Para el propósito de la presente invención, se prefirió el uso del XTRAKT RNA Extraction Kit XL. En general, se analizaron 2.5  $\mu\text{l}$  de ARN de cada extracción calificada (aproximadamente 50-100 ng) por qRT-PCR como se describe a continuación.

20 Para un análisis detallado de la expresión génica mediante métodos cuantitativos de RT-PCR, se utilizaron cebadores que flanqueaban la región de interés y una sonda fluorescente marcada que se hibridaba en el medio. Los cebadores y sondas específicos del blanco se seleccionaron usando la herramienta de diseño principal del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Se usaron secuencias de cebador/sonda específicas de ARN para permitir mediciones específicas de ARN mediante la localización de secuencias de cebador/sonda a través de los límites exón/exón. Además, se seleccionaron cebadores/sondas que no se unen a regiones de secuencia con polimorfismos conocidos (SNP). En caso de que existan múltiples isoformas del mismo gen, se seleccionaron cebadores para amplificar todas las variantes de empalme relevantes. Todos los pares de cebadores se verificaron para determinar su especificidad mediante reacciones de PCR convencionales. Después de una mayor optimización de los cebadores/sondas, los cebadores y las sondas enumerados en la Tabla 1 dieron los mejores resultados. Estos cebadores/sondas son superiores a los cebadores/sondas conocidos de la técnica anterior, por ejemplo en términos de especificidad y eficiencia de amplificación. Para estandarizar la cantidad de ARN de muestra, los genes CALM2 y B2M se seleccionaron como genes de referencia, ya que no estaban regulados diferencialmente en las muestras analizadas.

30

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Purificación	Modificación en 5'	Modificación en 3'
ESR_F	AGAGGGTGCCAGGCTTTGT (SEQ ID NO: 1)	HPLC	ninguno	ninguno
ESR_R	AGGATCTCTAGCCAGGCACATT (SEQ ID NO: 2)	HPLC	ninguno	ninguno
ESR_P	TTTGACCCTCCATGATCAGGTCCACCT (SEQ ID NO: 3)	HPLC	JOE	TAMRA
HER2_F	GAACTCACCTACCTGCCACC (SEQ ID NO: 4)	HPLC	ninguno	ninguno

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Purificación	Modificación en 5'	Modificación en 3'
HER2_R	GACCTGCCTCACTTGGTTGTG (SEQ ID NO: 5)	HPLC	ninguno	ninguno
HER2_P	CCAGGAGGTGCAGGGCTACGTG (SEQ ID NO: 6)	HPLC	6-FAM	Dabcyl
KI67_F	CGAGACGCCTGGTTACTATCAA (SEQ ID NO: 7)	HPLC	ninguno	ninguno
KI67_R	GGATACGGATGTCACATTCAATACC (SEQ ID NO: 8)	HPLC	ninguno	ninguno
KI67_P	ACGGTCCCCACTTTCCCCTGAGC (SEQ ID NO: 9)	HPLC	6-FAM	Dabcyl
PGR_F	AAACTTCTTGATAACTTGCATGATCTT (SEQ ID NO: 10)	HPLC	ninguno	ninguno
PGR_R	CAATAACTTCAGACATCATTTCTGG (SEQ ID NO: 11)	HPLC	ninguno	ninguno
PGR_P	CGGGACTGGATAAATGTATTCAAGCAGTAC (SEQ ID NO: 12)	HPLC	6-FAM	Dabcyl
RAC_F	GAATGTGCGGAATCTGTTTGAG (SEQ ID NO: 13)	HPLC	ninguno	ninguno
RAC_R	TCGCCAACTGGATAAATTGGA (SEQ ID NO: 14)	HPLC	ninguno	ninguno
RAC_P	ACTGAGAATCTCCACCCGGCGCA (SEQ ID NO: 15)	HPLC	JOE	TAMRA
B2M_F	GSTATGCCTGCCGTGTGAACC (SEQ ID NO: 16)	HPLC	ninguno	ninguno
B2M_R	GGCATCTTCAAACCTCCATGAT (SEQ ID NO: 17)	HPLC	ninguno	ninguno
B2M_P	AGTGGGATCGAGACATGTAAGCAGC (SEQ ID NO: 18)	HPLC	JOE	TAMRA
CALM2_F	AGGAGGCCGAATTAGTCCGA (SEQ ID NO: 19)	HPLC	ninguno	ninguno
CALM2_R	GCTCTTCAGTCAGTTGGTCA (SEQ ID NO: 20)	HPLC	ninguno	ninguno
CALM2_P	TCGCGTCTCGGAAACCGGTAGC (SEQ ID NO: 21)	HPLC	JOE	TAMRA

**Tabla 1.** Cebadores y sondas usados.

Los experimentos de validación con TaqMan® se realizaron mostrando que las eficiencias de las amplificaciones objetivo y de control son aproximadamente iguales, lo que es un requisito previo para la cuantificación relativa de la expresión génica mediante el método  $\Delta$ CT comparativo. Para realizar el análisis de expresión de los genes de interés dentro de una muestra biológica, se prepararon mezclas de ensayos dúplex 4 x mezclando los cebadores/sondas respectivos de dos ensayos específicos. Para la detección por separado de los valores de CT, las sondas de ensayo se modificaron con diferentes sondas fluorescentes. Cada 4 x mezcla de ensayo contenía 2  $\mu$ M de cebador directo e inverso no modificado y 1.2  $\mu$ M de sonda. Para cada reacción se mezclaron 2.5  $\mu$ l de ARN total extraído de secciones de FFPE (véase arriba) con 2.5  $\mu$ l de mezcla de ensayo, 2.5  $\mu$ l de mezcla de enzima y 2.5  $\mu$ l de agua en un pozo de una placa de reacción óptica de 96 pozos. Las mediciones de la reacción PCR se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un Versant kPCR Cycler (Siemens) o un Light Cycler 480 (Roche) en condiciones apropiadas (5 minutos, 50°C, 20 segundos, 95°C, 15 segundos 95°C, 1 minuto 60°C, 40 ciclos). Antes de la medición del control de muestras biológicas hasta ahora no clasificadas, pueden usarse experimentos con, por ejemplo, líneas celulares, muestras de control sanas, muestras de subtipos de tumores moleculares definidos para la estandarización de las condiciones experimentales.



Ejemplo 2: Subtipificación molecular de tumores basado en los niveles de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR, Ki67 y, opcionalmente, RACGAP1

5 Para la evaluación de los tumores de mama, 855 de 1010 pacientes con cáncer de mama del estudio FinHER (Joensuu et al. (2006), N Engl J Med, 354: 809-820) podrían ser utilizados. Los valores medios de corte (dados como valores 40- $\Delta$ CT) fueron los siguientes: HER2: 38; ESR1: 34; PGR: 30.2; Ki67: 31.7; y RACGAP1: 34.2. Los valores de corte para HER2 y ESR1 se determinaron con base en la evaluación de estudios previos (Koutras et al (2008), Brit. J. of Cane., 99: 1775-1785; Pentheroudakis et al (2009), Breast Cancer Res Treat 2009, 116: 131-143) usando 268 muestras y se aplicaron al estudio FinHER (validación del modelo de riesgos proporcionales). CALM2 sirvió como gen de referencia.

10 Basado en el nivel de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y Ki67 (neg./bajo indica un nivel de expresión que es inferior al umbral de expresión definido; pos./aumentado indica un nivel de expresión que es mayor que el umbral de expresión definido) se asignan tumores a los subtipos moleculares HER2-positivo (HER2), luminal A (LumA), luminal B (LumB) y triple negativo (TNT). Como se muestra en la Tabla 2, la subtipificación molecular de tumores de acuerdo con la presente invención difiere de aquellas que se basan en métodos de la técnica anterior, por ejemplo, inmunohistoquímica (Goldhirsch et al. (2011), Annals of Oncology, 22: 1736-1747, St. Gallen International Expert Consensus on the Primary  
15 Therapy of Early Breast Cancer 2011) y análisis de solo tres marcadores genéticos (Sotiriou et al. (2009), N Engl J Med, 360(8): 790-800).

Tabla 2. Subtipificación molecular de tumores

HER2	ESR1	PGR	Ki67	Presente invención	Goldhirsch et al. (2011)	Sotiriou et al. (2009)
neg	neg	neg	bajo	TNT	TNT	Tipo basal
neg	neg	neg	aumentado	TNT	TNT	basal
neg	pos	pos	bajo	LumA	LumA	LumA
neg	neg	pos	bajo	LumA	LumA	LumB
neg	neg	pos	aumentado	LumB	LumB	LumB
neg	pos	neg	bajo	LumB	LumA	LumB
neg	pos	pos	aumentado	LumB	LumB	LumB
neg	pos	neg	aumentado	LumB	LumB	LumB
pos	pos	pos	aumentado	HER2	LumB	HER2
pos	pos	pos	bajo	HER2	LumB	HER2
pos	pos	neg	bajo	HER2	LumB	HER2
pos	neg	neg	bajo	HER2	HER2	HER2
pos	neg	neg	aumentado	HER2	HER2	HER2

20 La Figura 2 muestra una prueba de partición para evaluar el valor pronóstico y predictivo del nivel de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR, Ki67 y RACGAP1 para la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con cáncer de mama. Estos datos muestran que los niveles de expresión del ARNm de RACGAP 1 por debajo o por encima del umbral definido están asociados con diferencias particularmente significativas en la tasa de supervivencia a 5 años. Más particularmente, un nivel aumentado de expresión de ARNm de RACGAP1 reduce la probabilidad de supervivencia significativamente. La probabilidad de supervivencia se reduce aún más si la expresión de ARNm de RACGAP1 aumenta y la expresión de

ARNm de Ki67 es baja (véase la Tabla 3). Con los procedimientos analíticos actuales, estos pacientes de riesgo (que requerirían un tipo diferente de atención de seguimiento, por ejemplo, un examen con métodos de generación imagen particulares) permanecen sin descubrir.

