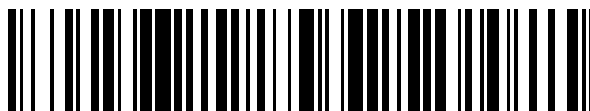


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 974**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2014** **PCT/EP2014/050144**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014** **WO14108397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2014** **E 14700091 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018** **EP 2943792**

54 Título: **Método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama o diagnosticar cáncer en un sujeto femenino**

30 Prioridad:

08.01.2013 EP 13150564

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

29.04.2019

73 Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 15a
16761 Hennigsdorf, DE

72 Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 710 974 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

Método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama o diagnosticar cáncer en un sujeto femenino.

5 El objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino que no padece cáncer que comprende:

▪ determinar el nivel de protaquicininina que es SEC ID nº 1, o protaquicininina 1-37 que es SEC ID nº 2 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y

10 ▪ correlacionar dicho nivel de protaquicininina que es SEC ID nº 1, o protaquicininina 1-37 que es SEC ID nº 2 con un riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama, en el que un nivel reducido significa un nivel por debajo de un determinado nivel umbral y en el que el fluido corporal es sangre o plasma o suero.

15 La sustancia P (SP) es un neuropéptido: un undecapéptido que funciona como neurotransmisor y como neuromodulador. Pertenece a la familia de neuropéptidos de taquicininina. La sustancia P y su neuropéptido estrechamente relacionado neurocinina A (NKA) se producen a partir de un precursor de poliproteína tras el corte y empalme diferencial del gen de preprotaquicininina A. En el SNC, la sustancia P participa en el sistema de transmisión del dolor.

20 La sustancia P desempeña papeles en procesos inflamatorios (Ang *et al.*, 2011) y presenta actividad antiapoptótica en células cancerosas (Munoz *et al.*, 2005).

25 El receptor de sustancia P (receptor de neurocinina1) desempeña un papel crucial en el desarrollo de cáncer (Fries *et al.*, 2003; Munoz *et al.*, 2010; Rameshwar, 2007; Schulz *et al.*, 2006). El bloqueo de la ruta de sustancia P reducía notablemente el crecimiento de células tumorales *in vitro* (para una revisión véase Munoz y Rossow, 2009).

30 Se ha informado de la utilización de péptidos vasoactivos para la predicción de los riesgos de cáncer en varones por Belting *et al.*, Cancer, Epidemiology, Biomarkes & Prevention. Se midieron MR-pro-ANP, MR-pro-ADM y copeptina en el plasma en ayunas de los participantes del estudio Malmö Diet and Cancer que no tenían cáncer antes del examen inicial en de 1991 a 1994 (1768 varones y 2293 mujeres). Los autores establecieron que, entre las mujeres, no había relación entre los biomarcadores y la incidencia de cáncer.

35 El documento WO 2005/103712 da a conocer la utilización de precursores de taquicinininas y/o los fragmentos en diagnóstico médico. No existe ninguna divulgación de un método para la predicción del riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto débil.

40 Turner *et al.* (Gut 2006; 55:1586-1591) dan a conocer marcadores circulantes de pronóstico y respuesta al tratamiento en pacientes con tumores carcinoides del intestino medio.

45 Ardill, J. y Eriksson, B. (Endocrine-Related Cancer (2003) 10 459-462) informan de la importancia de las mediciones de marcadores circulantes en pacientes con tumores neuroendocrinos del páncreas y el intestino.

Reddy, B, *et al.*, (Current Drug Discovery Technologies, 2008, 5, 15-19) informan de los receptores de neurocinina como posibles dianas en el tratamiento de cáncer de mama.

50 Khan, I. y Beck-Sickinger (Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry; 2008, 8, 186-199) informan del diagnóstico y la terapia tumorales dirigidos con hormonas peptídicas como productos radiofarmacéuticos.

Alumets, J. *et al.*, (Ultrastructural Pathology, 5: 55-72, 1983 dan a conocer péptidos neurohormonales en tumores de punto final del páncreas, el estómago y el intestino delgado superior en un estudio inmunohistoquímico de 27 casos.

55 Nesland, J. *et al.*, (Anticancer Res. 11: 161-168 (1991)) dan a conocer un estudio de proteína C-erbB-2 y expresión neuroendocrina y carcinomas de mama.

60 Un objetivo de la presente invención es investigar la potencia de pronóstico de protaquicininina para la predicción del riesgo de contraer cáncer de mama y la predicción del riesgo de reaparición de cáncer en un sujeto femenino que no padece cáncer. Para abordar esta cuestión, se midieron fragmentos estables de protaquicininina (Ernst *et al.*, 2008) en plasma en ayunas en dicho estudio de cohorte prospectivo sueco (estudio Malmö Diet and Cancer) y el nivel inicial relacionado de este biomarcador para la incidencia de cáncer de mama durante 15 años de seguimiento.

65 Sorprendentemente, se ha mostrado que la protaquicininina es un biomarcador poderoso y altamente significativo

para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto que no padece cáncer o alternativamente diagnosticar cáncer en un sujeto.

Por tanto, el objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino que no padece cáncer que comprende:

- determinar el nivel de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y

- correlacionar dicho nivel de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 con un riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama, en el que un nivel reducido significa un nivel por debajo de un determinado nivel umbral y en el que el fluido corporal es sangre o plasma o suero.

En otro objeto de la invención dicho método comprende adicionalmente las siguientes etapas: determinar adicionalmente el nivel de proneurotensina que es SEC ID nº 14 o proneurotensina 1-117 que es SEC ID nº 18 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y

- correlacionar adicionalmente dicho nivel de proneurotensina o proneurotensina 1-117 con un riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel incrementado de proneurotensina es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

Según otra forma de realización de la invención, los métodos anteriores pueden comprender adicionalmente las siguientes etapas:

- determinar adicionalmente el nivel de proencefalina que es SEC ID nº 23 o MRPENK que es SEC ID nº 28 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y

- correlacionar adicionalmente la proencefalina o MRPENK con un riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido de proencefalina o MRPENK es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

Según otra forma de realización de la invención, los métodos anteriores pueden comprender adicionalmente las siguientes etapas:

- determinar adicionalmente el nivel de insulina en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y
- correlacionar adicionalmente dicho nivel de insulina con un riesgo de contraer cáncer de mama, en el que un nivel reducido de insulina es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

Por tanto, los métodos según la presente invención comprenden la determinación del nivel de protaquicinina, protaquicinina 1-37, en un fluido corporal y pueden comprender además opcionalmente al menos una determinación adicional y correlación adicional con el riesgo de cáncer seleccionada de entre el grupo que comprende:

- determinación del nivel de proneurotensina o proneurotensina 1-117 y
- determinación del nivel de proencefalina o ácidos MRPENK y
- determinación del nivel de insulina.

En una forma de realización de la invención, por lo menos uno de los biomarcadores adicionales mencionados anteriormente se determina adicionalmente y correlaciona adicionalmente con dicho riesgo de cáncer de mama además de protaquicinina o protaquicinina 1-37. En una forma de realización de la invención, por lo menos dos de los biomarcadores adicionales mencionados anteriormente se determinan adicionalmente y correlacionan adicionalmente con dicho riesgo además de protaquicinina o protaquicinina 1-37. En una forma de realización, se determinan los cuatro biomarcadores anteriores.

En una forma de realización específica de los métodos anteriores en los que se determinan además protaquicinina o protaquicinina 1-37 se determinan unos biomarcadores adicionales y se correlacionan con dicho riesgo, "que se correlacionan adicionalmente" significa un análisis combinado de los niveles de biomarcador determinados teniendo en cuenta los factores de riesgo relativos para el desarrollo de cáncer obtenidos mediante los biomarcadores individuales.

El análisis combinado de más de un marcador es un ejemplo explicado en el ejemplo 5. El experto en la materia conoce los métodos estadísticos que pueden realizar el análisis combinado de más de un marcador o parámetro.

En una forma de realización de los métodos anteriores, un nivel reducido de protaquicinina taquicinina o

protaquicinina 1-37 es un nivel por debajo de un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de o inferior a 100 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 80 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 60 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 50 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 45.6 pmol/l, preferentemente aproximadamente de 40 pmol/l

En una forma de realización de los métodos anteriores, un nivel incrementado de proneurotensina o proneurotensina 1-117 es un nivel por encima de un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de o superior a 78 pmol/l de PNT, preferido aproximadamente de o superior a 100 pmol/l, más preferido aproximadamente de 150 pmol/l.

En una forma de realización de los métodos anteriores, un nivel reducido de proencefalina o MRPENK es un nivel por debajo de un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de o inferior a 100 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 75 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 50 pmol/l, preferentemente aproximadamente de 40.4 pmol/l.

En una forma de realización de los métodos anteriores, un nivel reducido de insulina es un nivel por debajo de un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de 70 pmol/l.

Los umbrales han de considerarse a partir del método de calibración utilizado y los valores anteriores han de considerarse a partir de los ensayos y los métodos de calibración utilizados en los presentes ejemplos 1, 3 y 4.

En las formas de realización de la presente invención, dicho sujeto es femenino y dicho cáncer es cáncer de mama.

A lo largo de toda la memoria descriptiva el término protaquicinina y protaquicinina A (PTA) se utilizan de manera sinónima. El término incluye protaquicinina 1-37.

Determinar el nivel de protaquicinina o protaquicinina 1-37 significa que se determina habitualmente la inmunorreactividad hacia una región dentro de las moléculas mencionadas anteriormente. Esto significa que no es necesario que se mida selectivamente un determinado fragmento. Se entiende que un agente de unión que se utiliza para la determinación del nivel de protaquicinina o protaquicinina 1-37 se une a cualquier fragmento que comprende la región de unión de dicho agente de unión. Dicho agente de unión puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un armazón distinto de IgG.

Por tanto, el objetivo de la presente invención es en una forma de realización determinar la susceptibilidad de una mujer a desarrollar cáncer de mama.

Los datos obtenidos en el estudio Malmö revelaron una correlación entre el riesgo de contraer cáncer en sujetos masculinos con el nivel de protaquicinina, sus variantes de corte y empalme o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto masculino; sin embargo, esta correlación no era estadísticamente significativa para el presente conjunto de datos aunque existe una clara tendencia hacia un riesgo de cáncer incrementado a niveles reducidos de protaquicinina, sus variantes de corte y empalme o fragmentos de la misma también en varones. Por tanto, el método según la invención presenta valor también para sujetos masculinos, pero en el presente estudio el efecto observado no fue tan fuerte para varones en comparación con mujeres. Esto puede deberse principalmente al bajo número de casos de cáncer en la población masculina.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un sujeto humano femenino.

El término "nivel reducido" significa un nivel por debajo de un determinado nivel umbral. El término "nivel incrementado" significa un nivel por encima de un determinado umbral. Un fluido corporal puede seleccionarse de entre el grupo que comprende sangre, suero o plasma.

En una forma de realización de la invención a dicho sujeto nunca se le ha diagnosticado cáncer en el momento en que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto.

En otra forma de realización a dicho sujeto se le ha diagnosticado anteriormente que presenta cáncer y se ha curado en el momento en el que se toma la muestra de fluido corporal de dicho sujeto y se determina el riesgo de volver a contraer cáncer o alternativamente se predice la reaparición del cáncer.

La protaquicinina puede presentar la(s) siguiente(s) secuencia(s):

SEC ID nº 1 (protaquicinina A (1-107))

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSIE
KQVALLKALYGHGQISHKRHKTDTSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR

Un fragmento de protaquicinina que puede determinarse en un fluido corporal es:

5 SEC ID nº 2 (protaquicinina 1-37, P37)

EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIA

También se dan a conocer en la presente memoria:

- 10 SEC ID nº 3 (sustancia P)
RPPKQQFFGLM(-NH₂)
- 15 SEC ID nº 4 (neuropéptido K)
DADSSIEKQVALLKALYGHGQISHKRHKTDTSFVGLM (-NH₂)
- 20 SEC ID nº 5 (neuropéptido gamma)
GHGQISHKRHKTDTSFVGLM (-NH₂)
- SEC ID nº 6 (neurocinina 1)
25 HKTDTSFVGLM(-NH₂)
- SEC ID nº 7 (péptido flanqueante C-terminal, PTA 1 92-107)
ALNSVAYERSAMQNYE
- 30 SEC ID nº 8 (isoforma de PTA alfa)
EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSIE
KQVALLKALYGHGQISHKMAYERSAMQNYERRR
- 35 SEC ID nº 9 (isoforma de PTA beta)
EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDADSSIE
KQVALLKALYGHGQISHKRHKTDTSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRR
- 40 SEC ID nº 10 (isoforma de PTA delta)
EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDAGHGQI
SHKMAYERSAMQNYERRR
- SEC ID nº 11 (isoforma de PTA gamma)
EEIGANDDLNYWSDWYDSDQIKEELPEPFEHLLQRIARRPKPQQFFGLMGKRDAGHGQI
45 SHKRHKTDTSFVGLMGKRALNSVAYERSAMQNYERRRSEQ
- SEC ID nº 12 (PTA3-22)
GANDDLNYWSDWYDSDQIK
- 50 SEC ID nº 13 (PTA 21-36)
IKEELPEPFEHLLQRI

55 Determinar el nivel de PTA o PTA 1-37 puede significar que se determina la inmunorreactividad hacia PTA o PTA

1-37. Un aglutinante utilizado para la determinación de PTA o PTA 1-37 dependiendo de la región de unión puede unirse a más de una de las moléculas presentadas anteriormente. Esto resulta evidente para un experto en la materia.

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de P37 (PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYSDQIKEELPEPFEHLLQRIA). En una forma de realización incluso más específica según la presente invención, se utilizan por lo menos uno o dos agentes de unión que se unen a PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYSDQIKEELPEPFEHLLQRIA, en el caso de más de un agente de unión se unen preferentemente a dos regiones diferentes dentro de PTA 1-37, SEC ID nº 2, EEIGANDDLNYWSDWYSDQIKEELPEPFEHLLQRIA. Dichos(s) agente(s) de unión pueden ser preferentemente un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo.

En una forma de realización incluso más específica se utiliza(n) agente(s) de unión para la determinación de PTA, sus variantes y fragmentos que se unen a una o ambas, respectivamente, de las siguientes regiones dentro de PTA 1-37:

GANDDLNYWSDWYSDQIK	PTA 3-22 (SEC ID nº 12)
IKEELPEPFEHLLQRI	PTA 21-36 (SEC ID nº 13)

En una forma de realización específica se mide el nivel de PTA o PTA 1-37 con un inmunoensayo utilizando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a PTA o PTA 1-37. Un inmunoensayo que puede ser útil para determinar el nivel de PTA o PTA 1-37 puede comprender las etapas tal como se explican resumidamente en el ejemplo 1. Todos los umbrales y valores tienen que considerarse en correlación con la prueba y la calibración utilizadas según el ejemplo 1. Un experto en la materia puede conocer que el valor absoluto de un umbral podría verse influido por la calibración utilizada. Esto significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria han de entenderse en el contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (ejemplo 1).

Según la invención el agente de unión de diagnóstico para PTA o los otros biomarcadores adicionales se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos por ejemplo IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpo que contienen al menos el dominio variable F de la cadena pesada y/o ligera como por ejemplo anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno) incluyendo pero sin limitarse a fragmentos Fab incluyendo minicuerpos de Fab, anticuerpo de Fab de cadena sencilla, anticuerpo de Fab monovalente con etiquetas de epítopo, por ejemplo Fab-V5Sx2; Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo formado por medio de multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo por medio de dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos scFv multimerizados multivalentes o/y multiespecíficos, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® ("*bispecific T cell engager*", acoplador de células T biespecífico), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo de una clase diferente de G; anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces.

En una forma de realización específica, el nivel de PTA o PTA 1-37 o los otros biomarcadores adicionales se mide con un ensayo utilizando agentes de unión seleccionados de entre el grupo que comprende aptámeros, armazones distintos de Ig tal como se describe con mayor detalle a continuación que se unen a PTA o PTA 1-37 o alternativamente a los biomarcadores adicionales.

El agente de unión que puede utilizarse para determinar el nivel de PTA o PTA 1-37 presenta una constante de afinidad para PTA o PTA 1-37 de por lo menos 10^7 M^{-1} , preferido de 10^8 M^{-1} , la constante de afinidad preferida es mayor de 10^9 M^{-1} , más preferentemente mayor de 10^{10} M^{-1} . Un experto en la materia sabe que puede considerarse compensar la afinidad menor aplicando una dosis superior de compuestos y esta medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método de Biacore, ofrecido como análisis de servicio por ejemplo en Biaffin, Kassel, Alemania (<http://www.biaffin.com/de/>).

Constantes de afinidad

Para determinar la afinidad de los anticuerpos, se determinó la cinética de unión de PTA o PTA 1-37 a anticuerpo inmovilizado por medio de resonancia de plasmón superficial sin marcador utilizando un sistema Biacore 2000 (GE Healthcare Europe GmbH, Friburgo, Alemania). Se realizó la inmovilización reversible de los anticuerpos utilizando un anticuerpo anti-Fc de ratón acoplado covalentemente en alta densidad a una superficie de sensor CM5 según las instrucciones del fabricante (kit de captura de anticuerpos de ratón; GE Healthcare). (Lorenz *et al.*, "Functional Antibodies Targeting IsaA of *Staphylococcus aureus* Augment Host Immune Response and Open New Perspectives for Antibacterial Therapy"; Antimicrob Agents Chemother. Enero de 2011; 55(1): 165-173.)

Una muestra de control de PTA humana está disponible en ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania <http://www.ici->

diagnostics.com/. El ensayo puede calibrarse también mediante PTA o PTA 1-37 sintética (para los experimentos se utilizó P37 sintética, SEC ID nº 2) o recombinante.

El umbral de PTA o PTA 1-37 para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino según los métodos de la presente invención está por debajo de 100 pmol/l, preferentemente por debajo de 80 pmol/l, preferentemente por debajo de 60 pmol/l, preferentemente por debajo de 50 pmol/l, preferentemente por debajo de 45,6 pmol/l, preferentemente por debajo de 40 pmol/l. Estos umbrales están relacionados con el método de calibración mencionado anteriormente. Un valor de PTA por debajo de dicho umbral significa que el sujeto corre un riesgo aumentado de contraer cáncer o ya presenta cáncer.

En una forma de realización de la invención dicho método se realiza más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino o con el fin de monitorizar el transcurso del tratamiento. En una forma de realización específica dicha monitorización se realiza con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto femenino a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.