Tabla 3. Expresión de ARNm de RACGAP1/Ki67 y probabilidad de supervivencia.

Ki67	RACGAP1	5 años de supervivencia
umentado	umentado	50%
umentado	bajo	84%
bajo	umentado	63%
bajo	bajo	91%
umentado	no contabilizado	78%
bajo	no contabilizado	90%

5

Usando el análisis de Kaplan Meier, los inventores analizaron la supervivencia de pacientes con tumores HER2-positivo, luminal A, luminal B y triple negativo, respectivamente, en donde el subtipo molecular del tumor se identificó de acuerdo con la presente invención, es decir, basado en el ARNm niveles de expresión de HER2, ESR1, PGR y Ki67. Como se muestra en la Figura 3, el subtipo luminal A, como se define por los presentes inventores, se asocia con una tasa de supervivencia global del 97% después de 5 años (frente al 87% para tumores luminal B y HER2 positivos y 84% para triples tumores negativos).

10

Los inventores analizaron además la supervivencia libre de metástasis distante ("DMFS", recurrente distante X años después de la cirugía) de pacientes con tumores HER2-positivo, luminal A, luminal B y triple-negativo, respectivamente, en donde el subtipo molecular del tumor fue identificado de acuerdo con la presente invención. Como se muestra en la Figura 4, el subtipo luminal A, como se define por los presentes inventores, se asocia con una tasa de supervivencia libre de metástasis distante del 92% después de 5 años (frente al 78% para tumores luminal B, HER2 positivos y triples negativos)

15

En un análisis multivariado de la supervivencia general con los más importantes parámetros estándar histopatológicos (tamaño del tumor, estado ganglionar y clasificación histológica) la subtipificación molecular de acuerdo con la presente invención resultó ser altamente significativa, mientras que tanto la clasificación histológica y el estado nodal perdieron su significado.

20

Finalmente, un análisis multivariable de regresión de Cox de CPOS comparando la subtipificación molecular por inmunohistoquímica (Sotiriou et al (2009), N Engl J Med, 360(8): 790-800) con la subtipificación molecular por el método de acuerdo con la presente invención, con base en los niveles de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y Ki67, se realizó (Figura 5). El análisis muestra claramente la superioridad del método de la presente invención, ya que la subtipificación inmunohistoquímica pierde su significado cuando los resultados obtenidos por el método de la presente invención se incluyen en el modelo de riesgos proporcionales de Cox.

25

Ejemplo 3: Medición de los niveles de expresión de ARNm de biomarcadores HER2, ESR1, PGR, Ki67 por PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) (RT-qPCR) y determinación del subtipo molecular

30

Se aisló ARN a partir de tejidos de FFPE. Más particularmente, el ARN total de secciones de 10 µm de tejido de tumor de mama FFPE se extrajo usando el kit de extracción de ARN XTRAKT (Stratifyer Molecular Pathology, Colonia, Alemania). Los eluidos de ARN se usaron directamente sin determinación de concentración. Se analizaron 2.5 µl de ARN de cada extracción mediante RT-qPCR como se describe a continuación.

35

Para RT-qPCR, se usaron cebadores que flanqueaban la región de interés y una sonda de hidrólisis marcada fluorescentemente en 5' con un inactivador 3'-TAMRA o Dabcyl para cada objetivo. Los cebadores y las sondas usados se enumeran en la Tabla 1. Para corregir las diferentes cantidades de ARN de muestra, los genes CALM2 y B2M se usaron como genes de referencia para la normalización de los resultados de expresión. La RT-qPCR se realizó en dúplex en las siguientes combinaciones, HER2/ESR1, Ki67/B2M y PGR/CALM2. Cada una de las tres mezclas de ensayo 4x

- 5 contenía 2 µM de cebador directo e inverso no modificado y 1.2 µM de sonda. Para cada ensayo, se preparó una mezcla maestra con 2.5 µl de mezcla de ensayo, 2.5 µl de mezcla enzimática 4x (TaqManFast Virus 1-Step MasterMix, Life Technologies) y 2.5 µl de agua por reacción y se transfirieron 7.5 µl de cada mezcla maestra a un placa de reacción de 96 pozos kPCR por triplicado. Se añadieron 2.5 µl de ARN total extraído de secciones de FFPE (véase más arriba) o, como alternativa, se añadió ARN positivo (ARN IVT) o negativo (agua) a cada pozo. El análisis de los eluidos de ARN derivados de tres muestras de pacientes se realizó con tres lotes de mezclas de ensayo y mezclas de enzimas. La medición de las reacciones de RT-qPCR de 1 etapa se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante con un kPCR Versant Cyclor (Siemens) con el siguiente perfil térmico: 5 min a 50°C, 20 seg a 95°C un ciclo cada uno y 15 segundos a 95°C, 1 min 60°C durante 40 ciclos.
- 10 Se analizaron 6 muestras de pacientes junto con los controles positivo y negativo con tres lotes de mezclas de ensayo. Los valores 40-ΔΔCT se calcularon de acuerdo con la descripción dada anteriormente (método de cálculo 4). Las Figuras 6 a 9 muestran los valores 40-ΔΔCT para cada marcador, para cada muestra y lote. Los valores de corte (dados como valores 40-ΔΔCT) para la clasificación de los biomarcadores en positivo o negativo fueron los siguientes: HER2: 40.90; ESR1: 38.20; PGR: 34.90; Ki67: 34.80. El subtipo molecular se definió como se muestra en la Tabla 4.

15 Tabla 4. Subtipificación molecular de muestras de pacientes

HER2	ESR1	PGR	KI67	Subtipo
pos	pos	pos	pos	HER2+
pos	pos	pos	<i>neg</i>	HER2+
pos	pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	HER2+
pos	<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	HER2+
pos	<i>neg</i>	pos	pos	HER2+
pos	pos	<i>neg</i>	pos	HER2+
pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	HER2+
pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	HER2+
<i>neg</i>	pos	pos	pos	Luminal-B
<i>neg</i>	pos	pos	<i>neg</i>	Luminal-A
<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	Luminal-B
<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	Luminal-A
<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	pos	Luminal-B
<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	pos	Luminal-B
<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	Triple negativo
<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	Triple negativo

## ES 2 685 580 T3

Tabla 5. Valores de 40- $\Delta\Delta$ CT y subtipo demandado por lote de mezcla de ensayo 1.

Lot 1	HER2	ESR1	PGR	KI67	HER2	ESR1	PGR	KI67	Subtipo
Muestra 1	37.13	33.64	32.05	36.90	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	TNBC
Muestra 2	38.86	33.86	32.60	38.72	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	TNBC
Muestra 3	42.75	37.84	32.08	37.43	pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	HER2+
Muestra 4	39.11	40.07	38.22	37.13	<i>neg</i>	pos	pos	pos	LumB
Muestra 5	41.55	37.87	35.89	33.85	pos	<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	HER2+
Muestra 6	39.40	40.14	40.63	34.64	<i>neg</i>	pos	pos	<i>neg</i>	LumA

Tabla 6. Valores 40- $\Delta\Delta$ CT y subtipo demandado por lote de mezcla de ensayo 2.

Lot 2	HER2	ESR1	PGR	KI67	HER2	ESR1	PGR	KI67	Subtipo
Muestra 1	36.49	32.61	30.77	36.61	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	TNBC
Muestra 2	38.66	33.24	31.62	38.60	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	TNBC
Muestra 3	42.71	37.85	31.19	37.44	pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	HER2+
Muestra 4	38.98	39.84	37.73	37.43	<i>neg</i>	pos	pos	pos	LumB
Muestra 5	41.72	37.13	35.12	34.08	pos	<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	HER2+
Muestra 6	39.63	40.32	40.30	33.83	<i>neg</i>	pos	pos	<i>neg</i>	LumA

Tabla 7. Valores de 40- $\Delta\Delta$ CT y subtipo demandado por lote de mezcla de ensayo 3.

Lot 3	HER2	ESR1	PGR	KI67	HER2	ESR1	PGR	KI67	Subtipo
Muestra 1	36.77	33.46	30.90	36.60	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	TNBC
Muestra 2	38.46	33.27	31.52	38.51	<i>neg</i>	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	TNBC
Muestra 3	42.84	37.78	31.22	37.44	pos	<i>neg</i>	<i>neg</i>	pos	HER2+
Muestra 4	38.78	39.56	37.97	37.73	<i>neg</i>	pos	pos	pos	LumB
Muestra 5	41.17	37.79	35.18	34.13	pos	<i>neg</i>	pos	<i>neg</i>	HER2+
Muestra 6	39.16	40.36	40.01	33.96	<i>neg</i>	pos	pos	<i>neg</i>	LumA

5

Solo se pueden observar ligeras diferencias de los resultados entre diferentes lotes de reactivos. El rendimiento del ensayo fue muy robusto y reproducible para todos los marcadores. Las tablas 5 a 7 muestran los valores 40- $\Delta\Delta$ CT y el resultado

positivo o negativo para cada marcador y la traducción al subtipo respectivo como se define en la Tabla 4 (véase también la Tabla 2). Los resultados del marcador (pos/neg) y los subtipos fueron consistentes para las 6 muestras medidas con tres lotes de reactivos diferentes.