En una forma de realización de la invención el método se utiliza para estratificar a dichos sujetos en grupos de riesgo.

La materia de la invención es además un ensayo para determinar PTA o PTA 1-37 en una muestra tal como se define anteriormente que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de PTA que son los aminoácidos 3-22 (GANDDLNYWSDWYDSDQIK, SEC ID nº 12) y aminoácidos 21-36 (IKEELPEPFEHLLQRI, SEC ID nº 13) en la que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

En una forma de realización de los ensayos para determinar PTA o PTA 1-37 en una muestra según la presente invención la sensibilidad de ensayo analítico de dicho ensayo puede cuantificar la PTA o PTA 1-37 de sujetos sanos y es < 20pmol/, preferentemente < 10 pmol/l y más preferentemente < 5 pmol/l.

En una forma de realización de los ensayos para determinar PTA o PTA 1-37 en una muestra según la presente invención, tal ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. Puede ser un ELISA, un ensayo totalmente automatizado o un ensayo manual. Puede ser una denominada prueba de POC ("*point-of-care*", lugar de atención). Los ejemplos de un ensayo automatizado o completamente automatizado comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los siguientes sistemas: Elecsys® de Roche, Architect® de Abbott, Centauer® de Siemens, Kryptor® de Brahms, Vidas® de Biomerieux, Triage® de Alere. Se proporcionan anteriormente unos ejemplos de formatos de prueba.

En una forma de realización de los ensayos para determinar PTA o PTA 1-37 en una muestra según la presente invención, por lo menos uno de dichos dos agentes de unión se marca con el fin de detectarse. Se proporcionan unos ejemplos de marcadores anteriormente.

En una forma de realización de los ensayos para determinar PTA o PTA 1-37 en una muestra según la presente invención, por lo menos uno de dichos agentes de unión está unido a una fase sólida. Los ejemplos de fases sólidas son perlas magnéticas, tubos de poliestireno o placas de microtitulación. En una forma de realización se utiliza un ensayo homogéneo, es decir utilizando tecnologías de emisión de criptato amplificada de resolución temporal (TRACE).

En una forma de realización de los ensayos para determinar PTA o PTA 1-37 en una muestra según la presente invención, dicho marcador se selecciona de entre el grupo que comprende marcador quimioluminiscente, marcador enzimático, marcador de fluorescencia, marcador de radioyodo.

Un objeto adicional de la presente invención es un kit que comprende un ensayo según la presente invención en el que los componentes de dicho ensayo pueden estar comprendidos en uno o más recipientes.

Un objeto de la presente invención es también un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en una mujer, en el que se utiliza el nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto o bien solo o bien conjuntamente con otros parámetros clínicos o de laboratorio predictivos para la predicción del riesgo de un sujeto de contraer cáncer de mama mediante un método que puede seleccionarse de las siguientes alternativas:

- la comparación con la mediana del nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- la comparación con un cuantil del nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",

- el cálculo basado en análisis de peligros proporcionales de Cox o utilizando cálculos de índice de riesgo tales como el NRI (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrado).

5 En una forma de realización de la invención, el objeto de la presente invención es también un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en una mujer según cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto o bien solo o bien conjuntamente con otros biomarcadores predictivos.

10 Un biomarcador adicional útil de este tipo puede ser proneurotensina o proneurotensina 1-117 o proencefalina o MRPENK o insulina.

En una forma de realización específica del método según la presente invención, se determina el nivel de proneurotensina 1-117 además de la determinación de PTA o PTA 1-37.

15 Cuando se hace referencia a fragmentos a lo largo de la presente solicitud, dichos fragmentos comprenden por lo menos cuatro o cinco aminoácidos.

20 Por tanto, el objeto de la presente invención es también un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino que no padece cáncer:

- determinar el nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto tal como se define anteriormente; y

25 ▪ determinar el nivel de proneurotensina o proneurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto tal como se define anteriormente; y

30 ▪ correlacionar dicho nivel de PTA o PTA 1-37 y proneurotensina o proneurotensina 1-117 con un riesgo de contraer cáncer de mama, en el que un nivel reducido de PTA o PTA 1-37 es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama y en el que un nivel incrementado de proneurotensina o proneurotensina 1-117 es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

La proneurotensina presenta la siguiente secuencia:

35 SEC ID nº 14 (proneurotensina 1-147)

SDSEEEMKAL EADFLT NMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLN SPAE
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICH S RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVIK RK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

También se da a conocer SEC ID nº 15 (proneurotensina 1-125 (neuromedina N grande))

40 SDSEEEMKAL EADFLT NMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLN SPAE
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICH S RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVI KR KIPYIL

SEC ID nº 16 (neuromedina N)
KIPYIL

45 SEC ID nº 17 (neurotensina)

piroQLYENKPRRP YIL

50 Según las reivindicaciones, SEC ID nº 18 (proneurotensina 1-117) es:

SDSEEEMKAL EADFLT NMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLN SPAE
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICH S RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVI

Se dan a conocer además:

SEC ID nº 19 (proneurotensina 1-132)

SDSEEEMKAL EADFLT NMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPAE
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICH S RAFQHWELIQ
5 EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY EN

SEC ID nº 20 (proneurotensina 120-140)

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL

SEC ID nº 21 (proneurotensina 120-147)

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

SEC ID nº 22 (proneurotensina 128-147)

QLYENKPRRP YILKRDSYYY

En una forma de realización específica el nivel de proneurotensina se mide con un inmunoensayo. Más específicamente se utiliza un inmunoensayo tal como se describe en Ernst *et al.* (Peptides (2006), (27) 1787-1793). Un inmunoensayo que puede ser útil para determinar el nivel de proneurotensina o proneurotensina 1-117 puede comprender las etapas tal como se explican resumidamente en el ejemplo 3. Todos los umbrales y valores tienen que considerarse en correlación con la prueba y la calibración utilizadas según el ejemplo 3. Un experto en la materia puede saber que el valor absoluto de un umbral podría verse influido por la calibración utilizada. Esto significa que todos los valores y umbrales facilitados en la presente memoria han de entenderse en el contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (ejemplo 3). Está disponible un calibrador de proneurotensina humana de ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania. Alternativamente, el ensayo también puede calibrarse mediante P-NT 1-117 sintética o recombinante o fragmentos de la misma (véase también Ernst *et al.*, 2006).

El agente de unión que puede utilizarse para determinar el nivel de proneurotensina o proneurotensina 1-117 presenta una constante de afinidad para proneurotensina o proneurotensina 1-117 de por lo menos 10^7 M^{-1} , preferida de 10^8 M^{-1} , la constante de afinidad preferida es mayor de 10^9 M^{-1} , más preferentemente mayor de 10^{10} M^{-1} . Un experto en la materia sabe que puede considerarse compensar una afinidad inferior aplicando una dosis superior de compuestos y esta medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método de Biacore, ofrecido como análisis de servicio por ejemplo en Biaffin, Kassel, Alemania (<http://www.biaffin.com/de/>), véase también anteriormente.

El umbral para determinar el riesgo de contraer cáncer en un sujeto o diagnosticar cáncer en un sujeto, en particular cáncer de mama en un sujeto femenino, según los métodos de la presente invención es aproximadamente de o superior a PNT 78 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o superior a 100 pmol/l, más preferentemente aproximadamente de o superior a 150 pmol/l. En una forma de realización específica dicho umbral es aproximadamente de o superior a 100 pmol/l. Estos umbrales están relacionados con el método de calibración mencionado anteriormente. Un valor de PNT por encima de dicho umbral significa que el sujeto presenta un riesgo aumentado de contraer cáncer o ya presenta cáncer

Además de la determinación del nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y/o la determinación del nivel de proneurotensina (PNT) o proneurotensina 1-117 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; puede medirse la proencefalina (PENK) o MRPENK en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino. Debe apreciarse que además de la determinación del nivel de PTA o PTA 1-37, puede medirse la proencefalina (PENK) o MRPENK en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino. Esto significa que se mide el nivel de o bien PTA sola o bien en combinación con o bien PENK o bien PNT o se combina una determinación de PTA y PNT y PENK y se correlaciona con dicho riesgo.

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de proencefalina (PENK) o MRPENK además de la determinación del nivel de proneurotensina 1-117 y además de la determinación de PTA o PTA 1-37 de la misma.

Por tanto, el objeto de la presente invención es también un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino que no padece cáncer que comprende:

- determinar el nivel de PTA o PTA 1-37 en un fluido corporal seleccionado de entre sangre, plasma o suero

obtenido de dicho sujeto; y

- determinar el nivel de proneurotensina o proneurotensina 1-117 en dicho fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y/o

- determinar el nivel de proencefalina o MRPENK en dicho fluido corporal obtenido de dicho sujeto; y

correlacionar dicho nivel de PTA o PTA 1-37 y proneurotensina o proneurotensina 1-117 y/o el nivel de proencefalina o MRPENK con un riesgo de contraer cáncer de mama,

en el que un nivel reducido de PTA o PTA 1-37 es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama y en el que un nivel incrementado de proneurotensina o proneurotensina 1-117 es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama y en el que un nivel reducido de proencefalina o MRPENK es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

La correlación entre el biomarcador y las combinaciones de biomarcadores anteriores y los casos de cáncer de mama en mujeres es en particular notable según la presente invención.

La proencefalina y asimismo los fragmentos dados a conocer pueden presentar la siguiente secuencia:

SEC ID nº 23 (proencefalina (1-243))

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLPSLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL
RENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMK
KDAEEDDSLANSDDLKELLETGDNRRERSHHQDGSNDNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQL
EDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPE
MEKRYGGF MRF

Se dan a conocer fragmentos de proencefalina en:

SEC ID nº 24 (Syn-encefalina, proencefalina 1-73)

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLPSLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL
RENSKPEESHLLA

SEC ID nº 25 (Met-encefalina)

YGGFM

SEC ID nº 26 (Leu-encefalina)

YGGFL

SEC ID nº 27 (proencefalina 90-109)

MDELYPMEPEEEANGSEILA

Según la presente invención, SEC ID nº 28 (proencefalina 119-159, fragmento de proencefalina regional medio, MRPENK) corresponde a:

DAEEDDSLANSDDLKELLETGDNRRERSHHQDGSNDNEEEVS

Se dan a conocer además:

SEC ID nº 29 (Met-encefalina-Arg-Gly-Leu)

YGGFMRGL

SEC ID nº 30 (proencefalina 172-183)

SPQLEDEAKELQ

SEC ID nº 9 (proencefalina 193-203)

VGRPEWWMDYQ

5 SEC ID nº 31 (proencefalina 213-234)

FAEALPSDEEGESYSKEVPEME

10 SEC ID nº 32 (proencefalina 213-241)

FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGF M

SEC ID nº 33 (Met-encefalina-Arg-Phe)

15 YGGFMRF

20 Determinar el nivel de proencefalina incluyendo, en general pero no en el contexto de la presente invención, Leu-encefalina y Met-encefalina o fragmentos de la misma puede significar que se determina la inmunorreactividad hacia proencefalina o fragmentos de la misma incluyendo Leu-Encefalina y Met-encefalina. Un agente de unión utilizado para la determinación de proencefalina incluyendo Leu-Encefalina y Met-encefalina o fragmentos de la misma dependiendo de la región de unión puede unirse a más de una de las moléculas presentadas anteriormente. Esto resulta evidente para un experto en la materia.

25 En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de MRPENK (SEC ID nº 28: (proencefalina 119-159, fragmento de proencefalina regional medio, MRPENK) que es DAEEDDSLANSDDLKELLETGDNRRSHHQDGSNDNEEVES.

30 En una forma de realización específica se mide el nivel de proencefalina o MRPENK con un inmunoensayo utilizando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a proencefalina o fragmentos de la misma. Un inmunoensayo que puede ser útil para determinar el nivel de proencefalina o MRPENK puede comprender las etapas tal como se explican resumidamente en el ejemplo 4. Todos los umbrales y valores tienen que considerarse en correlación con la prueba y la calibración utilizadas según el ejemplo 4. Un experto en la materia puede saber que el valor absoluto de un umbral podría verse influido por la calibración utilizada. Esto significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria han de entenderse en el contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (ejemplo 4).

40 Según la invención el agente de unión de diagnóstico para proencefalina (y/o proneurotensina/proneurotensina 1-117) se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos por ejemplo IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio variable F de cadena pesada y/o ligera como por ejemplo anticuerpos acoplados químicamente (fragmento de unión a antígeno) incluyendo pero sin limitarse a fragmentos Fab incluyendo minicuerpos de Fab, anticuerpo de Fab de cadena sencilla, anticuerpo de Fab monovalente con etiquetas de epítipo, por ejemplo Fab-V5Sx2; Fab bivalente (mini-anticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, por ejemplo formado por medio de multimerización con la ayuda de un dominio heterólogo, por ejemplo por medio de dimerización de dominios dHLX, por ejemplo Fab-dHLX-FSx2; fragmentos F(ab')₂, fragmentos scFv, fragmentos scFv multimerizados multivalentes o/y multiespecíficos, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® ("*bispecific T cell engager*", acoplador de células T biespecífico), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, por ejemplo de una clase diferente de G; anticuerpos de un solo dominio, por ejemplo nanocuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélidos o peces.

50 En una forma de realización específica el nivel de proencefalina o MRPENK (y/o proneurotensina y proneurotensina 1-117) se mide con un ensayo que utiliza agentes de unión seleccionados de entre el grupo que comprende aptámeros, armazones distintos de Ig tal como se describe con mayor detalle a continuación que se unen a proencefalina o MRPENK de la misma.

55 Los agentes de unión que pueden utilizarse para determinar el nivel de proencefalina o MRPENK (y/o proneurotensina y proneurotensina 1-117) de la misma presentan una constante de afinidad para proencefalina (y/o proneurotensina y proneurotensina 1-117) de por lo menos 10^7 M^{-1} , preferida de 10^8 M^{-1} , la constante de afinidad preferida es mayor de 10^9 M^{-1} , más preferentemente de más de 10^{10} M^{-1} . Un experto en la materia sabe que puede considerarse compensar la afinidad inferior aplicando una dosis superior de compuestos y esta medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método de Biacore, ofrecido como análisis de servicio por ejemplo en Biaffin, Kassel, Alemania (<http://www.biaffin.com/de/>), ver también anteriormente.

65 Está disponible una muestra humana de control de proencefalina humana de ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania <http://www.icidiagnostics.com/>. El ensayo puede calibrarse también mediante proencefalina sintética (para los

experimentos se utilizó MRPENK sintética, SEC ID nº 28) o recombinante o fragmentos de la misma.

El umbral de proencefalina (PENK) para determinar el riesgo de contraer cáncer de mama, en un sujeto femenino según los métodos de la presente invención es aproximadamente de o inferior a 100 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 75 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 50 pmol/l, preferentemente aproximadamente de 40.4 pmol/l. En una forma de realización específica dicho umbral es aproximadamente de 40.4 pmol/l. Estos umbrales están relacionados con el método de calibración mencionado anteriormente. Un valor de PENK por debajo de dicho umbral significa que el sujeto corre un riesgo aumentado de contraer cáncer o ya presenta cáncer.

En una forma de realización de la invención dicho método se realiza más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino, o con el fin de monitorizar el transcurso del tratamiento. En una forma de realización específica dicha monitorización se realiza con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.

En una forma de realización de la invención el método se utiliza con el fin de estratificar a dichos sujetos femeninos en grupos de riesgo.

El objeto de la presente invención es también un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino según cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que se utiliza el nivel de protaquicínina o protaquicínina 1-37 en un fluido corporal tal como se definió anteriormente obtenido de dicho sujeto o bien solo o bien conjuntamente con otros parámetros clínicos o de laboratorio predictivos para la predicción del riesgo de un sujeto de contraer cáncer de mama mediante un método que puede seleccionarse de entre las siguientes alternativas:

- la comparación con la mediana del nivel de protaquicínina o protaquicínina 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- la comparación con un cuantil del nivel de protaquicínina o protaquicínina 1-37 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",
- el cálculo basado en análisis de peligros proporcionales de Cox o utilizando cálculos de índice de riesgo tales como el NRI (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrado).

En una forma de realización de la invención dicho método se realiza más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino, o con el fin de monitorizar el transcurso del tratamiento. En una forma de realización específica dicha monitorización se realiza con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.

En una forma de realización de la invención el método se utiliza para estratificar a dichos sujetos en grupos de riesgo.

Descripción de las figuras

Figura 1: representa una curva de dosis de PTA/señal típica. Curva patrón de PTA.

Figura 2: Gráficas de Kaplan Meier, que ilustran el diagnóstico de cáncer de mama acumulado en cuartil (Q) 1 (por debajo de 45.6 pmol/l), cuartil 2 (45.6-55.3 pmol/l), cuartil 3 (55.4-65.9 pmol/l), cuartil 4 (por encima de 65.9 pmol/l) de mujeres. La disminución de PTA indica un riesgo a largo plazo incrementado de desarrollo de cáncer de mama. Puesto que se excluyó cualquier mujer con antecedentes de cáncer el primer día (toma de muestras de sangre), PTA es altamente predictiva del desarrollo futuro de cáncer de mama. Sobre todo, las mujeres del Q 1 presentan más de 2.1 veces más riesgo de desarrollar cáncer de mama que las mujeres del Q 4.

Figura 3: representa una curva de dosis de PNT/señal típica. Curva patrón de PNT.

Figura 4: representa una curva de dosis de MR PENK/señal típica. Curva patrón de MR PENK.

Figura 5: Ejemplo de ilustración del análisis combinado de PTA y PNT para la predicción de cáncer de mama, los grupos de riesgo se presentan tal como se define en la tabla 9.

Ejemplos

Ejemplo 1 Inmunoensayo de PTA

5 Desarrollo de anticuerpos anti-PTA

Péptidos/conjugados para inmunización:

10 Se sintetizaron péptidos para inmunización (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional para la conjugación de los péptidos con albúmina sérica bovina (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA utilizando Sulfo-SMCC (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se realizó según el manual de Perbio.

Tabla 1:

15

Péptido para inmunización	Secuencia de PTA
(C)GANDDLNYWSDWYDSDQIK	3-22 (SEC ID nº 12)
(C)IKEELPEPFEHLLQRI	21-36 (SEC ID nº 13)

Se generaron los anticuerpos según el siguiente método:

Se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA el día 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg el día 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de que se realizara el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrada como una inyección intraperitoneal y una intravenosa.

25 Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y células de la estirpe celular de mieloma SP2/0 con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras lavar, se sembraron las células en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos mediante crecimiento en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero de ternero fetal al 20% y suplemento de HAT]. Tras dos semanas se reemplaza el medio HAT por medio HT durante tres pases seguido por retorno al medio de cultivo celular normal.