Ejemplo 4: Comparación de la subtipificación del cáncer de mama por RT-qPCR e IHC en términos del resultado clínico

- 5 Las Figuras 10 a 19 representan las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para diferentes subtipos de tumores (luminal B, HER2-positivo, luminal A y cáncer de mama triple negativo [TNBC]) tratados con diferentes agentes de quimioterapia (docetaxel o vinorelbina). Los subtipos definidos por RT-qPCR según la presente invención se muestran en el panel A, mientras que los subtipos definidos por IHC se muestran en el panel B. Las líneas punteadas marcan el punto temporal de 5 años para los cálculos de resultado.
- 10 Los datos presentados en las Figuras 10 a 19 resaltan colectivamente la superioridad de la nueva clasificación de cáncer de mama con base en ARN por RT-qPCR en comparación con la IHC convencional con base en proteínas. Los datos indican un beneficio significativo del tratamiento con docetaxel para tumores luminal B. En contraste, la subtipificación con base en IHC no mostró un beneficio significativo en ningún subtipo con algunas tendencias en pacientes con cáncer de mama luminal A, luminal B y triple negativo. Sin embargo, dado que estos 3 subtipos comprenden -80% de todos los
- 15 pacientes, la subtipificación con base en IHC no proporcionó ninguna información predictiva clínicamente útil.

De manera importante, los pacientes definidos con RT-qPCR con tumores luminal B derivan un beneficio estadísticamente significativo y exclusivo de docetaxel en comparación con vinorelbina tras el tratamiento combinado con fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida (FEC). Estos pacientes permanecen libres de metástasis y viven significativamente más tiempo cuando reciben tratamiento con docetaxel, mientras que su resultado es claramente peor cuando reciben vinorelbina. Esta diferencia en el resultado entre los dos regímenes quimioterapéuticos no se observa en ningún otro subtipo, excepto en el luminal B. Curiosamente, el docetaxel parece ser incluso inferior a la vinorelbina para los tumores luminal A. Aunque este efecto no alcanza significado estadístico, excluye claramente un posible efecto beneficioso del tratamiento con docetaxel en pacientes con luminal A como se ve en pacientes con luminal B identificados por RT-qPCR.

Por el contrario, cuando los pacientes son subtipificados por IHC, el efecto ejercido sobre el resultado clínico por el tipo de régimen es equívoco, debido a una clasificación inexacta. Esto a su vez genera una variedad de tendencias no concluyentes en las que no se puede confiar para la toma de decisiones clínicas. En conclusión, la presente invención identifica indiscutiblemente un grupo específico de pacientes con cáncer de mama que responden favorablemente a docetaxel pero no a vinorelbina, mostrando así el poder predictivo para los tumores luminal B en este entorno particular. Esta es una propiedad muy importante para un ensayo de diagnóstico, dado que, como se mostró en el ensayo clínico FinHER, docetaxel se asocia más comúnmente con efectos adversos que vinorelbina, un hecho que requirió una reducción de la dosis inicial programada.

Por lo tanto, la presente invención se puede usar para ayudar en la asignación adecuada de tratamientos en cáncer de mama. En particular, como se muestra por primera vez en el contexto de un ensayo clínico aleatorizado, la subtipificación del cáncer de mama mediante RT-qPCR permite limitar los regímenes que contienen docetaxel a los pacientes que tienen tumores luminal B, que responden mejor al tratamiento con docetaxel, y considerar quimioterapéuticos alternativos para

35 pacientes con otros subtipos de tumores.

Ejemplo 5: Comparación de RT-qPCR y tinción IHC convencional en términos de su sensibilidad hacia Ki67

Un número considerable de casos (16.58%) son Ki67 negativos por IHC, pero son Ki67 positivos por RT-qPCR. Esto demuestra la mayor sensibilidad y robustez de la determinación de ARNm por la presente invención en comparación con la evaluación con base en proteínas de la técnica anterior. En parte, esto puede deberse a múltiples limitaciones técnicas del método basado en IHC (por ejemplo, falta de preservación de proteínas debido a problemas de fijación y/o recuperación de antígenos, tiempo de análisis después del corte de tejido, etc.) o manchas de problemas de interpretación (por ejemplo, interpretación de manchas de núcleo débiles).

Debido a la mayor sensibilidad de la evaluación con base en ARN de Ki67 por RT-qPCR, la concordancia con la evaluación IHC de Ki67 es solo moderada (véase Figura 20 A, C). Además, esto da como resultado un NPA bajo para la presente invención (53.82%), cuando se usa la evaluación de IHC local como método de referencia (Figura 20 D). Por el contrario, el PPA es alto, ya que RT-qPCR identifica la mayoría de los casos positivos de IHC (94.2%). En conclusión, ambos métodos se correlacionan significativamente ( $p < 0.0001$ ), pero solo son moderadamente concordantes.

La Tabla 8 es una tabla de contingencia que muestra interrelaciones entre subtipos basados en RT-qPCR y basados en IHC en la población de estudio FinHer, en donde N es el número de observaciones, % (célula) es la frecuencia total de las 16 combinaciones de subtipos potenciales, % (col.) es la distribución de los subtipos RT-qPCR dentro de los subtipos IHC, y % (fila) es la distribución de los subtipos IHC dentro de los subtipos definidos por la presente solicitud. Al establecer los subtipos de IHC como un "estándar de referencia", la concordancia es mayor para los TNBC (85.71%) y HER2-positivos (79.43%) y los más bajos para los tumores luminal A (65.38%) y luminal B (61.22%).

Tabulación cruzada de subtipo de material tumoral		Subtipo de material tumoral (RT-qPCR)																													
		HER2+						Luminal-A						Luminal-B						Triple Negativo						Total					
		N	% (célula)	% (col.)	% (fila)	% (célula)	% (col.)	N	% (célula)	% (col.)	% (fila)	N	% (célula)	% (col.)	% (fila)	N	% (célula)	% (col.)	% (fila)	N	% (célula)	% (col.)	% (fila)								
HER2+	139	19.41	79.43	85.28	5	0.70	3.21	3.07	12	1.68	4.08	7.36	7	0.98	7.69	4.29	163	22.77	22.77	100.00	100.00										
Luminal-A	12	1.68	6.86	6.35	102	14.25	65.38	53.97	75	10.47	25.51	39.68	0	0.00	0.00	0.00	169	26.40	26.40	100.00	100.00										
Luminal-B	17	2.37	9.71	6.77	48	6.70	30.77	19.12	180	25.14	61.22	71.71	6	0.84	6.59	2.39	251	35.06	35.06	100.00	100.00										
Triple Negativo	7	0.98	4.00	6.19	1	0.14	0.64	0.88	27	3.77	9.18	23.89	78	10.69	85.71	69.03	113	15.78	15.78	100.00	100.00										
Total	175	24.44	100.00	24.44	156	21.79	100.00	21.79	294	41.06	100.00	41.06	91	12.71	100.00	12.71	716	100.00	100.00	100.00	100.00										

Tabla 8. Interrelaciones entre subtipos con base en RT-qPCR y con base en ICH en la población del estudio FinHer.

Ejemplo 6: La subtipificación con base en RT-qPCR y IHC principalmente difiere en la evaluación de luminal B

La mayor sensibilidad de la evaluación con base en RT-qPCR de Ki67 da como resultado una diferencia sustancial en la determinación de pacientes luminal A y luminal B, en comparación con la evaluación con base en IHC, mientras se usa el mismo algoritmo para combinar ESR1, PGR, HER2 y Ki67 para subtipificación.

- 5 De los 189 pacientes con cáncer de mama que se clasificaron como luminal A por los métodos de IHC, solo 53.97% también se clasificaron como luminal A por RT-qPCR, mientras que 39.68% resultaron ser pacientes luminal B. Por el contrario, solo el 6.35% se reclasificó como HER2-positivo y el 0% resultó ser triple negativo. Además, de los 251 pacientes que se clasificaron como luminal B por los métodos de IHC, 71.71% también se clasificaron como luminal B por RT-qPCR, mientras que 19.12% resultaron ser pacientes luminal A. Por el contrario, el 6.77% se reclasificó como HER2-positivo y el 2.39% resultó ser triple negativo. Por el contrario, solo el 61.22% de los tumores que fueron clasificados como luminal B por RT-qPCR también fueron clasificados por IHC convencional como luminal B.

Estos datos ilustran la modesta concordancia observada entre los dos ensayos para determinar tumores luminal B sensibles a docetaxel, que está causada principalmente por la sensibilidad y/o robustez limitadas de la evaluación semicuantitativa de Ki67 por IHC.

- 15 Ejemplo 7: Ki67 alta determinada por RT-qPCR, pero Ki67 baja determinada por IHC se asocia con un mayor riesgo de metástasis distante

La metodología de la presente invención demuestra tener un poder discriminatorio adicional cuando se considera una población que comprende solo casos ER-positivos como se determina por IHC. En este caso, se encontró que Ki67 era discordante entre los ensayos basados en IHC y RT-qPCR. Como la determinación de Ki67 por RT-qPCR e IHC fue concordante en 514 de los 686 conjuntos de datos disponibles (74.92%), el número de muestras para demostrar la superioridad de la evaluación con base en ARNm es limitado (n = 172).