30 Se examinaron principalmente los sobrenadantes de cultivo celular para detectar anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas tras la fusión. Los microcultivos que dieron positivo se transfirieron a placas de 24 pocillos para su propagación. Tras volverlos a someter a prueba, se clonaron los cultivos seleccionados y volvieron a clonarse utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

35 (Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. *et al.* "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996)).

40 Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron anticuerpos por medio de métodos de producción de anticuerpos convencionales (Marx *et al.*, Monoclonal Antibody Production (1997), ATLA 25, 121) y se purificaron por medio de cromatografía de proteína A. Las purezas de los anticuerpos fueron > 95% basándose en el análisis de electroforesis en gel de SDS.

45

Marcaje y recubrimiento de anticuerpos.

Se marcaron todos los anticuerpos con éster de acridinio según el siguiente procedimiento:

50 Compuesto marcado (trazador, anti-PTA 3-22): se mezclaron 100 µg (100 µl) de anticuerpo (1 mg/ml en PBS, pH 7.4), con 10 µl de NHS-éster de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (documento EP 0 353 971) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se purificó el anticuerpo marcado mediante HPLC de filtración en gel en Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). Se diluyó el anticuerpo marcado purificado en (fosfato de potasio 300 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, Na-EDTA 10 mmol/l, albúmina sérica bovina 5 g/l, pH 7.0). La concentración final era aproximadamente de 800.000 unidades relativas de luz (URL) de compuesto marcado (aproximadamente 20 ng de anticuerpo marcado) por 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio utilizando un instrumento AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

55

Anticuerpo en fase sólida (anticuerpo recubierto):

60 Fase sólida: Se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con anticuerpo anti-PTA 22-36 (1.5 µg de anticuerpo/0.3 ml de NaCl 100 mmol/l, Tris/HCl 50 mmol/l, pH 7.8). Tras bloquear con albúmina sérica bovina al 5%, se lavaron los tubos con PBS, pH 7.4 y se secaron a

vacío.

Inmunoensayo de PTA:

- 5 Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos, tras añadir anticuerpo marcado (200 µl), se incubaron los tubos durante 2 h a 18-25°C. Se eliminó el trazador no unido lavando 5 veces (cada una 1 ml) con disolución de lavado (PBS 20 mmol/l, pH 7.4, Triton X-100 al 0.1%). Se midió el anticuerpo marcado unido al tubo utilizando un luminómetro LB 953, Berthold, Alemania.

10 Calibración:

Se calibró el ensayo utilizando diluciones de P37 sintética, diluida en K₂PO₄ 20 mM, EDTA 6 mM, BSA al 0,5%, amastatina 50 µM, leupeptina 100 µM, pH 8.0. Está disponible plasma de control de PTA de ICI-diagnostics, Berlín, Alemania.

- 15 La figura 1 representa una curva de dosis de PTA/señal típica.

La sensibilidad de ensayo analítico fue (la mediana de la señal generada por 20 determinaciones de 0-calibrador (sin adición de PTA) + 2DE2 desviaciones estándar (DE), la concentración de PTA correspondiente se calcula a partir de una curva patrón) de 4,4 pmol/l.

Ejemplo 2 Estudio de población/PTA

Métodos

- 25 Se midió PTA en plasma en ayunas de 2559 participantes femeninos de la población basada en el examen inicial del estudio Malmö Diet and Cancer en 1991-1994 (edad de 58 ± 6 años). Se utilizaron modelos de peligros proporcionales de Cox ajustados a múltiples variables (todos los factores de riesgo cardiovasculares tradicionales, factores de riesgo de diabetes y en análisis de cáncer también herencia de cáncer) para relacionar PTA inicial (razón de peligro por cada aumento de desviación estándar de PTA transformada logarítmicamente) con el tiempo hasta el primer acontecimiento de cada uno de los criterios de valoración estudiados durante una mediana de seguimiento de más de 12 años. Se recuperaron los criterios de valoración del Swedish National Hospital Discharge Registry, el Swedish Myocardial Infarction Registry, el Stroke in Malmö Registry y el Swedish Cancer Registry. La recuperación de los criterios de valoración a través de estos registros se ha validado y se ha encontrado que es precisa (ver también Belting *et al.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev; 1-10. 2012 AACR). Se midió la insulina mediante métodos de laboratorio convencionales.

Tabla 2

Características clínicas de las mujeres en el estudio:			
Estadística descriptiva			
	N	Media	Desviación est.
Edad en el examen de MDCS	2559	57.554	5.9403
Tensión arterial sistólica (mmHg)	2559	140.50	19.311
Tensión arterial diastólica (mmHg)	2559	85.65	9.117
Índice de masa corporal (peso/kg x kg)	2559	25.5196	4.19083
CINTURA (cm)	2559	76.99	10.245
Glucosa (mmol/l)	2559	5.0418	1.21798
Triglicéridos (mmol/l)	2559	1.2245	0.58404
Lipoproteína de alta densidad (mmol/l)	2559	1.5123	0.36949
Lipoproteína de baja densidad (mmol/l)	2559	4.2016	1.04762
P-Insulina	2512	7.223	5.4223

- 40 Distribución de PTA en la población de mujeres (N=2559):

El valor medio de PTA en la población femenina fue de 54.3 pmol/l, desviación estándar +/- 1.4 pmol/l. Todos los resultados estaban dentro del intervalo de medición del ensayo, la concentración de PTA más baja fue de 9.1 pmol/l. Estos resultados indican la idoneidad del ensayo utilizado (sensibilidad del ensayo 4.4 pmol/l).

PTA y predicción de cáncer de mama

- 50 Se evaluó la relación entre PTA y cáncer de mama (tabla 3). Todas las mujeres con cáncer previo (N=459) se excluyeron de la evaluación. Había una fuerte relación entre PTA y cáncer de mama en mujeres. En un modelo completamente ajustado, cada DE de disminución de PTA (se utilizaron cuartiles invertidos, revPTA, ver la tabla 3/4) estaba asociado con un riesgo incrementado del 28,2% de futuro cáncer de mama (tabla 3) y el cuartil

superior frente al inferior de PTA identificó una diferencia de más de 2,1 veces en el riesgo de cáncer de mama (ver la tabla 5 y la figura 2). Insulina sin PTA en la ecuación no estaba asociada significativamente con desarrollo futuro cáncer de mama, pero, sorprendentemente, si PTA es parte de la ecuación la insulina resultó significativa ($p=0.035$). El aumento de insulina estaba asociado con riesgo disminuido del 34.6% por DE de futuro cáncer de mama. La potencia predictiva de PTA no se vio influida por la insulina.

Tabla 3:

Variables en la ecuación							IC del 95,0%
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Inferior
EDAD	-0,003	0,016	0,035	1	0,851	0,997	0,966
BMI_B	0,027	0,025	1,194	1	0,275	1,027	0,979
LNINS	-0,423	0,200	4,465	1	0,035	0,655	0,442
HER_CÁNCER_0	-0,006	0,184	0,001	1	0,973	0,994	0,693
Q_REV_PTA	0,249	0,085	8,629	1	0,003	1,282	1,086

Tabla 4:

Análisis de cuartiles de PTA:			
Cuartil	Cuartil inv.	N	Intervalo de concentración (pmol de PTA/l)
1	4	535	<45.6
2	3	535	45.6-55.3
3	2	535	55.4-65.9
4	1	535	>65.9

Tabla 5: Modelos de peligros proporcionales de Cox multivariantes para PTA inicial frente a la incidencia de cáncer de mama.

	HR por 1 DE	Valor de P	Cuartil 4	Cuartil 3	Cuartil 2	Cuartil 1
Mujeres (2140/137)	1.22 (0.84-1.67)	0.013	1.0 (ref)	1.60 (1.21-2.22)	1.6 (1.24-2.27)	2.2 (1.82-3.6)

Ejemplo 3

Ensayo de proneurotensina

Se generaron anticuerpos tal como se describe anteriormente. Se generó el anticuerpo para el marcaje (LA) contra P-NT 1-19 (H-CSDSEEMKALEADFLTNMH (SEC ID nº 33)) y se generó el anticuerpo en fase sólida (SPA) contra el péptido P-NT 44-62 (CNLNSPAETGEVHEEELVA (SEC ID nº 34). Se realizó el desarrollo y la producción de anticuerpos tal como se describe anteriormente.

Inmunoensayo para la cuantificación de proneurotensina humana

La tecnología utilizada fue un inmunoensayo de luminiscencia de tubo recubierto de tipo sándwich, basado en marcaje con éster de acridinio.

Compuesto marcado (trazador): se mezclaron 100 µg (100 µl) de LA (1 mg/ml en PBS, pH 7.4), con 10 µl de NHS-éster de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (documento EP 0 353 971) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se purificó LA marcado mediante HPLC de filtración en gel en Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). Se diluyó el LA purificado en (fosfato de potasio 300 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, Na-EDTA 10 mmol/l, albúmina sérica bovina 5 g/l, pH 7.0). La concentración final era aproximadamente de 800.000 unidades relativas de luz (URL) de compuesto marcado (aproximadamente 20 ng de anticuerpo marcado) por 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia de éster de acridinio utilizando un instrumento AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

Fase sólida: Se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con SPA (1.5 µg de SPA/0.3 ml de NaCl 100 mmol/l, Tris/HCl 50 mmol/l, pH 7.8). Tras bloquear con albúmina sérica bovina al 5%, se lavaron los tubos con PBS, pH 7.4 y se secaron a vacío.