- 20 Sin embargo, a pesar del pequeño número de muestras, la positividad de Ki67 por RT-qPCR indica un mayor riesgo de desarrollar metástasis distante en casos discordantes. Como se muestra en la Figura 21 A, a los 5 años de seguimiento, el 5% de los pacientes ER-positivos con baja expresión de ARNm Ki67 desarrollaron metástasis distante, mientras que el 15% de los pacientes con expresión de ARNm elevado Ki67 sufrieron metástasis distante (HR 3.315). Esta tendencia no se vio afectada por el análisis multivariado (Figura 21 B).

Esto demuestra que la mayor sensibilidad con respecto a la evaluación de Ki67 de la metodología de la presente invención proporciona información de pronóstico adicional en comparación con la tinción con IHC convencional.

Listado de secuencias

- 30 <110> Theracode GmbH

Stratifyer Molecular Pathology GmbH

<120> Métodos y kits para la subtipificación molecular de tumores

<130> 674-116PCT

<160> 21

- 35 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

- 40 <220>

<223> ESR\_F

<400> 1

agaggggtgcc aggctttgt 19

<210> 2

<211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> ESR\_R  
 <400> 2  
 aggatctcta gccaggcaca tt 22  
 <210> 3  
 <211> 27  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> ESR\_P  
 <400> 3  
 15 ttgaccctc catgatcagg tccacct 27  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> HER2\_F  
 <400> 4  
 gaactcacct acctgcccac c 21  
 <210> 5  
 25 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> HER2\_R  
 30 <400> 5  
 gacctgcctc acttggtgt g 21  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>



<223> HER2\_P  
 <400> 6  
 ccaggagggtg cagggtacg tg      22  
 <210> 7  
 5 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> KI67\_F  
 10 <400> 7  
 cgagacgcct ggttactatc aa      22  
 <210> 8  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> KI67\_R  
 <400> 8  
 ggatacggat gtcacattca atacc      25  
 20 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> KI67\_P  
 <400> 9  
 acggtcccca cttcccctg agc      23  
 <210> 10  
 <211> 27  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> PGR\_F  
 <400> 10  
 35 aaacttcttg ataactgca tgatctt      27  
 <210> 11

<211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <223> PGR\_R  
 <400> 11  
 caataacttc agacatcatt tctgg 25  
 <210> 12  
 <211> 30  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> PGR\_P  
 <400> 12  
 15 cgggactgga taaatgtatt caagcagtac 30  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 20 <220>  
 <223> RAC\_F  
 <400> 13  
 gaatgtcgg aatctgttg ag 22  
 <210> 14  
 25 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> RAC\_R  
 30 <400> 14  
 tcgccaactg gataaattgg a 21  
 <210> 15  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

<223> RAC\_P  
 <400> 15  
 actgagaatc tccaccggc gca 23  
 <210> 16  
 5 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> B2M\_F  
 10 <400> 16  
 gtatgcctgc cgtgtgaacc 20  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> B2M\_R  
 <400> 17  
 ggcattca aacctcatg at 22  
 20 <210> 18  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 25 <223> B2M\_P  
 <400> 18  
 agtgggatcg agacatgaa gcagc 25  
 <210> 19  
 <211> 19  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> CALM2\_F  
 <400> 19  
 35 aggaggcga ttagtccga 19  
 <210> 20

# ES 2 685 580 T3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> CALM2\_R

<400> 20

gctcttcagt cagttgtca 20

<210> 21

<211> 22

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CALM2\_P

<400> 21

15 tcgcgtctcg gaaaccgga gc 22

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para estratificar a un paciente con cáncer de mama para quimioterapia adyuvante, comprendiendo dicho método, como primera etapa, identificar un subtipo molecular de un tumor de mama, preferiblemente un tumor sólido, en el paciente con cáncer de mama y, como segunda etapa, decidir a favor o en contra de la quimioterapia adyuvante con base en el subtipo molecular,
- en donde el subtipo molecular se identifica usando un método *in vitro* que comprende las etapas de:
- (a) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2) en una muestra del tumor;
- (b) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor de estrógeno (ESR1) en una muestra del tumor;
- 10 (c) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del receptor de progesterona (PGR) en una muestra del tumor; y
- (d) determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN del antígeno de proliferación Ki-67 (Ki67) en una muestra del tumor,
- en donde la muestra es ARN extraído del tumor,
- 15 en donde el nivel de expresión del transcrito de ARN se determina mediante PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT),
- en donde no se determina el nivel de expresión del transcrito de ARN de un gen distinto de HER2, ESR1, PGR y Ki67 y, opcionalmente, uno o más genes de referencia,
- en donde el subtipo molecular se selecciona del grupo que comprende luminal A y luminal B, y
- 20 en donde, si el subtipo molecular es luminal B, se decide a favor de la quimioterapia adyuvante y, si el subtipo molecular es luminal A, se decide en contra de la quimioterapia adyuvante.
2. El método de la reivindicación 1, en donde determinar el nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 comprende determinar si el nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67 es menor o mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2, ESR1, PGR y Ki67.
- 25 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa (a) se realiza antes de las etapas (b), (c) y (d); y/o
- en donde la etapa (d) se realiza después de las etapas (a), (b) y (c); y/o
- donde la etapa (a) se realiza antes de la etapa (b), la etapa (b) se realiza antes de la etapa (c), y la etapa (c) se realiza antes de la etapa (d).
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde
- 30 - un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 35 - un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B; o
- 40 - un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y

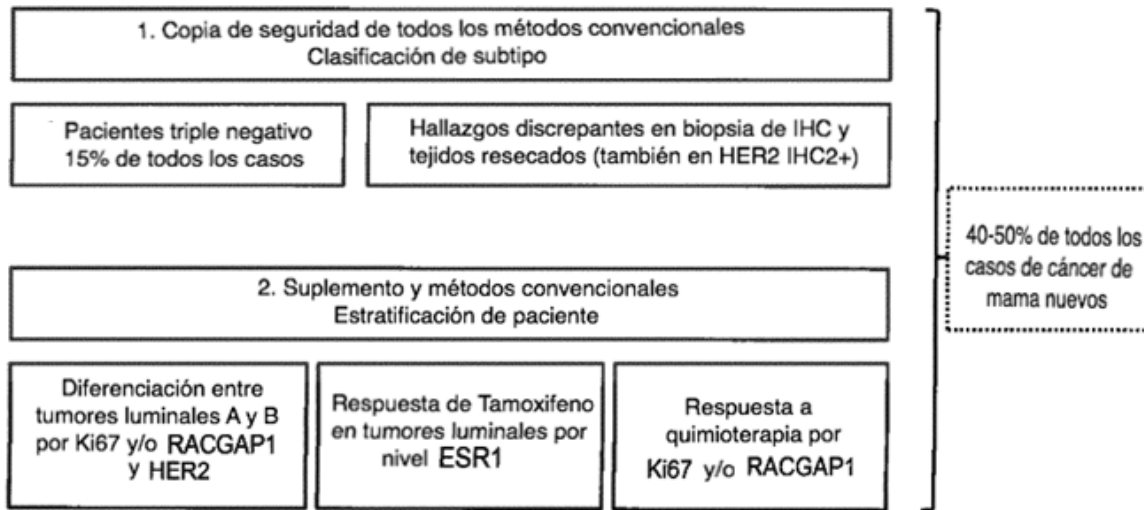
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal A; o
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
- 5
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
- 10
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es inferior o superior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B; o
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
- 15
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
- 20
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B; o
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
- 25
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- 30
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal A; o
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de HER2 que es menor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de HER2;
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de ESR1 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de ESR1;
- 35
- un nivel de expresión del transcrito de ARN de PGR que es inferior a un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de PGR; y
  - un nivel de expresión del transcrito de ARN de Ki67 que es mayor que un umbral de expresión definido de la transcripción de ARN de Ki67
- identifican el subtipo molecular del tumor como luminal B.
- 40
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el subtipo molecular luminal A se asocia con una probabilidad de supervivencia libre de recurrencia de distancia 5 años después del tratamiento que es al menos 11%, preferiblemente al menos 13% mayor que la probabilidad de supervivencia libre de recurrencia de distancia 5 años después del tratamiento asociado con subtipo molecular luminal B y/o con probabilidad de supervivencia 5 años después del tratamiento que es al menos 7%, preferiblemente al menos 9% mayor que la probabilidad de supervivencia 5 años
- 45
- después del tratamiento asociado con el subtipo molecular luminal B.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la PCR cuantitativa es PCR cuantitativa en tiempo real.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende el uso de cebadores específicos de ESR1 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 y 2, y/o cebadores específicos de HER2 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o cebadores específicos de Ki67 que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o cebadores específicos de PGR que tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y que comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11; y/o que comprende el uso de una sonda específica de ESR1 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o una sonda específica de HER2 que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de la SEQ ID NO: 6, y/o una sonda de Ki67 específico que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO : 9, y/o una sonda específica de PGR que tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y que comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 12.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el nivel de expresión se normaliza frente al nivel de expresión (media) de uno o más genes de referencia en la muestra del tumor, donde, preferiblemente, el uno o más genes de referencia son seleccionado del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la quimioterapia adyuvante comprende la administración de docetaxel.
10. Uso de un kit para estratificar a un paciente con cáncer de mama para la quimioterapia adyuvante de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende:
- al menos un par de cebadores específicos de HER2 y al menos una sonda específica de HER2;
  - al menos un par de cebadores específicos de ESR1 y al menos una sonda específica de ESR1;
  - al menos un par de cebadores específicos de PGR y al menos una sonda específica de PGR; y
  - al menos un par de cebadores específicos de Ki67 y al menos una sonda específica de Ki67.
11. El uso de la reivindicación 10, en donde el kit tiene una o más de las siguientes características:
- la PCR cuantitativa es PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia;
  - la detección de la sonda se basa en el desplazamiento de la sonda mediado por amplificación, en donde, preferiblemente, la sonda es una sonda de doble etiqueta que comprende una unidad estructural indicadora de fluorescencia y una unidad estructural atenuadora de fluorescencia;
  - comprende además una transcriptasa reversa y una ADN polimerasa, en donde, preferentemente, la transcriptasa reversa y la polimerasa se proporcionan en forma de una mezcla de enzimas que permite una PCR cuantitativa de transcripción reversa (RT) de una etapa;
  - comprende además al menos un par de cebadores específicos de genes de referencia y al menos una sonda específica de genes de referencia, en donde, preferiblemente, el gen de referencia es uno o más seleccionados del grupo que comprende CALM2, B2M, RPL37A, GUSB, HPRT1 y GAPDH;
  - comprende además al menos una muestra de ARN de control;
  - los cebadores proporcionan un tamaño de amplicón de menos de 120 pb;
  - los cebadores específicos de ESR1 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de las SEQ ID NO: 1 y 2, y/o en los que los cebadores específicos de HER2 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprende al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 4 y 5, y/o en donde los cebadores específicos de Ki67 tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 7 y 8, y/o en donde los cebadores específicos de PGR tienen una longitud de 15 a 30 nucleótidos y comprenden al menos 10 nucleótidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 10 y 11;
  - la sonda específica de ESR1 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 3, y/o en donde la sonda específica de HER2 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 6, y/o en donde la sonda específica para

## ES 2 685 580 T3

Ki67 tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 9, y/o en donde la sonda específica de PGR tiene una longitud de 20 a 35 nucleótidos y comprende al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia de SEQ ID NO: 12.





**Figura 1**

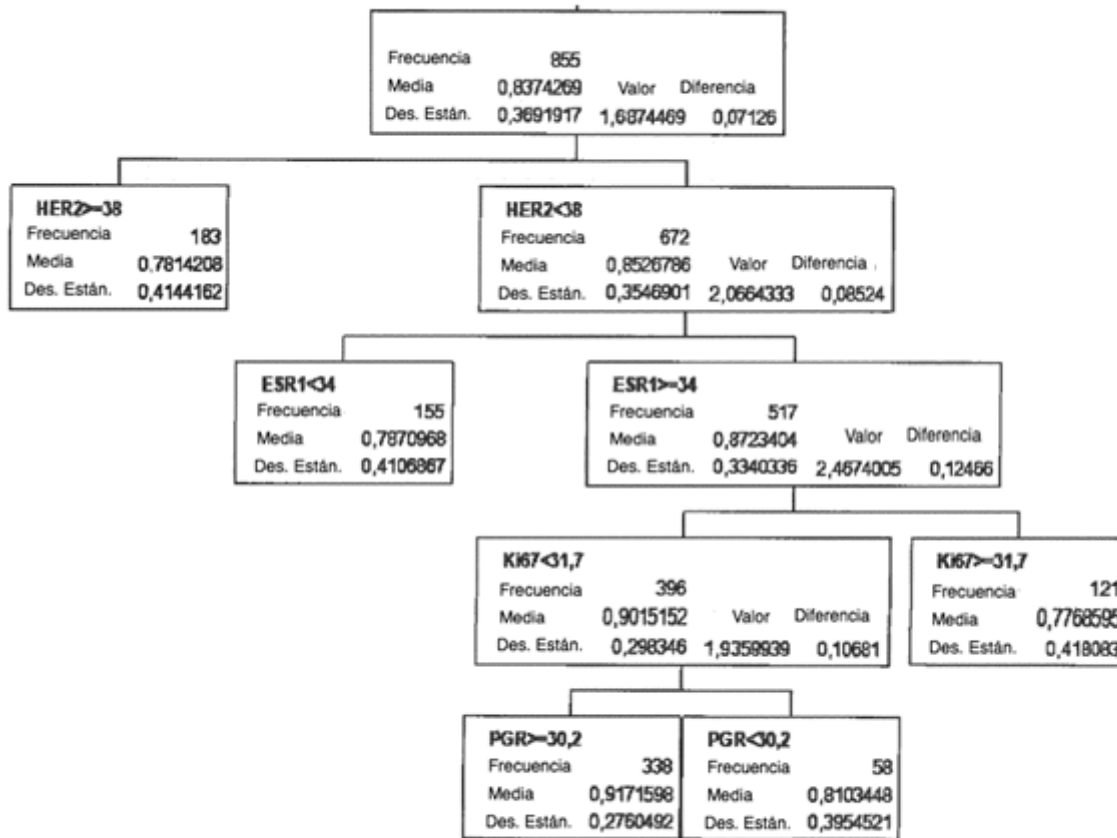


Figura 2 A

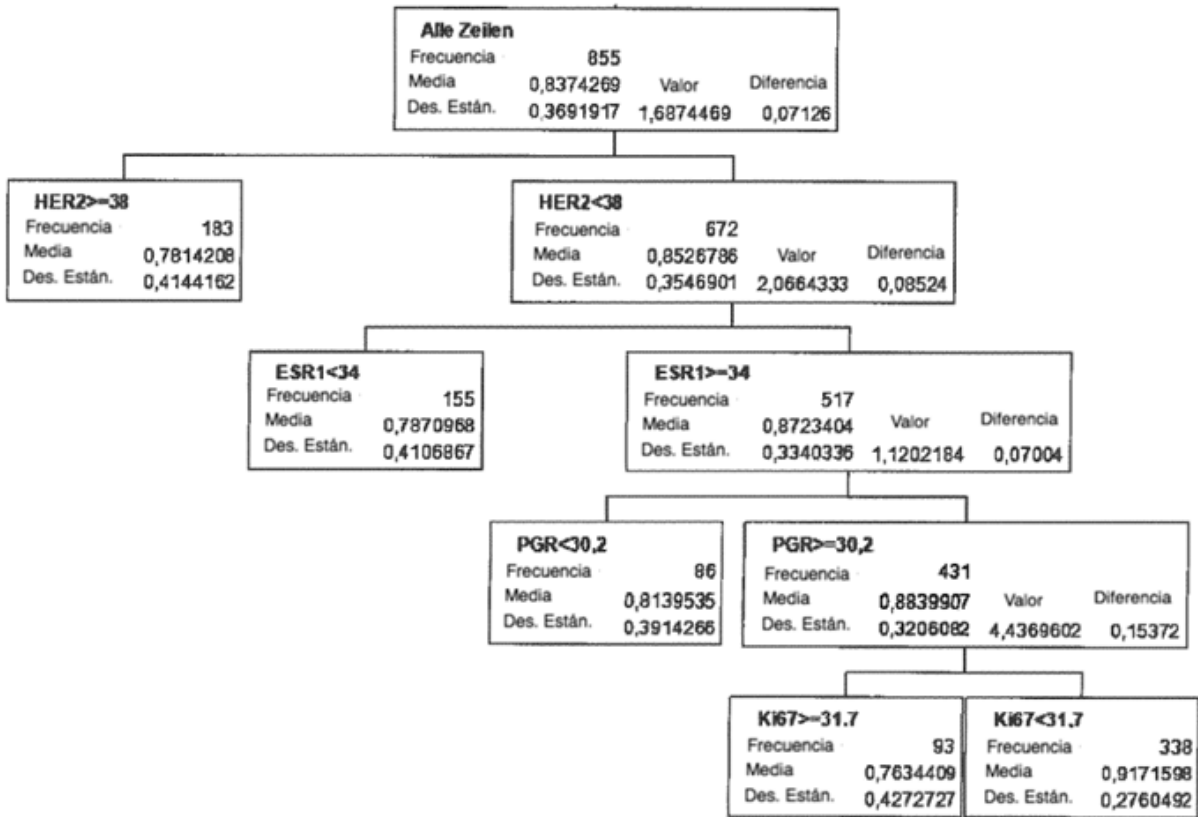


Figura 2 B

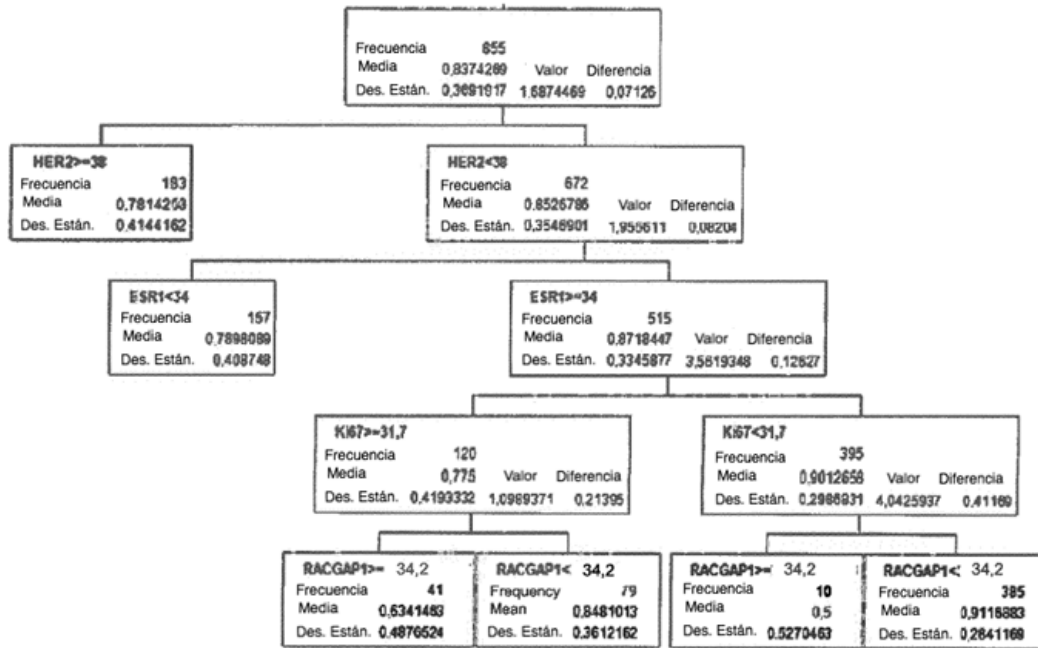
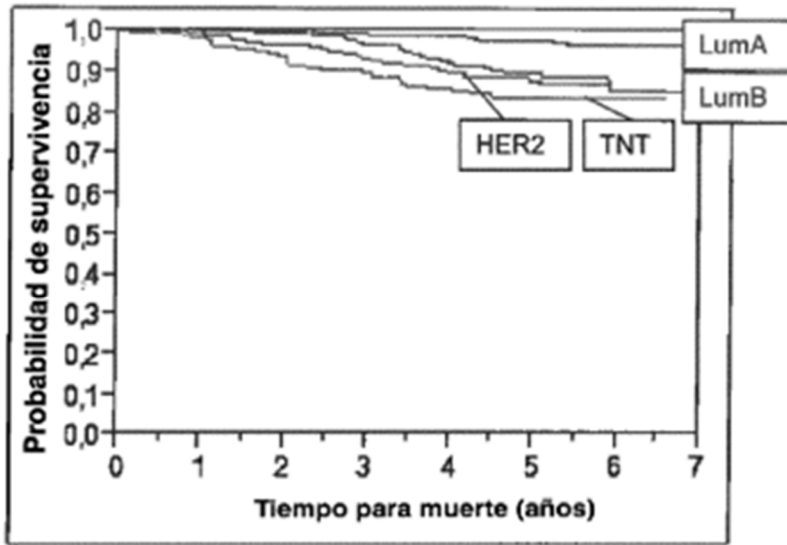
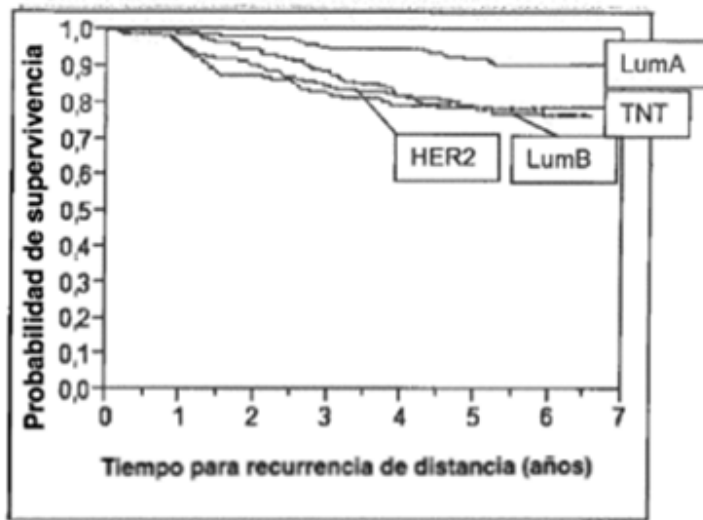


Figura 2 C



Tiempo para el evento: Tiempo para muerte (años)  
Censurado con muerte  
Código de censura 1  
Grupo basado en el nivel de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y KI67

Figura 3



Tiempo para el evento: Tiempo para recurrencia de distancia (años)  
Censurado con recurrencia de distancia  
Código de censura 1  
Grupo basado en el nivel de expresión de ARNm de HER2, ESR1, PGR y KI67

**Figura 4**

Ajuste de peligros proporcionales				
Consurado por: Recurrencia a distancia				
Modelo entero				
Número de eventos		139		
Número de censurando		715		
Número total		854		
Modelo	-log de probabilidad	Chi cuadrado	Grado de libertad	Probabilidad > Chi cuadrado