Calibración:

Se calibró el ensayo utilizando diluciones de proneurotensina que contenían suero humano. Se diluyó un conjunto de sueros humanos con alta inmunoreactividad con proneurotensina (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Alemania) con suero de caballo (Biochrom AG, Alemania) (patrones de ensayo).

Se calibraron los patrones mediante la utilización del calibrador de proneurotensina humana (ICI-Diagnostics, Berlín, Alemania). Alternativamente, el ensayo puede calibrarse mediante P-NT 1-117 sintética o recombinante o fragmentos de la misma (ver también Ernst *et al.*, 2006).

5 Inmunoensayo de ProNT:

Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos con SPA, tras añadir LA marcado (200 µl), se incubaron los tubos durante 16-22 h a 18-25°C. Se eliminó el trazador no unido lavando 5 veces (cada una 1 ml) con disolución de lavado (PBS 20 mmol/l, pH 7.4, Triton X-100 al 0.1%). Se midió LA unido al tubo utilizando un
10 luminómetro LB 953. Se calcularon los resultados a partir de la curva de calibración. Se muestra una curva de calibración típica en la figura 3.

Ejemplo 4:

15 Inmunoensayo de proencefalina

Desarrollo de anticuerpos

Péptidos/conjugados para la inmunización:

Se sintetizaron péptidos para la inmunización (JPT Technologies, Berlín, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional para la conjugación de los péptidos con albúmina sérica bovina (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA utilizando Sulfo-SMCC (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento se realizó según el manual de Perbio.
25

Tabla 6

Péptido para inmunización	Secuencia de proencefalina
(C)LKELLETG (SEC ID nº 35)	133-140
(C)SDNEEEVS (SEC ID nº 36)	152-159

Se generaron los anticuerpos según el siguiente método:

30 Se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA el día 0 y 14 (emulsionado en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg el día 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de que se realizara el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado disuelto en 100 µl de solución salina, administrada como una inyección intraperitoneal y una intravenosa.

35 Se fusionaron esplenocitos del ratón inmunizado y células de la estirpe celular de mieloma SP2/0 con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37°C. Tras lavar, se sembraron las células en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron clones híbridos mediante crecimiento en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero de ternero fetal al 20% y suplemento de HAT]. Tras dos semanas se reemplaza el
40 medio HAT con medio HT durante tres pases seguido por retorno al medio de cultivo celular normal.

Se examinaron principalmente los sobrenadantes de cultivo celular para detectar anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas tras la fusión. Los microcultivos que dieron positivo se transfirieron a placas de 24 pocillos para su propagación. Tras volverlos a someter a prueba se clonaron los cultivos seleccionados y volvieron a
45 clonarse utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

(Lane, R.D. "A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Met. 81: 223-228; (1985), Ziegler, B. *et al.* "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28: 11-15, (1996)).
50

Tabla 7

Péptido para inmunización	Secuencia de preproencefalina	Nombre del anticuerpo
(C)LKELLETG (SEC ID nº 35)	133-140	MR-MRPENK (utilizado como anticuerpo de tubo recubierto)
(C)SDNEEEVS (SEC ID nº 36)	152-159	CT-MRPENK (utilizado como anticuerpo marcado)

55

Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron anticuerpos por medio de métodos de producción de anticuerpos convencionales (Marx *et al.*, Monoclonal Antibody Production (1997), ATLA 25, 121) y se purificaron por medio de cromatografía de proteína A. Las perezas de los anticuerpos fueron > 95% basándose en análisis de electroforesis en gel de SDS.

Marcaje y recubrimiento de anticuerpos.

Compuesto marcado (trazador, anticuerpo CT-MRPENK): se mezclaron 100 µg (100 µl) de anticuerpo (1 mg/ml en PBS, pH 7.4) con 10 µl de NHS-éster de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (documento EP 0 353 971) y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Se purificó el anticuerpo marcado mediante HPLC de filtración en gel en Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., EE.UU.). Se diluyó el anticuerpo marcado purificado en (fosfato de potasio 300 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, Na-EDTA 10 mmol/l, albúmina sérica bovina 5 g/l, pH 7.0). La concentración final era aproximadamente de 800.000 unidades relativas de luz (URL) de compuesto marcado (aproximadamente 20 ng de anticuerpo marcado) por 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio utilizando un instrumento AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

Anticuerpo en fase sólida (anticuerpo en tubo recubierto, anticuerpo MR-MRPENK):

Fase sólida: Se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con anticuerpo (1.5 µg de anticuerpo/0.3 ml de NaCl 100 mmol/l, Tris/HCl 50 mmol/l, pH 7.8). Tras bloquear con albúmina sérica bovina al 5%, se lavaron los tubos con PBS, pH 7.4 y se secaron a vacío.

Inmunoensayo de proencefalina:

Se pipetearon 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos, tras añadir anticuerpo marcado (200 µl), se incubaron los tubos durante 2 h a 18-25°C. Se eliminó el trazador no unido lavando 5 veces (cada una 1 ml) con disolución de lavado (PBS 20 mmol/l, pH 7.4, Triton X-100 al 0.1%). Se midió el anticuerpo marcado unido al tubo utilizando el luminómetro 953.

Calibración:

Se calibró el ensayo utilizando diluciones de MRPENK sintética, diluida en K₂PO₄ 20 mM, EDTA 6 mM, BSA al 0.5%, amastatina 50 µM, leupeptina 100 µM, pH 8.0. Está disponible plasma de control de proencefalina de ICI-diagnostics, Berlín, Alemania.

La figura 4 representa una curva de dosis de proencefalina/señal típica.

La sensibilidad del ensayo (20 determinaciones de 0-calibrador (sin adición de MRPENK) + 2DE) fue de 5.5 pmol/l.

Ejemplo 5Análisis de combinación de PTA, proneurotensina y HRT, y PTA, proneurotensina, proencefalina e insulina para la predicción de cáncer de mama.

Puesto que se mostró recientemente que el aumento de proneurotensina y proencefalina era altamente predictivo de cáncer de mama, se combinaron estos biomarcadores para la predicción de cáncer de mama. Se añadió HRT (terapia de sustitución de hormonas) como factor de riesgo conocido para cáncer de mama para mostrar el valor incremental de PTA.

En primer lugar, se combinaron PTA/proneuroensina/HRT/insulina:

No existe una correlación significativa entre PTA y proneurotensina ($p = 0.71$). En un modelo combinado que incluye insulina y terapia de sustitución de hormonas (HRT) utilizando PTA y PNT (tabla 8), se descubre que ambas son independientes en la predicción de cáncer de mama. Ambos marcadores son altamente significativos ($p = 0.005$ para PTA y $p < 0.001$ para PNT).

En un modelo completamente ajustado, cada aumento de DE de PNT estaba asociado con un aumento del riesgo del 45.5% de futuro cáncer de mama. Cada aumento de DE de PTA estaba asociado con un riesgo disminuido del 18.9% (por DE) de futuro cáncer de mama.

La HRT, tal como se esperaba, era significativa en el mismo modelo, pero la insulina, sorprendentemente, estaba en la parte superior de la predicción de cáncer de mama ($p = 0.027$). Cada aumento de DE de insulina estaba

asociado con una disminución del 35.7% de futuro cáncer de mama.

Estos datos muestran que PTA, PNT, insulina y HRT añaden cada una información significativa para la predicción de cáncer de mama.

5

Tabla 8: análisis combinado de PNT y PTA para la predicción de cáncer de mama.

Variables en la ecuación							IC del 95,0% Inferior
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	
EDAD	-0,004	0,016	0,048	1	0,826	0,996	0,966
BMI_B	0,029	0,025	1,342	1	0,247	1,029	0,980
LNINS	-0,441	0,199	4,889	1	0,027	0,643	0,435
hrt_curr	0,612	0,197	9,656	1	0,002	1,844	1,254
HER_CÁNCER_0	0,014	0,184	0,006	1	0,938	1,014	0,707
ZLN_PTA	-0,210	0,075	7,925	1	0,005	0,811	0,700
ZLN_PNT	0,375	0,089	17,938	1	0,000	1,455	1,223

En un análisis de Kaplan Meier, se ilustra la información combinatoria de PTA y PNT, tabla 9 y figura 5: Se combinaron los cuartiles de PTA y PNT:

10

Puesto que valores de PTA bajos indican un riesgo incrementado de desarrollo de cáncer de mama, se invirtieron los cuartiles de PTA (revPTA): 1º cuartil PTA = 4º cuartil revPTA; 2º cuartil PTA = 3º cuartil revPTA; 3º cuartil PTA = 2º cuartil revPTA; 4º cuartil PTA = 1º cuartil revPTA. (Tabla 9)

15

Tabla 9

revPTA/PNT	N.º de sujetos	Desarrollo de cáncer de mama a los 15 años	Riesgo (%)	Riesgo relativo (grupo de riesgo más bajo=1)
Q1/Q1 (grupo 1)	117	3	2.6	1
Q1/Q2 and Q2/Q1 Q1/Q3 Q2/Q2 Q3/Q1 (grupo 2)	673	27	4.0	1.54
Q1/Q4 Q2/Q3 Q3/Q2 Q4/Q1 (grupo 3)	583	42	7.2	2.8
Q2/Q4 Q3/Q3 Q4/Q2 (grupo 4)	377	25	6.6	2.5
Q3/Q4 Q4/Q3 (grupo 5)	263	24	9.1	3.5
Q4/Q4 (grupo 6)	127	16	12.6	4.9

La combinación del cuartil más alto de PNT y el cuartil más bajo de PTA (grupo 6) frente al cuartil más bajo de PNT y el más alto de PTA (grupo 1) mostró un riesgo combinado de 4.9 para futuro cáncer de mama (ver la figura 5).