Diferencia	25.9924	51.9847	8	<0.001*
Completo	890.7213			
Reducido	916.7136			
Estimaciones de parámetros				
Término	Estimaciones	Error estín.	Menor confianza del 95%	Mayor confianza del 95%
ICH Subtipo HER2 (Sordani et al.)	0.130	0.182	-0.236	0.478
ICH Subtipo LumA (Sordani et al.)	-0.440	0.173	-0.787	-0.106
ICH Subtipo LumB (Sordani et al.)	0.126	0.184	-0.247	0.476
Presente invención Subtipo HER2	0.131	0.193	-0.247	0.510
Presente invención Subtipo LumA	-0.559	0.184	-0.991	-0.206
Presente invención Subtipo LumB	0.274	0.159	-0.046	0.590
p2 (Tamaño del tumor)	0.357	0.118	0.120	0.584
pN (Estado nodal)	0.246	0.082	0.056	0.385
Pruebas de proporción de probabilidad de efecto				
Fuente	Número de parámetros	Grado de libertad	L-R Chi cuadrado	Probabilidad > Chi cuadrado
ICH (Sordani et al.)	3	3	6.839	0.077
Presente invención	3	3	11.793	0.008*
p2 (Tamaño del tumor)	1	1	8.537	0.004*
pN (Estado nodal)	1	1	5.940	0.015*

Figura 5

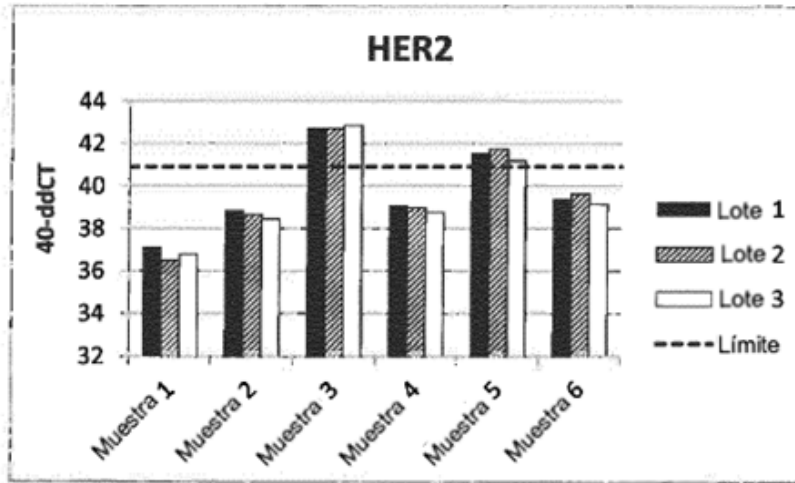


Figura 6



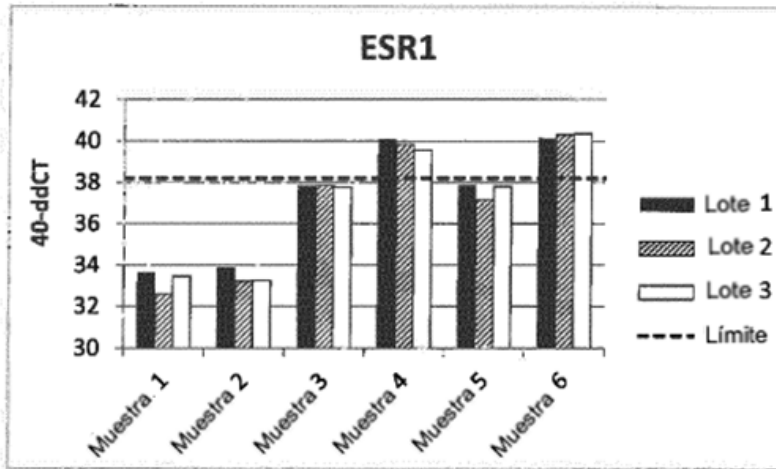


Figura 7

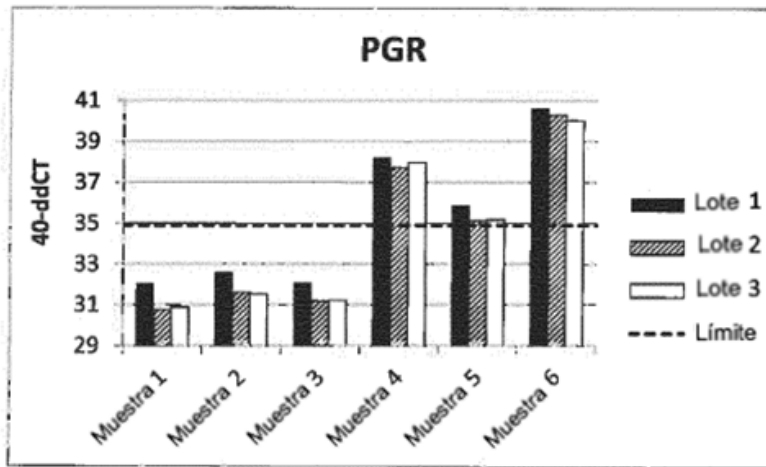
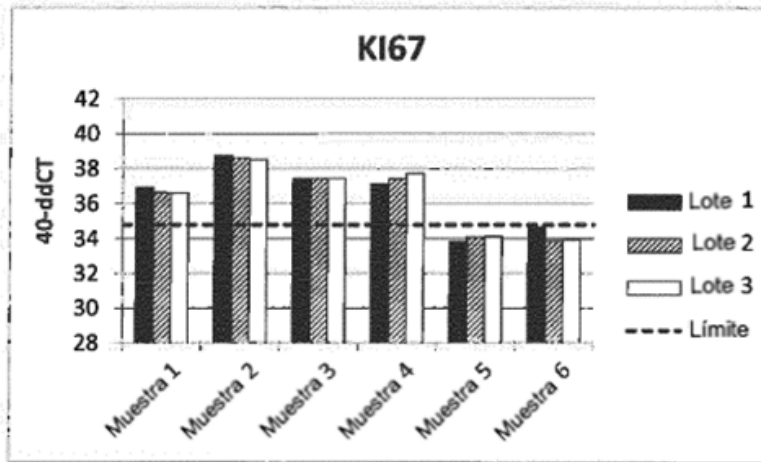


Figura 8



**Figura 9**

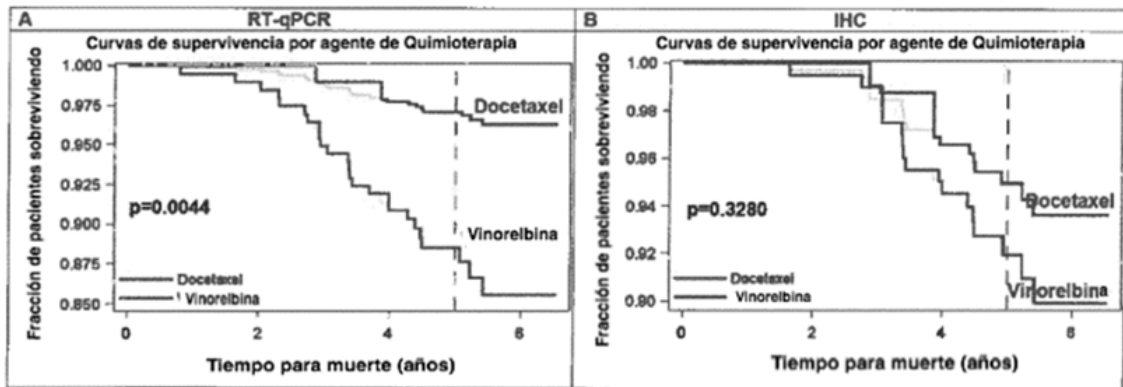


Figura 10

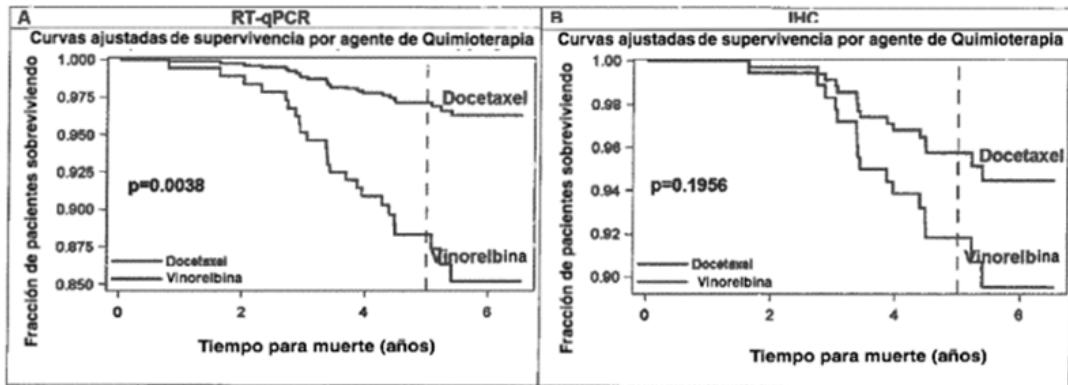


Figura 11

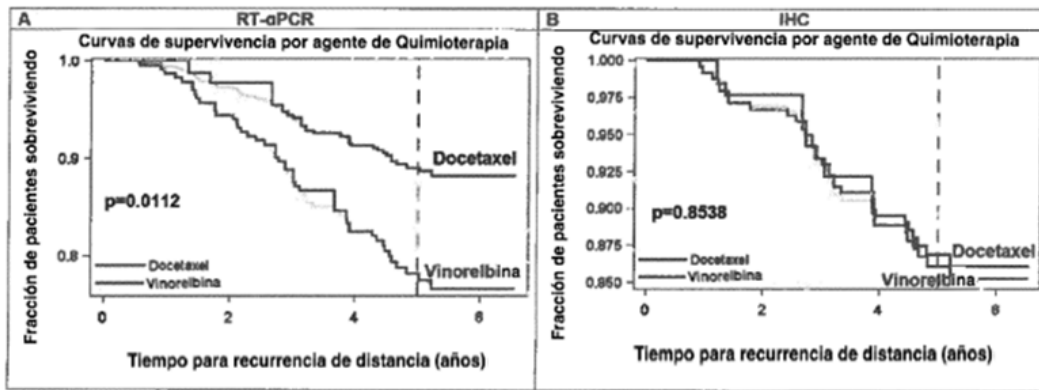


Figura 12

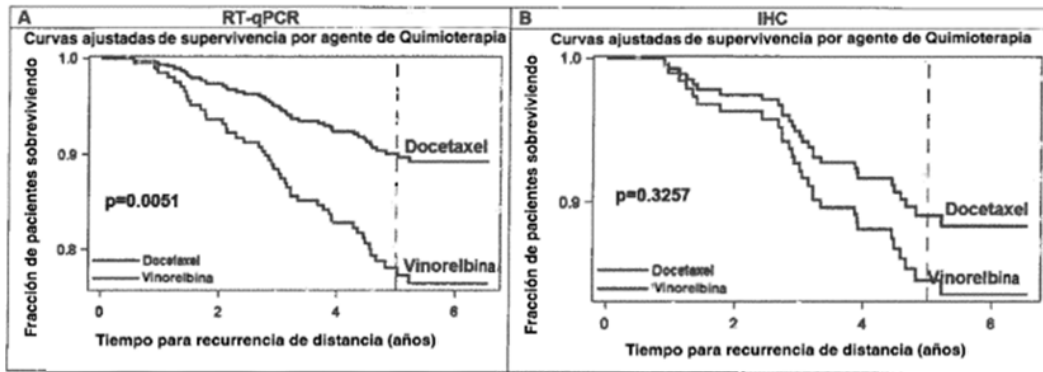


Figura 13

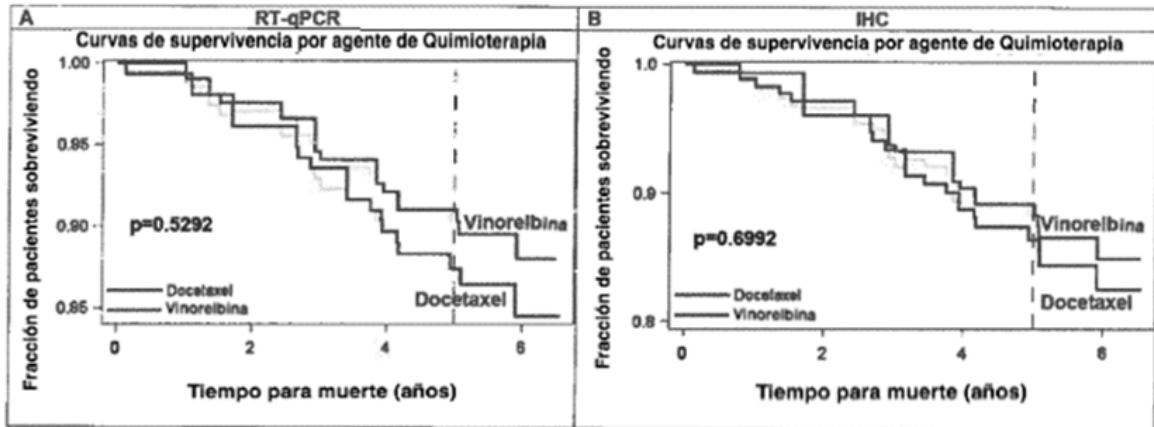


Figura 14



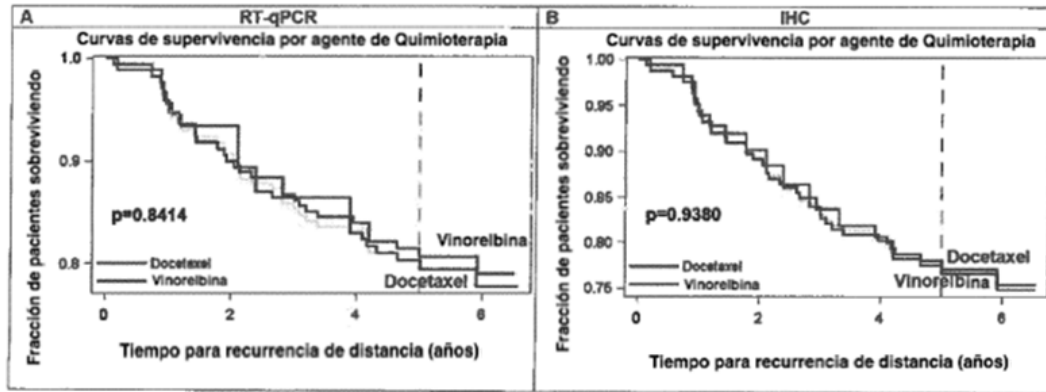


Figura 15

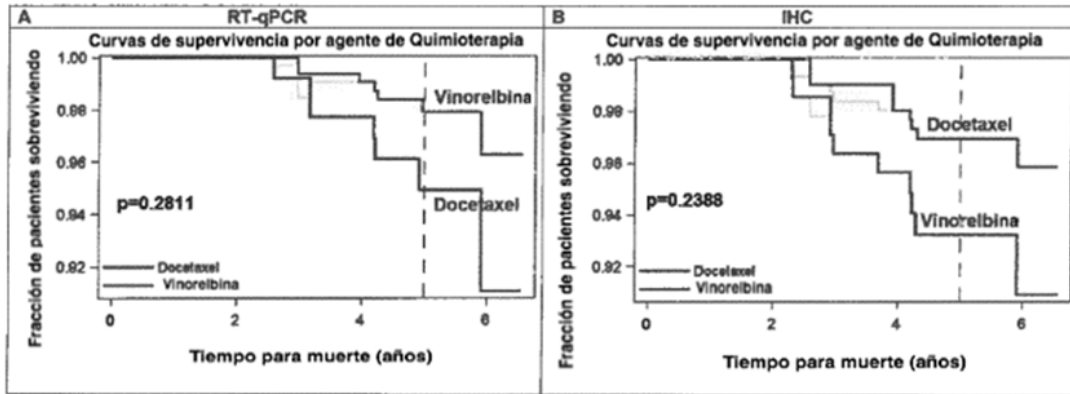


Figura 16

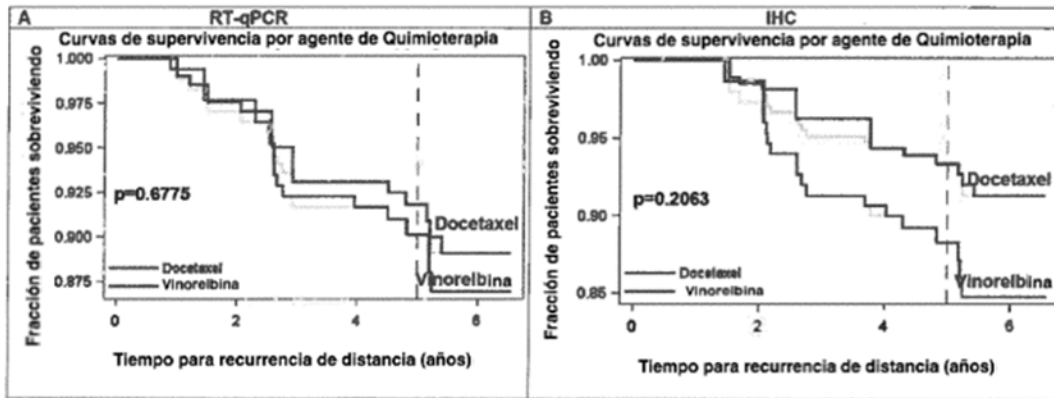


Figura 17

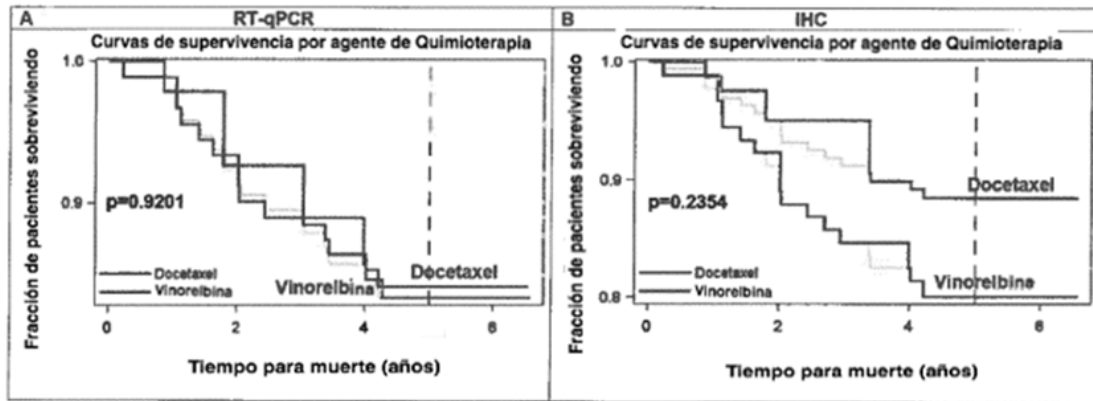


Figura 18

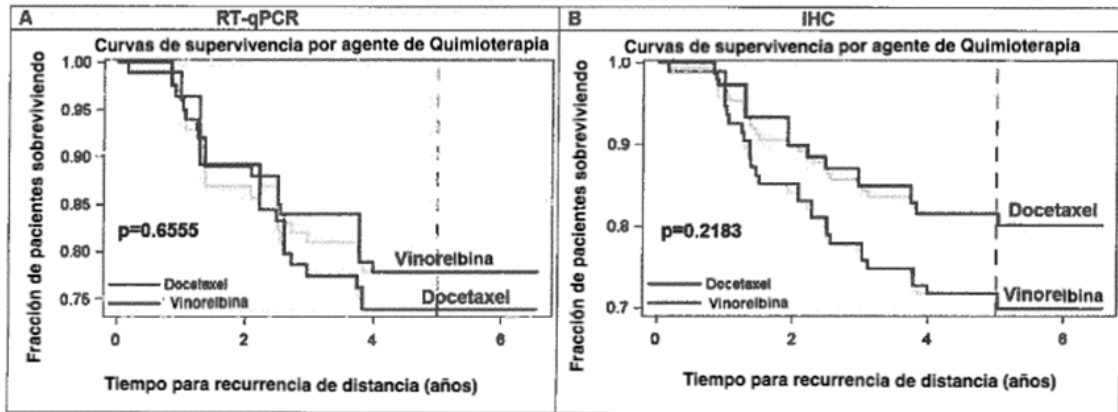


Figura 19

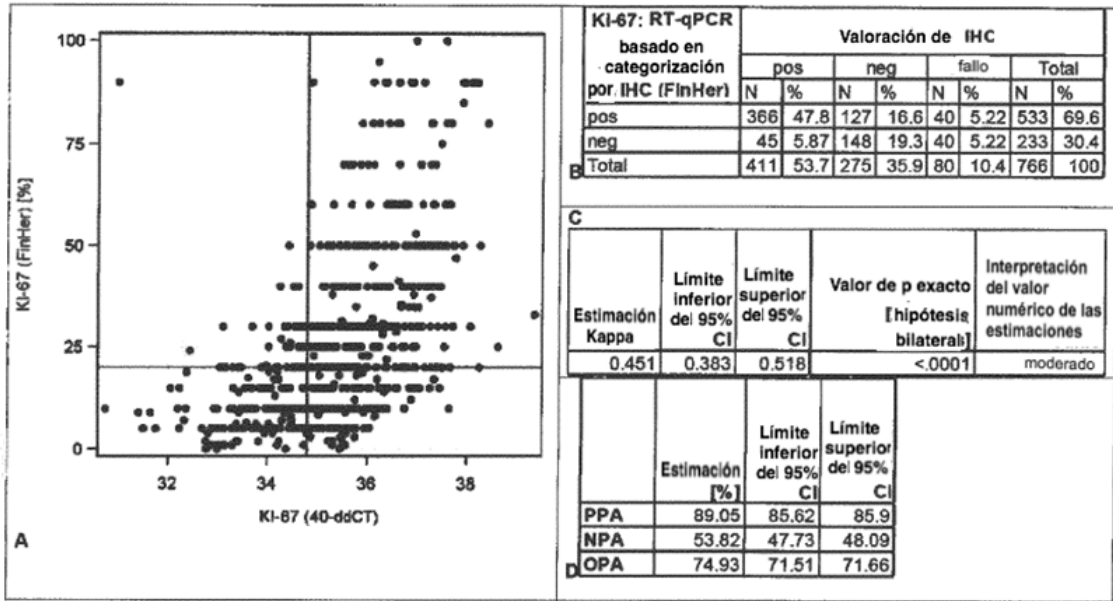


Figura 20

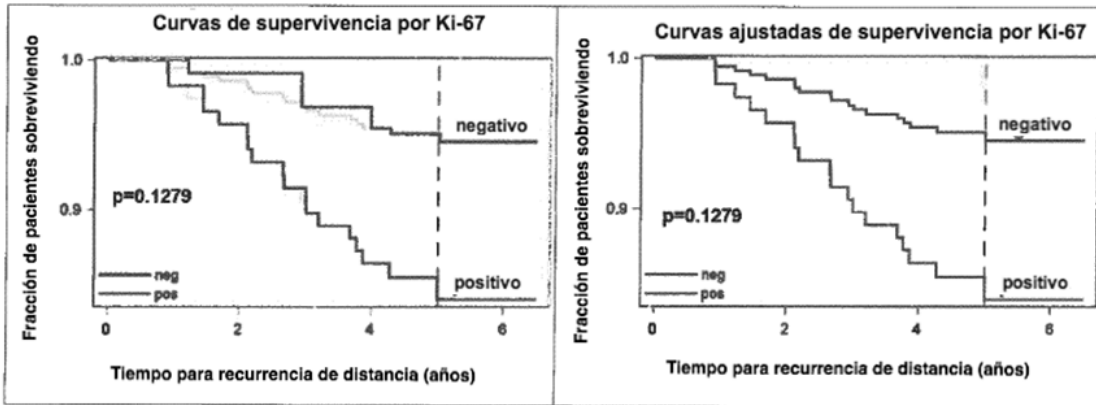


Figura 21