20

Análisis combinado de PTA, proencefalina, HRT, insulina y PNT en la población femenina:

Existe una correlación significativa entre PTA y proencefalina ($p = <0.001$, $r = 0.35$). En un modelo combinado que incluía insulina, PTA, PNT y proencefalina, se encontró que todos los marcadores añadían independientemente información para la predicción de cáncer de mama (tabla 10). Todos los marcadores eran altamente significativos ($p = 0.028$ para PTA, $p < 0.001$ para PNT, $p = 0.009$ para insulina y $p < 0.001$ para proencefalina). PTA sigue siendo independiente aunque esté altamente correlacionada con proencefalina. En un modelo completamente ajustado, cada aumento de DE de PNT estaba asociado con un aumento del riesgo del 47.8% de futuro cáncer de mama. El aumento de PTA estaba asociado con un riesgo disminuido del 15.8% (por DE) de futuro cáncer de mama. El aumento de proencefalina estaba asociado con un riesgo disminuido del 26.4% (por DE) y el aumento de insulina estaba asociado con un riesgo disminuido del 40.4% (por DE) de futuro cáncer de mama.

30

Estos datos muestran una fuerte información independiente y aditiva sobre el desarrollo futuro de cáncer de mama mediante PTA, PNT, proencefalina e insulina.

35

Tabla 10: Análisis combinado de PTA, proencefalina, insulina y PNT.

Variables en la ecuación							IC del 95,0% Inferior
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	
EDAD	-0,001	0,016	0,002	1	0,966	0,999	0,969
BMI_B	0,019	0,025	0,568	1	0,451	1,019	0,970

Variables en la ecuación							
	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	IC del 95,0% Inferior
LNINS	-0,518	0,200	6,739	1	0,009	0,596	0,403
HER_CÁNCER_0	-0,021	0,185	0,012	1	0,911	0,980	0,682
ZLN_PTA	-0,171	0,078	4,827	1	0,028	0,842	0,723
ZLN_PNT	0,390	0,089	19,328	1	0,000	1,478	1,242
ZLN_PENK	-0,309	0,087	12,655	1	0,000	0,734	0,619

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino que no padece cáncer que comprende:

- determinar el nivel de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y
- correlacionar dicho nivel de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 con el riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama,

en el que un nivel reducido significa un nivel inferior a un determinado nivel umbral y en el que el fluido corporal es sangre o plasma o suero.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho nivel umbral de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 que es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama es aproximadamente de o inferior a 80 pmol/l.

3. Método según la reivindicación 1, en el que dicho nivel umbral de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 que es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama es aproximadamente de o inferior a 60 pmol/l.

4. Método según la reivindicación 1, en el que dicho nivel umbral de protaquicinina que es SEC ID nº 1, o protaquicinina 1-37 que es SEC ID nº 2 que es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama es un nivel aproximadamente de o inferior a 45.6 pmol/l.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que están comprendidas además las etapas siguientes:

- determinar el nivel de proneurotensina que es SEC ID nº 14 o proneurotensina 1-117 que es SEC ID nº 18 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y
- correlacionar adicionalmente proneurotensina o proneurotensina 1-117 con un riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel incrementado de proneurotensina o proneurotensina 1-117 es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que están comprendidas además las etapas siguientes:

- determinar el nivel de proencefalina que es SEC ID nº 23 o MRPENK que es SEC ID nº 28 en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y
- correlacionar adicionalmente proencefalina o MRPENK con un riesgo de contraer cáncer de mama, y en el que un nivel reducido de proencefalina o MRPENK es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que están comprendidas además las etapas siguientes:

- determinar el nivel de insulina en un fluido corporal obtenido de dicho sujeto femenino; y
- correlacionar adicionalmente insulina con un riesgo de contraer cáncer de mama, en el que un nivel reducido de insulina es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer de mama.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que correlacionar adicionalmente significa un análisis combinado de los niveles de biomarcador determinados considerando los factores de riesgo relativos para el desarrollo del cáncer obtenidos mediante los biomarcadores individuales.

9. Método según las reivindicaciones 5 a 8, en el que un nivel incrementado de proneurotensina es un nivel superior a un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de o superior a 78 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o superior a 100 pmol/l, más preferentemente aproximadamente de o superior a 150 pmol/l.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en el que un nivel reducido de proencefalina es un nivel inferior a un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de o inferior a 100 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 75 pmol/l, preferentemente aproximadamente de o inferior a 50 pmol/l,

preferentemente aproximadamente de 40.4 pmol/l.

- 5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que un nivel reducido de insulina es un nivel inferior a un umbral en el que dicho umbral es aproximadamente de 70 pmol/l.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho sujeto femenino nunca ha presentado antecedentes de diagnóstico de cáncer en el momento en el que la muestra de fluido corporal se toma de dicho sujeto femenino.
- 10 13. Método según las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho sujeto femenino ha presentado antecedentes de diagnóstico de cáncer y se ha curado en el momento en el que la muestra de fluido corporal se toma de dicho sujeto femenino y se determina el riesgo de reaparición del cáncer de mama.
- 15 14. Método según las reivindicaciones 1 a 13, en el que en el momento en el que la muestra de fluido corporal se toma de dicho sujeto femenino, a dicho sujeto femenino se le ha diagnosticado que presenta una enfermedad cardiovascular o diabetes.
- 20 15. Método según las reivindicaciones 1 a 14, en el que adicionalmente se determina por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, presencia de diabetes mellitus, tabaquismo actual.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el nivel de protaquicina y proneurotensina y/o proencefalina y/o insulina se mide con un inmunoensayo.
- 25 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que dicho método se realiza más de una vez para monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino.
18. Método según la reivindicación 17, en el que dicha monitorización se realiza para evaluar la respuesta de dicho sujeto femenino a las medidas preventivas y/o terapéuticas tomadas.
- 30 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para estratificar dichos sujetos femeninos en grupos de riesgo.

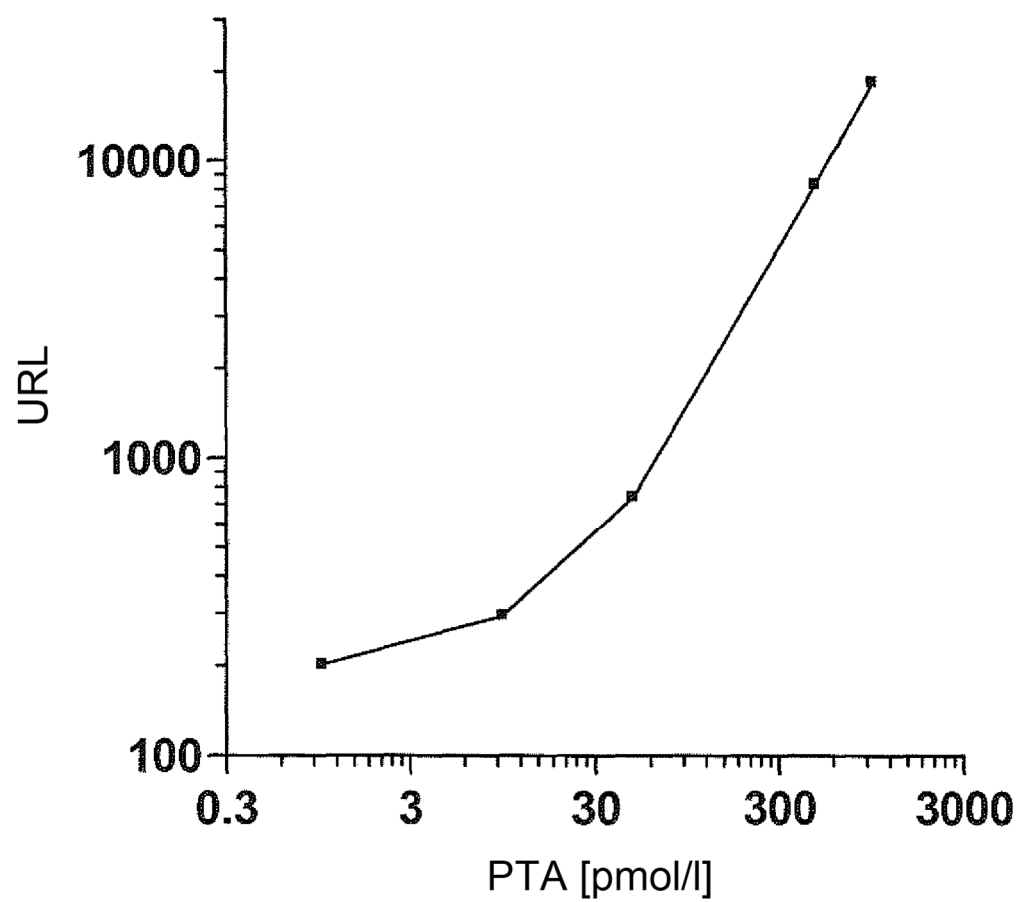
Fig. 1:

Fig. 2:

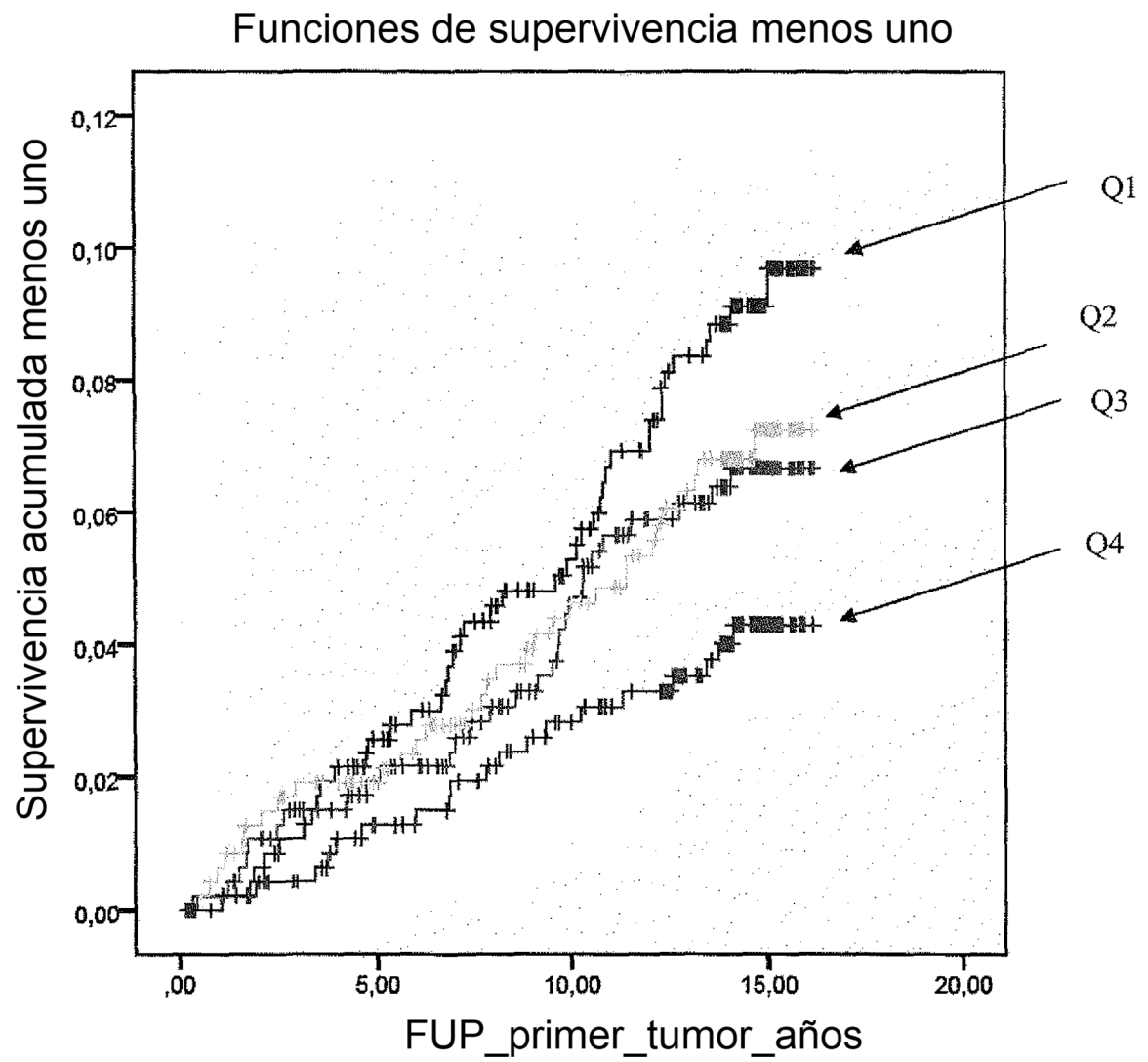


Fig. 3:

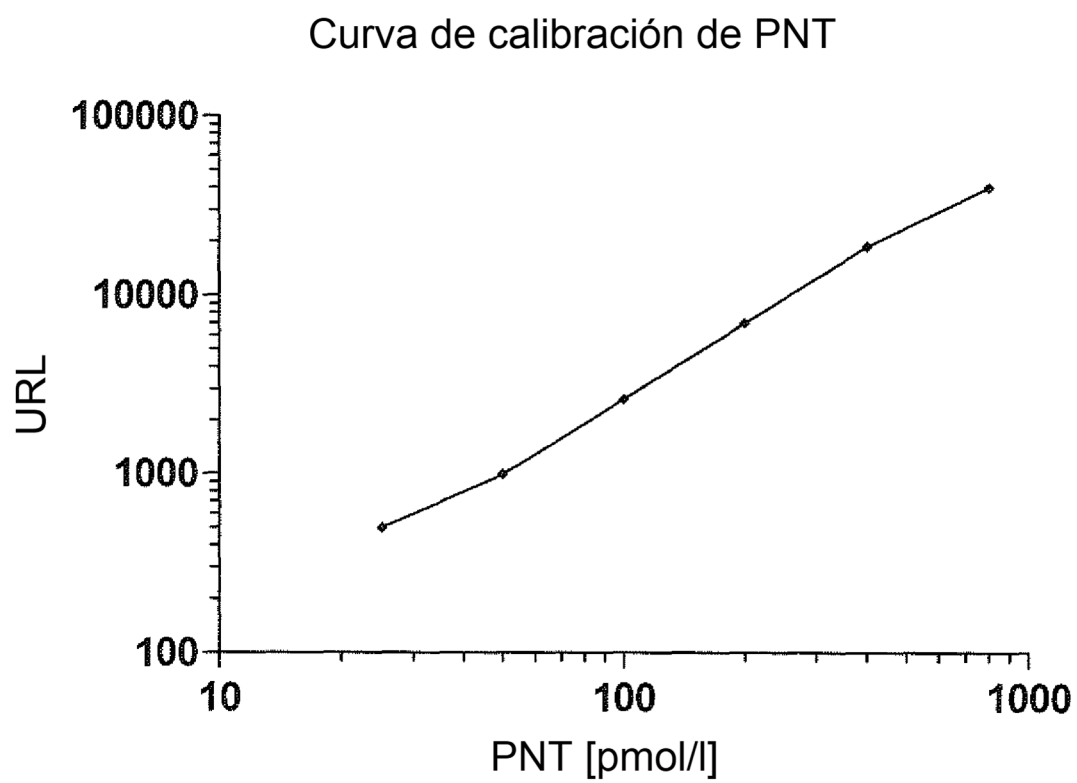


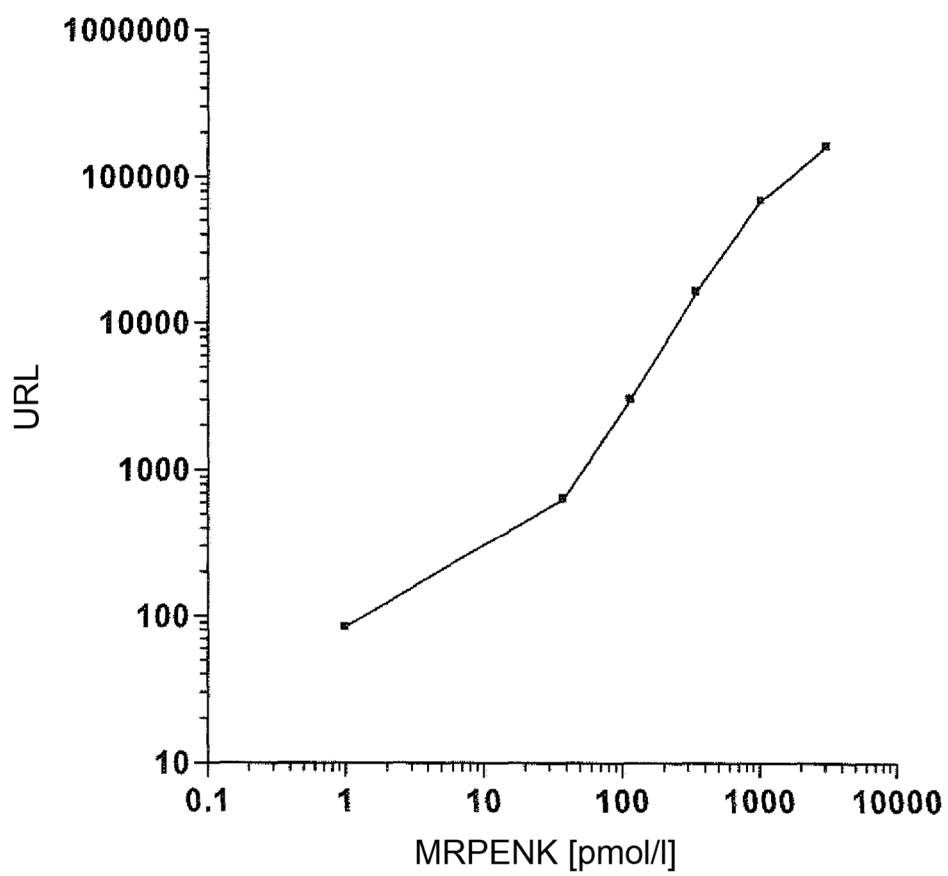
Fig. 4:

Fig. 5:

