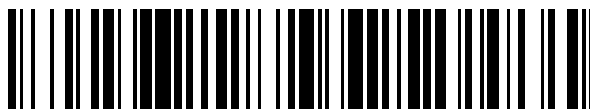


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 974**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015** **PCT/EP2015/070752**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016** **WO16038157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015** **E 15771522 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019** **EP 3191845**

54 Título: **Biomarcadores para evaluar el cáncer de mama**

30 Prioridad:

10.09.2014 EP 14184200

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

24.06.2020

73 Titular/es:

IDCGS CLÍNICA DE DIAGNÓSTICOS MÉDICOS LTDA (33.3%)
Avenida Professor Noé de Azevedo 208, 13RD, Vila Mariana
04117-000 São Paulo, BR;
BIOCRATES LIFE SCIENCES AG (33.3%) y FUNDAÇÃO PIO XII - HOSPITAL DE CâNCER DE BARRETOS (33.3%)

72 Inventor/es:

LOPES CARVALHO, ANDRE;
DA COSTA VIEIRA, RENÉ ALOISIO;
GUERREIRO DA SILVA, ISMAEL DALE COTRIM;
GUIMARAES LO TURCO, EDSON y KOAL, THERESE

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 768 974 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

Biomarcadores para evaluar el cáncer de mama

5 Campo técnico

[0001] La presente invención se refiere a nuevos biomarcadores para evaluar el cáncer de mama. En particular, la presente invención proporciona nuevos biomarcadores para su uso en el cribado y/o diagnóstico del cáncer de mama en los pacientes. Además, la presente descripción se refiere a un procedimiento para evaluar el cáncer de mama en un sujeto mamífero, y a un kit para llevar a cabo el procedimiento. Además, la presente descripción se refiere a un procedimiento para evaluar el cáncer de mama, que comprende obtener una muestra biológica, preferiblemente sangre, de un sujeto mamífero y medir en la muestra biológica la cantidad y/o la relación de los metabolitos. Mediante el empleo de los biomarcadores específicos y los procedimientos de acuerdo con la presente invención es posible evaluar de manera más adecuada y fiable el cáncer de mama.

15

Técnica anterior

Metabolómica

20 [0002] La metabolómica es una medida cuantitativa global de compuestos de bajo peso molecular que cubren sistemáticamente los metabolitos clave, que representan toda la gama de rutas del metabolismo intermediario. La capacidad para analizar grandes conjuntos de metabolitos extrae información bioquímica que refleja los verdaderos puntos finales funcionales de eventos biológicos evidentes, mientras que otras tecnologías de genómica funcional, tales como la transcriptómica y proteómica, aunque altamente valiosas, simplemente indican la causa potencial de respuesta fenotípica. Por lo tanto, no pueden necesariamente predecir los efectos de los fármacos, la respuesta toxicológica o estados de enfermedad a nivel de fenotipo, a menos que se añada la validación funcional.

25

[0003] La metabolómica hace de puente en esta brecha de información al representar, en particular, dicha información funcional, ya que las diferencias de metabolitos en fluidos biológicos y tejidos proporcionan el vínculo más cercano a las diversas respuestas fenotípicas. Ni que decir tiene, tales cambios en el fenotipo bioquímico son de interés directo para las industrias farmacéuticas, biotecnológicas y de salud una vez que la tecnología adecuada permita la extracción rentable y la integración de esta información.

30

[0004] En general, el fenotipo no es necesariamente predicho por el genotipo. La brecha entre el genotipo y el fenotipo está abarcada por muchas reacciones bioquímicas, cada una con dependencias individuales a diversas influencias, incluyendo medicamentos, nutrición y factores ambientales. En esta cadena de biomoléculas desde los genes al fenotipo, los metabolitos son las moléculas cuantificables con el vínculo más cercano al fenotipo. Muchos estados fenotípicos y genotípicos, tales como una respuesta tóxica a un fármaco o una prevalencia de una enfermedad, se predicen por las diferencias en las concentraciones de metabolitos funcionalmente relevantes dentro de los fluidos biológicos y tejidos.

40

Cáncer de mama

[0005] El cáncer de mama es un tipo de cáncer que se origina del tejido de mama, más comúnmente del revestimiento interior de los conductos lácteos o los lóbulos que suministran los conductos con leche. A nivel mundial, el cáncer de mama representa el 22,9% de todos los cánceres (excluyendo el cáncer de piel no melanómico) en mujeres. En 2012, alrededor de 226.870 mujeres en los EE.UU. fueron diagnosticados con cáncer de mama, lo que representa el 29% de todos los pacientes de cáncer mujer recién diagnosticados que conducen a más de 39.000 muertes en los EE.UU. en 2011, clasificándose como la segunda causa de muerte por cáncer en las mujeres. El diagnóstico precoz puede aumentar significativamente las tasas de supervivencia a largo plazo del cáncer de mama y en la actualidad la mamografía es el procedimiento de cribado más aceptable y eficaz para la detección del cáncer de mama y fue recomendada por el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de Estados Unidos (USPSTF) para mujeres mayores de 40 años de edad. Sin embargo, debido a la alta tasa de falsos positivos de este cribado, el USPSTF revisó su recomendación a una frecuencia reducida de mamografías en 2009. Otras técnicas de imagen, tales como la ecografía y la obtención de imágenes por resonancia magnética, también se han utilizado en el cribado del cáncer de mama. Desafortunadamente, incluso con la inclusión de estas técnicas de imagen, alrededor del 20% de los pacientes con cáncer de mama todavía no se puede detectar.

50

55

[0006] Los nuevos procedimientos para el cribado y el diagnóstico serían muy útiles especialmente en los países en desarrollo con dimensiones continentales, donde los servicios de mamografía especializada no se ofrecen a todas las mujeres mayores de 40 años de edad. Sólo en Brasil, por ejemplo, alrededor de 30 millones de mujeres al año son elegibles para exámenes de mamografía, sin embargo, menos del 50% tendrá acceso a este examen. El resultado es que, entre los 52.000 nuevos casos/año, más del 60% corresponde a casos avanzados que necesitarán una quimioterapia prequirúrgica para disminuir los volúmenes de los tumores grandes desproporcionadas con el fin de hacer posible la cirugía.

65

[0007] Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de nuevos procedimientos de cribado, que se puedan realizar fácilmente, es decir sin la necesidad de equipo o recursos especializados. Además, existe una necesidad urgente para la disposición de procedimientos más fiables y eficaces para el diagnóstico de cáncer de mama con alta precisión, así como procedimientos para la predicción de la progresión de la enfermedad y la respuesta a la quimioterapia.

[0008] Un enfoque prometedor para el cribado en el diagnóstico de cáncer de mama es el uso de biomarcadores, tales como biomarcadores de plasma (o suero) (tales como antígenos y patrones de proteína). Sin embargo, todavía están lejos de su uso clínico. Algunos marcadores tumorales, tales como CA15.3 y CA27.29, se recomiendan solamente para el seguimiento terapéutico, pero no el cribado.

[0009] Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos biomarcadores eficaces para el cribado y diagnóstico de cáncer de mama que se puedan utilizar individualmente o en combinación con otros procedimientos existentes.

[0010] Recientemente, se ha descubierto que las propiedades metabólicas de las células de cáncer son diferentes de las de las células normales, ya que es dependiente de la glucólisis aeróbica, la síntesis de ácidos grasos y glutaminólisis para la proliferación. Una mayor síntesis de ácidos grasos, por ejemplo, proporciona a las células tumorales que proliferan rápidamente lípidos en las células tumorales para la biogénesis de la membrana, lo que confiere tanto una ventaja de crecimiento como de supervivencia. Del mismo modo, las células cancerosas son extremadamente sensibles a la privación de glutamina y no pueden proliferar en cultivo sin ella. La "adicción a glutamina" da lugar a una mayor producción de subproductos necesarios para células que proliferan rápidamente, tales como precursores de aminoácidos y, como resultado el metabolismo celular desregulado también está vinculado a la resistencia a fármacos en la terapia contra el cáncer. De hecho, la ácido graso sintasa (FASN), un complejo clave que cataliza la síntesis de ácidos grasos, está vinculada a la resistencia adquirida a Taxol/trastuzumab/Adriamicina en cáncer de mama o gemcitabina intrínseca y resistencia a la radiación en el cáncer de páncreas. Finalmente, la glutaminólisis está vinculada a la resistencia a cisplatino a través de la activación de dianas de mamíferos de la señalización del complejo de rapamicina 1 (mTORC1) en el cáncer gástrico.

[0011] El cáncer de mama se trata generalmente con cirugía, que puede ser seguida por la quimioterapia o terapia de radiación, o ambos. La quimioterapia neoadyuvante se ha utilizado principalmente para ayudar en el tratamiento de cánceres de mama localmente avanzados especialmente aquellos considerados inoperables en la primera visita. En los últimos años, sin embargo, se ha utilizado cada vez más para los tumores más pequeños y operables con el fin de reponer y conservar porciones más grandes de tejido mamario de lo que, de otro modo, se extraería en una cirugía primaria. Otra peculiaridad de este enfoque de tratamiento es que proporciona una oportunidad única para cuantificar con precisión, mediante exámenes clínicos y/o radiológicos, las variaciones de volumen del tumor en respuesta a la pauta de quimioterapia adoptado.

[0012] Además, el tipo de terapia, selección de medicamentos y régimen de dosificación se ha fijado convencionalmente simplemente determinando el tamaño del tumor. El tamaño del tumor, sin embargo, no refleja su actividad bioquímica y metabólica y por lo tanto no refleja por igual si el tumor puede ser muy agresivo o inactivo. Por lo tanto, las herramientas que se utilizan convencionalmente en la técnica han sido insuficientes para definir correctamente el tratamiento del cáncer de mama en el paciente.

[0013] La información valiosa con respecto a la actividad metabólica de un tumor de cáncer de mama se utiliza en la invención no sólo para indicar regímenes alternativos cuando se observa una mínima o ninguna respuesta a la quimioterapia, sino también para identificar los pacientes que alcanzaron una respuesta patológica completa (pCR) y, por lo tanto, con resultados más favorables.

[0014] Los principales esfuerzos en la técnica se han dirigido al desarrollo de herramientas de predicción capaces de colaborar en la identificación de los pacientes que tienen más posibilidades de alcanzar la pCR como ypTO/ypNO. Además, la progresión de la enfermedad es también una preocupación importante con el uso de quimioterapia neoadyuvante y aunque muchos investigadores han tratado de determinar predictores clínicos y moleculares de una pCR muy pocos han descrito predictores de la progresión.

[0015] Wei, S., et al. (Metabolomics approach for predicting response to neoadjuvant chemotherapy for breast cancer, Molecular Oncology (2012)) desarrollaron un modelo de predicción mediante la combinación de metabolitos derivados de RMN y EM, que identificaron correctamente el 80% de los pacientes cuyos tumores no mostraron una respuesta completa a la quimioterapia. Una combinación de cuatro metabolitos, tres detectados por RMN (glutamina, treonina e isoleucina), y uno por EM (ácido linolénico) podía distinguir grupos de pacientes sin respuesta, respuesta parcial o completa. Sin embargo, el número de pacientes correctamente identificados de 80% todavía no es satisfactorio.

[0016] Qiu, Y. et al. (Mass Spectrometry-Based Quantitative Metabolomics Revealed a Distinct Lipid Profile in Breast Cancer Patients, Int J. Mol Sci 2013) desarrollaron una ecuación de diagnóstico basada en tres metabolitos (lisoPC a C16:0, PC ae C42:5 y PC aa C34:2) que diferenciaba con éxito a pacientes con cáncer de mama de los controles sanos, con una sensibilidad del 98,1% y una especificidad del 96,0%. Sin embargo, los autores no fueron

capaces de generar resultados predictivos de respuesta a la quimioterapia, así como resultados capaces de clasificar los tumores de cáncer de mama de acuerdo a sus subtipos intrínsecos. En consecuencia, sigue existiendo espacio, no sólo para la mejora de la sensibilidad y especificidad, sino también para una expansión significativa de la aplicabilidad del modelo.

[0017] Por lo tanto, existe una necesidad urgente en la técnica de desarrollar nuevas técnicas de cribado y de diagnóstico adecuadas para identificar el cáncer de mama en pacientes con alta precisión y fiabilidad, identificar el subtipo de tumor y su estado de actividad, predecir la progresión del cáncer de mama, resultado de la enfermedad, así como la respuesta terapéutica del paciente a la quimioterapia.

[0018] Estados Unidos 2014/162903 A1, US 2013/172430 A1, WO 2011/119772 A1 y WO 2011/046597 A2 se refieren al diagnóstico o pronóstico de cáncer de mama y revelan varias combinaciones de biomarcadores.

[0019] US 2011/151497 A1 da a conocer un procedimiento para diagnosticar el cáncer de mama que comprende la detección de uno o más de ácido pipecólico, serina, una poliamina, y un ácido graso en una muestra.

[0020] EP 2 270 699 A1 se refiere a un procedimiento para la normalización en procedimientos de análisis de metabolómica con metabolitos de referencia endógenos.

[0021] El documento WO 2010/139341 A1 se refiere a biomarcadores para evaluar la enfermedad renal.

Problema técnico

[0022] En base a estos cambios metabólicos específicos del cáncer, los inventores han tenido como objetivo identificar nuevas firmas de metabolitos en sangre, es decir, nuevos biomarcadores que podrían ayudar en el cribado de la población del cáncer de mama, así como para el diagnóstico de cáncer de mama en un sujeto.

[0023] En vista de los problemas mencionados anteriormente existentes en la técnica, el objeto subyacente de la presente invención es la provisión de nuevos biomarcadores para evaluar el cáncer de mama, cuyos marcadores permiten la detección y el diagnóstico del cáncer de mama ya en una etapa temprana de la progresión de la enfermedad y con gran precisión y fiabilidad. De manera óptima, el marcador debe ser fácilmente detectable en una muestra biológica, tal como en la sangre, y su nivel debe estar consistentemente relacionado con la etapa del cáncer de mama. Además, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para evaluar el cáncer de mama en una muestra biológica, lo que permite un rendimiento rápido, conveniente y de alto rendimiento.

[0024] Con el fin de resolver los objetos subyacentes de la presente invención, los inventores basan sus investigaciones en la metabolómica, ya que podría dar una idea de los cambios bioquímicos que tienen lugar en el transcurso del desarrollo del cáncer de mama y ofrecen varios biomarcadores novedosos y potencialmente mejores. Los inventores encontraron que se proporciona una imagen más completa de todas las vías de metabolómica y mecanismos implicados en el cáncer de mama cuando se utiliza un panel de metabolitos que son alterados con el progreso del cáncer de mama en lugar de emplear las técnicas de cribado realizadas en la técnica, tales como la mamografía u otras técnicas de formación de imágenes.

Características de la invención

[0025] Por lo tanto, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas, proporciona nuevos biomarcadores (es decir, un nuevo conjunto de biomarcadores) adecuados para la evaluación del cáncer de mama, particularmente en una etapa temprana de la enfermedad. Además, la presente invención también proporciona un procedimiento para evaluar el cáncer de mama en un sujeto mamífero sobre la base de los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores, tal como se describen en el presente documento, así como un kit adaptado para llevar a cabo el procedimiento.

Breve descripción de las figuras

[0026] En la memoria se hace referencia a las Figuras 1-15, que muestran ejemplos de acuerdo con la invención del aumento o disminución de un biomarcador metabólico en el progreso del cáncer de mama.

Figura 1A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1).

Figura 1B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1).

Figura 2A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1).

Figura 2B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1).

Figura 3A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1).

- Figura 3B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1).
- Figura 4A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1).
- 5 **Figura 4B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1).
- Figura 5A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-acilo C28:1 (PC aa C28:1).
- Figura 5B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos
- 10 glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-acilo C28:1 (PC aa C28:1).
- Figura 6A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1).
- Figura 6B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1).
- 15 **Figura 7A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y glutamina (Gln).
- Figura 7B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y glutamina (Gln).
- Figuras 8A y 8B:** conjunto de validación final con cáncer de mama en comparación con los controles.
- 20 **Figura 9A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento utilizando DMA total, PC ae C42:0, glutamina (Gln) y Dodecanodioilcarnitina (C12-DC), comparando los pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con un 35-78% de respuesta.
- Figura 9B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación utilizando DMA total, PC ae C42:0, glutamina (Gln) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con
- 25 Enfermedad Estable/progresión.
- Figura 10A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento utilizando DMA total, PC ae C30:0, glutamina (Gln) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con un 35-78% de respuesta.
- Figura 10B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación utilizando DMA total, PC ae
- 30 C30:0, glutamina (Gln) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con Enfermedad Estable/progresión.
- Figura 11A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento utilizando DMA total, PC ae C42:0, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con baja respuesta.
- 35 **Figura 11B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación utilizando DMA total, PC ae C42:0, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con Enfermedad Estable/Progresión (SDPR).
- Figura 12A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento utilizando DMA total, PC ae C32:2, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y 80-92%.
- 40 **Figura 12B:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación utilizando DMA total, PC ae C32:2, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa y pacientes con enfermedad estable/progresión.
- Figura 13:** Identificación de los subtipos específicos de cáncer de mama usando los metabolitos representados en la Tabla 11. El análisis de la curva ROC muestra la identificación de pacientes con tumores luminales A/B y pacientes
- 45 con Triple negativos y HER2 positivos.
- Figura 14:** Identificación de los subtipos específicos de cáncer de mama usando los metabolitos representados en la Tabla 12. El análisis de la curva ROC muestra la identificación de pacientes con tumores HER2 (LumB-HER2 + HER2) y pacientes con Triple negativos y Luminales A/B.
- Figura 15:** Identificación de los subtipos específicos de cáncer de mama usando los metabolitos representados en la Tabla 13. El análisis de la curva ROC muestra la identificación de pacientes con Triple negativos y HER2-positivo/Luminales A/B.
- 50

Descripción de las realizaciones preferidas

- 55 **[0027]** Al emplear los (conjuntos de) biomarcadores específicos y los procedimientos de acuerdo con la presente invención ha sido posible evaluar el cáncer de mama con una mejor precisión y fiabilidad.
- [0028]** "Evaluación" en el sentido de la presente invención significa el cribado de sujetos que potencialmente padecen cáncer de mama, el diagnóstico del cáncer de mama en sujetos y la monitorización de la progresión de la
- 60 enfermedad, en particular la detección y marcaje de la enfermedad en las diferentes etapas y/o subclasificación del tumor o tumores. Además, "evaluación" abarca la predicción de si un paciente que sufre de cáncer de mama es probable que responda a la quimioterapia, en particular a la quimioterapia neoadyuvante. Además, "evaluación" se refiere a la determinación y caracterización de reflexión bioquímica de la actividad tumoral del cáncer de mama. Además "evaluación" en el sentido de la presente invención significa la posibilidad de identificar
- 65 positivamente un subtipo de tumor de cáncer de mama en un paciente y de discriminar entre ciertos tumores de cáncer de mama de acuerdo a sus subtipos intrínsecos.

[0029] Sorprendentemente, se ha logrado en la presente invención proporcionar biomarcadores o conjuntos de biomarcadores mediante la medición de la cantidad y/o proporciones de ciertos metabolitos en muestras, tales como muestras de sangre, de sujetos que posibilitan el cribado y el diagnóstico de cáncer de mama de una manera
5 mejorada y en una etapa temprana de la enfermedad y permiten una predicción más precisa y fiable de si un paciente que sufre de cáncer de mama responderá probablemente a quimioterapia, tal como quimioterapia neoadyuvante. En particular, los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente invención posibilitan predecir si un paciente es probable que alcance la respuesta patológica completa (pCR) a la quimioterapia o enfermedad estable y/o progresión (SDPR). Además, sorprendentemente se ha encontrado en la presente invención
10 que los subtipos de tumores de cáncer de mama se pueden distinguir en base de su perfil específico de metabolitos.

[0030] En el contexto de la presente invención respuesta patológica completa (pCR) se define como no residual no invasiva en la mama o nodos (ypTO ypNO), lo que significa la desaparición completa del tumor, después de terminar la quimioterapia, sin ninguna señal residual de cáncer que queda en la mama y nódulos linfáticos. pCR es un punto
15 final sustituto adecuado, en particular para los pacientes que albergan una enfermedad B/HER2-negativo luminal, HER2-positivo o triple negativo. Por lo tanto, la presente invención posibilita identificar los pacientes que tienen más posibilidades de alcanzar l pCR como ypTO ypNO.

[0031] En el contexto de la presente invención la enfermedad estable y/o progresión (SDPR) se define de acuerdo con el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en el Instituto Nacional de Salud. Por lo tanto, los términos "enfermedad estable" y "progresión", se refieren, respectivamente, a un cáncer que no disminuye ni aumenta en la extensión o gravedad o designan a un cáncer que empeora o se propaga en el cuerpo. Ambas situaciones no se desean especialmente después de enfrentarse a meses de regímenes de quimioterapia altamente tóxicos; por lo tanto, ambas posibilidades se combinaron en un único grupo (SDPR) con el fin de predecir los resultados
25 desfavorables.

[0032] De hecho, los biomarcadores de acuerdo con la invención son fácilmente detectables en muestras biológicas, en particular en la sangre, y su nivel está consistentemente relacionado con el grado de cáncer de mama.

[0033] En general, un biomarcador es una herramienta valiosa debido a la posibilidad de distinguir dos o más estados biológicos entre sí, que trabaja como un indicador de un proceso biológico normal, un proceso patogénico o como una reacción a una intervención farmacéutica. Un metabolito es un compuesto de bajo peso molecular (<1 kDa), más pequeño que la mayoría de las proteínas, ADN y otras macromoléculas. Pequeños cambios en la actividad de las proteínas dan lugar a grandes cambios en las reacciones bioquímicas y sus metabolitos (= biomarcador metabólico, mirando en el metabolismo del cuerpo), cuyas concentraciones, flujos y mecanismos de transporte son sensibles a enfermedades y a la intervención farmacológica. Esto permite obtener un perfil individual de sustancias fisiológicas y fisiopatológicas, que refleja tanto la genética como los factores ambientales como la nutrición, la actividad física, microbios del intestino y medicación. Por lo tanto, un biomarcador metabólico proporciona una información más amplia que, por ejemplo, una proteína u hormona, que son biomarcadores, pero
40 no biomarcadores metabólicos.

[0034] En vista de esto, el término "*biomarcador metabólico*" o "*biomarcador*" sin más, tal como se usan en el presente documento, se define como un compuesto adecuado indicador de la presencia y el estado de cáncer de mama, así como del subtipo de tumor, siendo un metabolito o compuesto metabólico que se produce durante
45 procesos metabólicos en el cuerpo de un mamífero. Los términos "biomarcador" y "biomarcador metabólico" se utilizan en general como sinónimos en el contexto de la presente invención y por lo general se refieren a la cantidad de un metabolito o a la relación de dos o más metabolitos. Por lo tanto, el término biomarcador metabólico o biomarcador pretende también comprender proporciones entre dos o más metabolitos.

[0035] El término "*cantidad*" típicamente se refiere a la concentración de un metabolito en una muestra, tal como muestra de sangre, y por lo general se proporciona en mol/l, pero también puede medirse en otras unidades utilizadas típicamente en la técnica, tales como g/l, mg/l u otros. El término "*suma*" normalmente significa la suma de la cantidad de todos los metabolitos, tal como se especifica en la forma de realización respectiva. El término "*relación*" o "*proporción*" normalmente significa la relación de cantidades de los metabolitos tal como se especifica en
55 la forma de realización respectiva.

[0036] El (conjunto de) biomarcador(es) metabólico(s) medido(s) de acuerdo con la presente invención puede(n) comprender las clases de metabolitos (es decir, analitos) de aminoácidos y aminos biogénicas, acilcarnitinas, hexosas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos, tal como se enumeran en las Tablas 1 a 5 en el presente documento a
60 continuación. Las definiciones de estas clases son conocidas por el experto, sin embargo, los miembros preferidos de estas clases se resumen en las Tablas 1 a 5 a continuación. Además, las aminos biogénicas de la Tabla 1 a continuación se entienden como un grupo de compuestos biológicamente activos de origen natural derivados por descarboxilación enzimática de los aminoácidos naturales. Una sustancia biogénica es una sustancia proporcionada por procesos de la vida, y las aminos biogénicas contiene un grupo amina.

65

[0037] Preferiblemente, el (conjunto de) biomarcador(es) metabólico(s) medidos de acuerdo con la presente invención comprende la combinación de biomarcadores tal como se especifica en las reivindicaciones.

[0038] Sorprendentemente, se ha encontrado que la medición de un conjunto de biomarcadores que comprenden estas clases de metabolitos, es decir, la medición de la cantidad y/o proporciones de ciertos metabolitos indicativos, permite la detección y/o diagnóstico de cáncer de mama de una manera mejorada y a una etapa temprana de la enfermedad, permite la predicción de la respuesta terapéutica a la quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama, permite evaluar la reflexión bioquímica de la actividad tumoral del cáncer de mama, y permite la subclasificación entre los subtipos intrínsecos de tumores de cáncer de mama.

[0039] Si se omite un metabolito o una clase de metabolitos, tal como se especifica para la respectiva combinación de biomarcadores o si el número de los mismos se reduce, la evaluación del cáncer de mama se vuelve menos sensible y menos fiable. Esto se aplica particularmente para las primeras etapas de la enfermedad que no son detectables de forma fiable en absoluto de acuerdo con procedimientos conocidos utilizando biomarcadores conocidos. De hecho, la medición de los metabolitos contenidos en los respectivos conjuntos de biomarcadores al mismo tiempo permite una evaluación más precisa y más fiable de cáncer de mama, habitualmente con una sensibilidad de preferiblemente más de 80%, más preferiblemente más de 90%, aún más preferiblemente más de 98% y lo más preferiblemente 100%. Tal hecho ni se ha descrito ni es obvio a partir de la técnica anterior.

[0040] Además, los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, permitirán una evaluación más fiable y precisa de cáncer de mama con una especificidad de más de 80%, más preferiblemente más del 85%, aún más preferiblemente más de 90 % y lo más preferiblemente 100%.

[0041] Además, el conjunto de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento permite una evaluación más fiable del cáncer de mama con un valor predictivo positivo (VPP) de más de 40%, más preferiblemente más de 50%, aún más preferiblemente más de 60% y más preferiblemente más de 80%.

[0042] Además, el conjunto de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, permite una evaluación más fiable del cáncer de mama con un valor predictivo negativo (VPN) de más de 80%, más preferiblemente más de 90%, aún más preferiblemente más de 98% y lo más preferiblemente 100%.

[0043] En una realización preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, permite una evaluación más fiable del cáncer de mama con una sensibilidad del 100% y un VPN del 100%.

[0044] El significado de los términos "sensibilidad", "especificidad", "valor predictivo positivo" y "valor predictivo negativo" se conoce normalmente en la técnica y se definen en el contexto de la presente invención de acuerdo con el "*Teoría del Valor Predictivo*", establecido por la Universidad de Iowa, EE.UU.

[0045] En esta teoría, el valor de diagnóstico de un procedimiento se define por su sensibilidad, especificidad, valor predictivo y la eficiencia. Las fórmulas se resumen a continuación.

[0046] La sensibilidad de una prueba es el porcentaje de todos los pacientes con enfermedad presente que tienen un resultado positivo. TP = Prueba positiva; FN = Falso negativo

$$(TP/(TP + FN)) \times 100 = \% \text{ de sensibilidad}$$

[0047] La especificidad de una prueba es el porcentaje de todos los pacientes sin la enfermedad que tienen una prueba negativa. TN = Prueba negativa; FP = Falso positivo

$$(TN/(FP + TN)) \times 100 = \% \text{ de Especificidad}$$

[0048] El valor predictivo de una prueba es una medición (%) de las veces en que el valor (positivo o negativo) es el valor verdadero, es decir, el porcentaje de todas las pruebas positivas que son verdaderos positivos es el valor predictivo positivo.

$$(TP/(TP + FP)) \times 100 = \% \text{ de valor predictivo de un resultado positivo}$$

$$(TN/(FN + TN)) \times 100 = \% \text{ de valor predictivo de un resultado negativo}$$

[0049] El rendimiento de biomarcadores pueden además evaluarse mediante la determinación de las relaciones de probabilidad positiva y negativa (LR) usadas en este documento durante el análisis estadístico univariante.

LR	Interpretación
> 10	Incremento amplio y a menudo concluyente en la probabilidad de enfermedad
5-10	Incremento moderado en la probabilidad de enfermedad
2-5	Pequeño incremento en la probabilidad de enfermedad
1-2	Incremento mínimo en la probabilidad de enfermedad
1	Sin cambio en la probabilidad de enfermedad
0,5-1,0	Descenso mínimo en la probabilidad de enfermedad
0,2-0,5	Descenso pequeño en la probabilidad de enfermedad
0,1-0,2	Descenso moderado en la probabilidad de enfermedad
<0,1	Descenso amplio y a menudo concluyente en la probabilidad de enfermedad

[0050] En una realización más preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, permite una evaluación más fiable del cáncer de mama con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 85% o más y un VPN del 100%.

5

[0051] En una realización más preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, permite una evaluación más fiable del cáncer de mama con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 90% o más, un VPP del 80% o más y un VPN del 100%.

10 **[0052]** En la realización más preferida, el conjunto de biomarcadores de la presente invención, tal como se describe en el presente documento, permite una evaluación más fiable del cáncer de mama con una sensibilidad del 100%, una especificidad del 100%, un VPP del 100%, y un VPN de 100%.

[0053] Como se mencionó anteriormente, la enfermedad a evaluar es cáncer de mama. Preferiblemente, es cáncer de mama en las etapas I, II, III o IV, más preferiblemente cáncer de mama en la etapa III, tal como la etapa III a, b o c. La definición de las etapas clínicas del cáncer de mama se define por el American Joint Committee on Cancer (AJCC) del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos en el Instituto Nacional de Salud (cf. Breast En: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual 7ª ed Nueva York, Nueva York: Springer, 2010, pág. 347-76). El sistema de estadificación proporciona una estrategia para agrupar los pacientes con respecto al pronóstico. Las decisiones terapéuticas se formulan en parte de acuerdo con las categorías de estadificación pero principalmente de acuerdo con el tamaño del tumor, estado de los ganglios linfáticos, niveles de receptor de estrógeno y los niveles de receptores de progesterona en el tejido tumoral, estado del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2/neu) de estado, estado menopáusico, y la salud general del paciente.

25 **[0054]** La muestra biológica se obtiene de un mamífero, preferentemente de un ratón, una rata, una cobaya, un perro, un minicerdo, o un ser humano, lo más preferiblemente humano, aún más preferiblemente de una mujer. La muestra biológica preferiblemente es la sangre, sin embargo, cualquier otra muestra biológica conocida para el experto, que permita las mediciones de acuerdo con la presente invención, también es adecuada. La muestra de sangre es típicamente sangre completa, suero o plasma, en la que se prefiere plasma sanguíneo. También se aceptan muestras secas recogidas en filtro de papel. Por lo tanto, los procedimientos de acuerdo con la invención típicamente están in vitro procedimientos.

[0055] Para la medición de las concentraciones de metabolitos en la muestra biológica, se emplea un procedimiento analítico cuantitativo, tal como cromatografía, espectroscopia, y espectrometría de masas, mientras que la espectrometría de masas es particularmente preferida. La cromatografía puede comprender CG, CL, HPLC, y UHPLC; espectroscopia puede comprender UV/Vis, IR y RMN; y analizadores/espectrometría de masas pueden comprender ESI-QqQ, ESI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF y MALDI-TOF-TOF. Más preferiblemente, los analizadores/espectrometría de masas comprende analizadores de masas de cuadrupolo, analizadores de masas de trampa de iones, analizadores de masas de TOF (tiempo de vuelo), analizador de masas Orbitrap, analizador de masas de sector magnético, analizador de masas de sector electrostático, resonancia de ciclotrón de iones (ICR) y combinaciones de analizadores de masa, incluyendo cuadrupolo único (Q) y triple cuadrupolo (QqQ), QqTOF, TOF-TOF, Q-Orbitrap. Se prefiere el uso de espectrometría de masas en tándem con FIA y HPLC.

[0056] Las abreviaturas son como las siguientes: CG = cromatografía de gases, EC = electroforesis capilar, CL = cromatografía de líquidos, HPLC = cromatografía líquida a alta presión, UHPLC = cromatografía líquida a ultra alta presión, UV-Vis = Ultravioleta-Visible, IR = infrarrojo, NIR = infrarrojo cercano, RMN = resonancia magnética nuclear, ESI = ionización por electrospray, MALDI = desorción/ionización mediante láser asistida por matriz, TOF = Tiempo de vuelo, APCI = ionización química a presión atmosférica, QqQ = configuración de triple cuadrupolo también conocido como Q1Q2Q3 (cuadrupolos Q1 y Q3 son filtros de masas y Q2 es un cuadrupolo que no separa masas).

50

[0057] Para medir las cantidades de metabolito, se utiliza metabolómica dirigida para cuantificar los metabolitos en la muestra biológica, incluyendo las clases de analitos de aminoácidos, aminos biogénicas, acilcarnitinas, hexosas, esfingolípidos y glicerofosfolípidos. La cuantificación se realiza utilizando patrones internos marcados isotópicamente y se determinó mediante los procedimientos como se describe anteriormente. Una lista de los analitos, incluyendo sus abreviaturas (códigos BC) que son adecuados como metabolitos para medir de acuerdo con la invención se indican en las siguientes Tablas.

55

Tabla 1: Aminoácidos y aminas biogénicas (μM)

Código BC	Analito
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
Cit	Citrulina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lys	Lisina
Met	Metionina
Orn	Ornitina
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Ac-Orn	Acetilornitina
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
SDMA	Dimetilarginina simétrica
DMA total	Dimetilarginina total
alfa-AAA	ácido alfa-aminoadípico
Carnosina	Carnosina
Creatinina	Creatinina
Histamina	Histamina
Kinurenina	Kinurenina
Met-SO	Metioninasulfóxido
Nitro-Tyr	Nitrotirosina
OH-Pro	Hidroxiprolina
PEA	Feniletilamina
Putrescina	Putrescina
Sarcosina	Sarcosina
Serotonina	Serotonina
Espermidina	Espermidina
Espermina	Espermina
Taurina	Taurina

Tabla 2: Acilcarnitina (μM)

Código BC	Analito
C0	Carnitina
C2	Acetilcarnitina
C3	Propionilcarnitina
C3:1	Propenoilcarnitina
C3-OH	Hidroxipropionilcarnitina
C4	Butirilcarnitina
C4:1	Butenilcarnitina
C4-OH (C3-DC)	Hidroxibutirilcarnitina
C5	Valerilcarnitina
C5:1	Tigililcarnitina
C5:1-DC	Glutaconilcarnitina
C5-DC (C6-OH)	Glutarilcarnitina* (hidroxhexanoilcarnitina)
C5-M-DC	Metilglutarilcarnitina
C5-OH (C3-DC-M)	Hidroxivalerilcarnitina (metilmalonilcarnitina)
C6 (C4:1-DC)	Hexanoilcarnitina (fumarilcarnitina)
C6:1	Hexenoilcarnitina
C7-DC	Pimelilcarnitina

C8	Octanoilcarnitina
C9	Nonailcarnitina
C10	Decanoilcarnitina
C10:1	Decenoilcarnitina
C10:2	Decadienilcarnitina
C12	Dodecanoilcarnitina
C12:1	Dodecenoilcarnitina
C12-DC	Dodecanodioilcarnitina
C14	Tetradecanoilcarnitina
C14:1	Tetradecenoilcarnitina
C14:1-OH	hidroxitetradecenoilcarnitina
C14:2	Tetradecadienilcarnitina
C14:2-OH	Hidroxitetradecadienilcarnitina
C16	Hexadecanoilcarnitina
C16:1	Hexadecenoilcarnitina
C16:1-OH	Hidroxihexadecenoilcarnitina
C16:2	Hexadecadienilcarnitina
C16:2-OH	Hidroxihexadecadienilcarnitina
C16-OH	Hidroxihexadecanoilcarnitina
C18	Octadecanoilcarnitina
C18:1	Octadecenoilcarnitina
C18:1-OH	Hidroxi octadecenoilcarnitina
C18:2	Octadecadienilcarnitina
C10:1	Decenoilcarnitina
C10:2	Decadienilcarnitina
C12	Dodecanoilcarnitina
C12:1	Dodecenoilcarnitina
C12-DC	Dodecanodioilcarnitina
C14	Tetradecanoilcarnitina
C14:1	Tetradecenoilcarnitina
C14:1-OH	Hidroxitetradecenoilcarnitina
C14:2	Tetradecadienilcarnitina
C14:2-OH	Hidroxitetradecadienilcarnitina
C16	Hexadecanoilcarnitina

Tabla 3: Hexosas (mM)

Código BC	Analito
H1	Hexosa

Tabla 4: Esfingolípidos (mM)

Código BC	Analito
SM (OH) C14:1	Hidroxiesfingomielina con suma de residuos de acilo C14:1
SM (OH) C16:1	Hidroxiesfingomielina con suma de residuos de acilo C16:1
SM (OH) C22:1	Hidroxiesfingomielina con suma de residuos de acilo C22:1
SM (OH) C22:2	Hidroxiesfingomielina con suma de residuos de acilo C22:2
SM (OH) C24:1	Hidroxiesfingomielina con suma de residuos de acilo C24:1
SM C16:0	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C16:0
SM C16:1	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C16:1
SM C18:0	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C18:0
SM C18:1	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C18:1
SM C20:2	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C20:2
SM C22:3	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C22:3
SM C24:0	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C24:0
SM C24:1	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C24:1
SM C26:0	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C26:0
SM C26:1	Esfingomielina con suma de residuos de acilo C26:1

Tabla 5: Glicerofosfolípidos (mM)

Código BC	Analito
lisoPC a C14:0	Lisofosfatidilcolina con residuo de acilo C14:0

[illegible]

PC ae C36:3	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C36:3
PC ae C36:4	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C36:4
PC ae C36:5	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C36:5
PC ae C38:0	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:0
PC ae C38:1	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:1
PC ae C38:2	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:2
PC ae C38:3	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:3
PC ae C38:4	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:4
PC ae C38:5	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:5
PC ae C38:6	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C38:6
PC ae C40:1	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C40:1
PC ae C40:2	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C40:2
PC ae C40:3	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C40:3
PC ae C40:4	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C40:4
PC ae C40:5	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C40:5
PC ae C40:6	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C40:6
PC ae C42:0	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C42:0
PC ae C42:1	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C42:1
PC ae C42:2	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C42:2
PC ae C42:3	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C42:3
PC ae C42:4	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C42:4
PC ae C42:5	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C42:5
PC ae C44:3	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C44:3
PC ae C44:4	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C44:4
PC ae C44:5	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C44:5
PC ae C44:6	Fosfatidilcolina con suma de residuos de acil-alquilo C44:6

[0058] Otras formas de realización preferidas de la presente invención se describen a continuación. Sin embargo, su combinación con las características descritas más arriba no se pretende que esté excluida.

5 Cribado y/o diagnóstico de cáncer de mama

[0059] Los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente invención se utilizan para el cribado de sujetos, tales como pacientes humanos, que potencialmente sufren de cáncer de mama, y el diagnóstico de cáncer de mama en estos sujetos. Sorprendentemente, se ha encontrado en la presente invención que los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores, tal como se describe en el presente documento, son particularmente útiles para un cribado rápido, fácil y de alto rendimiento de un gran número de sujetos, tales como pacientes humanos, y para el diagnóstico de cáncer de mama a partir de muestras de sangre de estos sujetos con una mayor precisión de los resultados. Por lo tanto, en esta realización la evaluación comprende el cribado y/o el diagnóstico de cáncer de mama en un sujeto mamífero, preferiblemente en un ser humano.

[0060] Por lo tanto, la presente invención se dirige al uso de una combinación de metabolitos que comprende al menos

(a) un aminoácido seleccionado de glutamina, glutamato y serina, y un lípido, o

(b) glutamina y glutamato,

como un conjunto de biomarcadores para el cribado y/o el diagnóstico del cáncer de mama.

[0061] La presente descripción se dirige además a un procedimiento para el cribado y/o diagnóstico de cáncer de mama en un sujeto mamífero o una población de sujetos mamíferos, comprendiendo el procedimiento medir en una muestra de sangre obtenida del sujeto, la cantidad de al menos

(a) un aminoácido seleccionado de glutamina, glutamato y serina, y un lípido, o

(b) glutamina y glutamato.

[0062] A pesar de la precisión y la fiabilidad del cribado y/o el diagnóstico, tal como se determina por los parámetros de uno o más de especificidad, sensibilidad, VPP y VPN, mediante el uso de la combinación de biomarcadores especificada anteriormente ya se ha mejorado en gran medida en comparación con las técnicas de la técnica anterior, tales como la mamografía, la precisión y la fiabilidad se pueden mejorar aún más mediante el uso de uno o más, preferiblemente dos o más, más preferiblemente tres o más, metabolitos adicionales.

[0063] Por lo tanto, en una realización preferida, el conjunto de biomarcadores comprende además uno o más aminoácidos adicionales, tales como los incluidos en la Tabla 1. Los aminoácidos adicionales se seleccionan preferiblemente de aminoácidos glucogénicos/cetogénicos, tales como glicina, cisteína, alanina, arginina, prolina, aspartato, asparagina, metionina, isoleucina, leucina, lisina, fenilalanina, treonina, tirosina y triptófano, lo más preferiblemente asparagina y aspartato.

[0064] Además, el lípido se selecciona preferiblemente de esfingolípidos y glicerolípidos, tales como glicerofosfolípidos, por ejemplo, uno o más de los lípidos incluidos en las Tablas 4 y 5. Además, preferentemente, el lípido se deriva del ácido araquidónico, preferiblemente lípidos derivados de ácido araquidónico que contienen 38 o más átomos de carbono, y lo más preferiblemente se selecciona de fosfatidilcolina acil-alquilo poliinsaturada araquidónica, fosfatidilcolina acil-alquilo monoinsaturada araquidónica y fosfatidilcolina acilalquilo saturada araquidónica.

[0065] En una realización preferida adicional, la combinación de metabolitos comprende además uno o más de una esfingomielina y glutaconil carnitina.

[0066] Además, el procedimiento para el cribado y/o diagnóstico de cáncer de mama preferiblemente adicionalmente comprende medir la cantidad, o la relación de las cantidades, de uno o más, preferiblemente dos o más, más preferiblemente tres o más de los siguientes:

- 15 - suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo poliinsaturadas araquidónicas,
- suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo monoinsaturadas araquidónicas,
- suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo saturadas araquidónicas,
- relación de la suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo poliinsaturadas araquidónicas/suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo monoinsaturadas araquidónicas,
- 20 - relación de suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo monoinsaturadas araquidónicas/suma de fosfatidilcolinas acil-alquilo saturadas araquidónicas,
- fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1,
- fosfatidilcolina acil-alquilo C28:1,
- esfingomielina C24:1 y/o esfingomielina C18:0 y
- 25 - glutaconilcarnitina.

[0067] Opcionalmente, el procedimiento comprende la etapa adicional de identificar, sobre la base de las cantidades de metabolitos y relaciones de metabolitos medidos, aquellos sujetos que sufren de cáncer de mama y además tratar preferiblemente cáncer de mama en estos sujetos, por ejemplo, mediante quimioterapia.

[0068] Como el procedimiento de esta realización puede llevarse a cabo a partir de muestras de sangre, el procedimiento aumenta en gran medida la complacencia del sujeto en comparación con técnicas de cribado anteriores, tales como la mamografía. En particular, el procedimiento aumenta en gran medida la fiabilidad y la sensibilidad de los resultados de cribado, en particular, reduce el número de resultados de falsos positivos y falsos negativos, y consume menos tiempo, y por lo tanto se puede realizar con un elevado número de pacientes.

[0069] Además, el procedimiento aumenta en gran medida la complacencia del sujeto en comparación con técnicas de cribado anteriores, tales como la mamografía. En particular, el procedimiento aumenta en gran medida la fiabilidad y la sensibilidad de los resultados de cribado, en particular, reduce el número de resultados de falsos positivos y falsos negativos, y consume menos tiempo.

Kit

[0070] Además, la invención se dirige también a un kit adaptado para llevar a cabo los procedimientos, tal como se describen anteriormente, en el que el kit comprende un dispositivo cuyo dispositivo contiene uno o más pocillos y uno o más insertos impregnados con al menos un patrón interno. Dicho dispositivo se describe en detalle en los documentos WO 2007/003344 y WO 2007/003343.

[0071] Los siguientes ejemplos describen adicionalmente y aclaran la presente invención sin pretender limitar el alcance de ninguna manera.

Ejemplos

Información general:

Pacientes y procedimientos

[0072] Se incluyeron un total de 64 muestras de plasma de mujeres con cáncer de mama en fase III con ningún tratamiento anterior en paralelo a tres conjuntos de controles. El primero de ellos con 93 mujeres sanas se utilizó durante la fase de descubrimiento. El segundo fue analizado en un conjunto de validaciones independientes con 30 muestras de plasma de mujeres con cáncer de mama, así como 24 controles. Por último, el tercero con 616 voluntarios, siendo 524 participantes sanos junto con 92 muestras (siendo 55 pacientes con cáncer de colon y 37 de pacientes de VIH) para comprobar la especificidad de los resultados.

[0073] Las dimensiones iniciales del tumor tenían una media de 7,09 cm (3,5 cm a 14 cm) y se calcularon utilizando mediciones clínicas y radiológicas antes de la cirugía. Se evaluó el volumen final del tumor, directamente

sobre el producto de la cirugía, por un patólogo experto y se definió pCR como ninguna evidencia histopatológica de cualquier invasivo residual y o no invasivo residual en mama o nodos (ypT0/ypN0). Los pacientes, con al menos una respuesta del 90% en mama, sin tumor residual en la axila, se denominaron entonces "de alta respuesta" (Hresp) y se compararon con los pacientes restantes denominados "de baja respuesta" (Lresp). Con el fin de identificar los metabolitos asociados con pCR, los primeros 29 pacientes incluidos se utilizaron para el descubrimiento de marcadores predictivos durante el entrenamiento y el siguiente 30 era accesible como una configuración de validación independiente.

[0074] Para identificar metabolitos relacionados con enfermedad estable/progresión (SDPR), todos los pacientes se incluyeron con una respuesta clínica máxima de 30%, que comprendía 12 enfermedad estable y 7 progresiones. Se ensambló la configuración de entrenamiento usando los primeros 21 pacientes admitidos durante el descubrimiento de marcadores metabólicos predictivos y los restantes 38 pacientes estaban disponibles como una configuración de validación independiente.

[0075] Con el fin de probar si los modelos predictivos se correlacionaban no sólo, a altas y bajas tasas de respuesta, sino, en cambio, con diferentes grados de respuesta del tumor, los resultados fueron validados mediante el análisis de metabolitos específicos de acuerdo con grados progresivos de la respuesta tumoral (0 %, 30%, 30-75%, 75-90%, 90-99% y 100%) o SDPR (0-30%), Lresp (30-90%), Hresp (> 90%), pCR (100 %). En paralelo, se intentó apoyar la confirmación adicional sobre la naturaleza oncogénica de los metabolitos identificados, por lo tanto, también se ensayaron en un gradiente progresivo de los volúmenes tumorales iniciales empezando a partir de los grupos con el tamaño del tumor de 4 cm hasta 12 cm.

[0076] Por último, con el fin de evaluar si los metabolitos de la sangre podrían ser predictivos de la respuesta a la quimioterapia, a la vista de los subtipos individuales de cáncer de mama, los pacientes fueron divididos, primero, en sus subtipos intrínsecos de cáncer según Minckwitz et al (2012) y segundo de acuerdo con las tasas de respuesta a los tumores en tumores altamente sensibles (Hresp, más del 75%) y poco sensibles (Lresp, menos de 75%).

Mediciones de metabolitos

[0077] 1. El análisis MS/MS explorador por "shotgun" no dirigido se realizó en un servicio independiente en el Laboratorio de AB-Sciex situado en Sao Paulo, SP, Brasil. Se inyectaron muestras de plasma en un sistema de CL Shimadzu Prominence acoplado a un instrumento espectrómetro de masas AB-Sciex 5600 Triple TOF con una velocidad de barrido de adquisición de 100 espectros/s y precisión de masa estable de ~ 2 ppm. Se realizó un análisis de inyección de flujo (FIA) usando una elución isocrática con metanol/agua (90/10) con 5,0 mM de formiato de amonio. El caudal y los volúmenes de inyección fueron 0.025 ml/min y 50 µl, respectivamente. No se realizó optimización de la fuente de iones o potencial de desagrupación (50 V y -40 V). Se aplicaron los siguientes parámetros de ionización: CUR = 20 psi, GS1 = 20 psi, GS2 = 15 psi, Temp = 250 ° C, 5.000 V (- 4000V). Un intervalo de rastreo de MS de m/z 100 a 1200 con un tiempo la acumulación de 0,25 s y rastreo de iones producto de m/z 100 a 1200 y tiempo de acumulación de 0,03 s fueron los parámetros adoptados durante el estudio y rastreos dependientes, respectivamente.

2. El perfil de *metabolómica/lipidómica cuantitativa (ESI-MS/MS) dirigida* se realizó en una configuración de validación independiente con 34 muestras de plasma de mujeres con cáncer de mama, así como 616 controles, en una base de dos servicios con pago independientes usando una plataforma de metabolómica cuantitativa de Biocrates Life Sciences AG, Innsbruck, Austria y Quest Diagnostics Nichols Institute San Juan Capistrano, CA, EE.UU. La técnica cuantitativa de MS/MS cuantitativa (ESI) dirigida se describe en detalle en el documento US 2007/0004044. Brevemente, se utiliza un esquema de perfiles dirigidos para cribar cuantitativamente metabolitos de molécula pequeña conocidos utilizando monitorización de reacción múltiple, pérdida neutra y rastreo de iones precursores. La cuantificación de los metabolitos de la muestra biológica se consigue mediante la referencia a patrones internos apropiados y el procedimiento se ha demostrado en conformidad con 21CFR (Código de Regulaciones Federales), Parte 11, lo que implica la prueba de reproducibilidad dentro de un intervalo de error determinado. Las concentraciones de todos los metabolitos analizados se indicaron en µM.

Panel de metabolitos

[0078] En total, se han detectado 183 metabolitos diferentes, siendo 40 acilcarnitinas, 19 aminoácidos proteinógenos, ornitina y citrulina, 19 aminos biogénicas, suma de hexosas, 76 fosfatidilcolinas, 14 lisofosfatidilcolinas y 15 esfingomielinas.

[0079] Los glicerofosfolípidos se diferencian adicionalmente con respecto a la presencia de enlaces éster (a) y éter (b) en el resto de glicerol, donde dos letras (aa = diacilo, ae = acil-alquilo, ee = dialquil) indican que dos posiciones de glicerol están unidos a un residuo de ácido graso, mientras que una sola letra (a = acilo o e = alquilo) indica la presencia de un solo residuo de ácido graso.

[0080] La composición de cadenas laterales de lípidos se abrevia como Cx:y, donde x indica el número de carbonos en la cadena lateral e y el número de dobles enlaces. Por ejemplo, "PC ae C38:1" indica un

plasmalógeno/plasmenógeno fosfatidilcolina con 38 átomos de carbono en las dos cadenas laterales de ácidos grasos y un solo doble enlace en uno de ellos.

Análisis de los datos

5

[0081] Se utilizaron casos de entrenamiento para el descubrimiento de marcadores y para identificar cualquier variable clínica que podría estar asociada con la respuesta mediante análisis de regresión logística. La cuantificación de las concentraciones de metabolitos y la evaluación del control de calidad se realizaron con el paquete de software MetIDQ® (BIOCRATES Life Sciences AG, Innsbruck, Austria). Los patrones internos sirven de referencia para los cálculos de concentración de metabolito. A continuación, se exportó un archivo XLS que contenía nombres de muestras, nombres de metabolitos y concentración de metabolito con la unidad de $\mu\text{mol/l}$ en plasma.

[0082] Los datos se subieron a continuación al proyecto analítico de base web MetaboAnalyst 2.0 (www.metaboanalyst.ca) y se normalizaron utilizando protocolos de normalización de MetaboAnalyst (Xia et al 2012) para análisis univariante y multivariante, selección de características dimensionales elevadas, agrupamiento y clasificación supervisada, enriquecimiento funcional, así como análisis de la vía metabólica.

[0083] Los datos también se importaron a ROCCT (ROC Curve Explorer & Tester) disponible en <http://www.rocet.ca/ROCCT/> para la generación de curvas Receiver Operating Characteristic (ROC) univariante y multivariante (ROC) obtenidas a través de Support Vector Machine (SVM), Partial Least Squares-Discriminant Analysis (PLS-DA) y Random Forests.

[0084] Se generaron curvas mediante validación cruzada de Monte-Carlo (MCCV) usando submuestreo equilibrado donde se utilizaron dos tercios (2/3) de las muestras para evaluar la importancia de características. Las características más significativas fueron utilizadas a continuación para construir modelos de clasificación, que fueron validados en la tercera parte de las muestras que quedaron fuera. El mismo procedimiento se repitió varias veces para calcular el rendimiento y el intervalo de confianza de cada modelo.

Definición de términos:

30

[0085]

(1) Regulación por incremento y por descenso: una regulación significa un aumento en la concentración de un metabolito, por ejemplo, un aumento de la tasa a la que se produce la reacción bioquímica debido a, por ejemplo, un cambio en la actividad enzimática. Para una regulación por descenso, es lo contrario.

35

(2) Prueba t: La prueba t es una prueba de hipótesis estadística y la utilizada es la que está integrada en el software MarkerView y se aplica a todas las variables en la tabla y determina si la media para cada grupo es significativamente diferente dada la desviación estándar y el número de muestras, por ejemplo, para saber si existe una diferencia real entre las medias (promedios) de dos grupos diferentes.

40

(3) valor p: El valor p es la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se observó, suponiendo que la hipótesis nula (la hipótesis sin ningún cambio o efecto) es verdadera. El valor p es siempre positivo y cuanto más pequeño es el valor menor es la probabilidad de que sea casualidad. Un valor de p de 0,05 o menos rechaza la hipótesis nula al nivel de 5%, lo que significa que sólo el 5% de las veces el cambio es una casualidad. Este es el nivel establecido en nuestras tablas.

45

(4) Log-Cambio de veces: Log-cambio de veces se define como la diferencia entre las concentraciones logarítmicas promedio en cada condición. Esta es una forma de describir cuánto mayor o menor el valor está en un grupo en comparación con otro. Por ejemplo, un log-cambio de veces de 0,3 es "equivalente" a una $\exp(0,3) = 1,34$ aumento del cambio veces en comparación con el control (grupo más sano). Además, un log-cambio de veces de -0,3 es "equivalente" a un $\exp(-0,3) = 0,74 = (1/1,34)$ aumento de cambio de veces en comparación con el control o cambio de veces por disminución de 1,34 a la enfermedad.

50

Resultados:

55

1. Cribado y/o diagnóstico de cáncer de mama

Análisis ROC exploratorio univariante y multivariante

[0086] En primer lugar, se han realizado un Análisis de Componentes Principales (PCA) y análisis de la curva ROC de descubrimiento (30 pacientes y 93 controles) y conjuntos de validación 1 (34 pacientes y 24 controles) y 2 (34 pacientes y 616 controles), que revelaron una excelente fiabilidad de cribado y diagnóstico, tal como se muestra en la siguiente Tabla 6:

Tabla 6: Análisis de correlación entre los metabolitos identificados con cáncer de mama (64 pacientes con cáncer de mama en comparación con 616 controles)

	Fase de descubrimiento:	Fase de validación 1	Fase de validación 2
AUC	0,99 (95% IC: 0,972-1)	0,966 (95% IC: 0,884-1)	0,995 (95% IC: 0,993-0,999)
Valor p (después de 100 permutaciones)	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Sensibilidad (%)	96,67	93,75	100,00
Especificidad (%)	97,89	95,45	98,31
Valor predictivo positivo (%)	93,55	96,77	79,07
Valor predictivo negativo (%)	98,94	91,30	100,00

[0087] El PCA y el análisis PLS-DA de las 64 mujeres incluyó inicialmente la comparación con 616 controles. La existencia de metabolitos sanguíneos altamente discriminativos entre los pacientes con cáncer en comparación con los controles ($p = 0,0245$ después de prueba con 2000 permutaciones) confirmó el análisis PCA durante ambos conjuntos. La estadística de la prueba de permutación se representa valor $p < 5e-04$ después de 2000 rondas de permutaciones (8A). Este resultado confirma, como altamente significativo, el análisis PLS-DA (8B).

[0088] La firma de los metabolitos identificados, utilizado para ANÁLISIS UNIVARIANTE o MULTIVARIANTE, se describen en las Tablas 1 y 2, junto con la prueba t y los estudios de correlación que representan valores p altamente significativos y tasas de descubrimientos falsos (FDR) para todos los metabolitos (Tablas 7 y 8).

Tabla 7:

Metabolito	Correlación con cáncer de mama	Estadística. t	Valor p	FDR
PC aa C40:1	0,84847	16,737	0,0	0,0
PC ae C30:2	0,82801	15,418	0,0	0,0
C5:1-DC/PC ae C42:1	-0,92358	-25,15	3,4194E-47	1,9376E-46
Delta 5-6 PCaeBig*/SM C24:1	-0,92133	-24,741	1,5687E-46	6,667E-46
Delta 5-6 PCaeBig/MUFA (SM)	-0,92014	-24,533	3,4276E-46	1,1654E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM no OH totales	-0,91962	-24,433	4,8167E-46	1,1792E-45
Delta 5-6 PCaeBig/PUFA (SM)	-0,91961	-24,441	4,8556E-46	1,1792E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM C18: 1	-0,91796	-24,16	1,4091E-45	2,9944E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SFA (SM)	-0,91776	-24,128	1,5931E-45	3,0093E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM C16:0	-0,91752	-24,087	1,8563E-45	3,1557E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM C18:0	-0,91578	-23,803	5,5125E-45	8,5194E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM (OH) C16:1	-0,91397	-23,515	1,677E-44	2,3758E-44
C5:1-DC/PC aa C40:3	-0,91344	-23,432	2,3158E-44	3,0283E-44
C5:1-DC/PC aa C40:1	-0,91077	-23,028	1,1257E-43	1,3294E-43
Delta 5-6 PCaeBig/SM C24: 0	-0,9107	-23,017	1,173E-43	1,3294E-43
C5:1-DC/PC aa C40:2	-0,83807	-16,038	1,8752E-30	1,9924E-30
Delta 5-6 PCaeBig/OH-SMs total	-0,81535	-14,703	1,2526E-27	1,2526E-27
* suma PUFA araquidónico PC ea/suma MUFA araquidónico PC ae				

Tabla 8:

	Valor p	-log 10(p)	FDR
C5:1-DC/PC ae C42:1	3,4194E-47	46,466	5,8129E-46
Delta 5-6 PCaeBig*/SM C24:1	1,5687E-46	45,804	1,3334E-45
Delta 5-6 PCaeBig/MUFA (SM)	3,4276E-46	45,465	1,6509E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SMs no OH totales	4,8167E-46	45,317	1,6509E-45
Delta 5-6 PCaeBig/PUFA (SM)	4,8556E-46	45,314	1,6509E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM C18:1	1,4091E-45	44,851	3,869E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SFA (SM)	1,5931E-45	44,798	3,869E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM C16:0	1,8563E-45	44,731	3,9446E-45
Delta 5-6 PCaeBig/SM C18:0	5,5125E-45	44,259	1,0413E-44
Delta 5-6 PCaeBig/SM (OH) C16:1	1,677E-44	43,775	2,851E-44
C5:1-DC/PC aa C40:3	2,3158E-44	43,635	3,5789E-44
C5:1-DC/PC aa C40:1	1,1257E-43	42,949	1,5339E-43
Delta 5-6 PCaeBig/SM C24 0	1,173E-43	42,931	1,5339E-43
PC aa C40:1	6,778E-32	31,169	8,2305E-32
C5:1-DC/aa PC C40:2	1,8752E-30	29,727	2,1252E-30
PC ae C30:2	3,7552E-29	28,425	3,9899E-29
Delta 5-6 PCaeBig/OH-SMs total	1,2526E-27	26,902	1,2526E-27
* suma PUFA araquidónico PC ea/suma MUFA araquidónico PC ae			

5 **[0089]** La evaluación de la curva ROC multivariante obtenida durante los grupos de entrenamiento y de validación para acceder al rendimiento de los resultados para fines de cribado se muestran en la Tabla 6. Los metabolitos identificados segregan con precisión los pacientes de cáncer de los controles con una sensibilidad = 100%, especificidad = 98,31%, valor predictivo positivo (PPV) = 79,09% y valor predictivo negativo (VPN) = 100%.

10 **[0090]** Es importante destacar que, incluso después de 1000 rondas de permutación las firmas permanecieron muy significativas confirmando el análisis de la curva ROC.

[0091] El análisis de correlación no mostró ningún resultado significativo entre la tasa de respuesta tumoral con variables clínicas y patológicas, tal como se muestra en la siguiente Tabla 9.

15

Tabla 9:

Parámetro	Correlación	Valor p
Estado ER	-0,92498	0,48594
Estado PR	-0,0086648	0,94807
Edad	0,064451	0,62769
Estado HER-2	0,01862	0,88868
Grado nuclear	0,090079	0,49747
Volumen inicial del tumor	0,0016361	0,99019

20 **[0092]** Además, los análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento reveló un conjunto mínimo de metabolitos para separar con precisión los pacientes de cáncer de los controles que comprende al menos (a) un amino ácido seleccionado de entre glutamina, glutamato y serina, y un lípido, o (b) glutamina y glutamato. Los resultados obtenidos de los análisis de la curva ROC se muestran en las Figuras 1 a 7.

25 **[0093]** **Figura 1A:** análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Corte = -9,397, Sensibilidad = 1,0 (1-1), Especificidad = 1 (1-1), Relación de

probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,0, Prueba T = 8,0019E-22, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0094] Figura 1B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Corte = -9,397, Sensibilidad = 1,0 (1-1), Especificidad = 0,974 (0,935-1), relación de probabilidad positiva = 38,5, relación de probabilidad negativa = 0,0 Prueba T = 1,2632E-58, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0095] Figura 2A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38: 1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Corte = -6,645, Sensibilidad = 1,0 (1-1), Especificidad = 0,9844 (0,953-1)), Relación de probabilidad positiva= 64,0, relación de probabilidad negativa = 0,0, Prueba T = 9,9636E-31 valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0096] Figura 2B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamina (Gln) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Corte = -6,645, Sensibilidad = 0,9844 (0,953-1), Especificidad = 0,9481 (0,896-0,967), Relación de probabilidad positiva= 18,95, relación de probabilidad negativa = 0,01648, Prueba T = 3,6347E-42, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0097] Figura 3A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Corte = 6,231, Sensibilidad = 1,0 (1-1), Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,0, prueba T = 1,9204E-13, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0098] Figura 3B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C38:1 (PC ae C38:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Corte = 5,575, Sensibilidad = 0,9219 (0,851-0,969), Especificidad = 0,93 (0,885-0,98), Relación de probabilidad positiva= 13,17, relación de probabilidad negativa = 0,08401, Prueba T = 1,6951E-43, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0099] Figura 4A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Corte = 7,468, Sensibilidad = 0,9655 (0,914-1), Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,03448, prueba t = 3,7077E-10, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0100] Figura 4B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos serina (Ser) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Corte = 7,162, Sensibilidad = 0,8906 (0,812-0,969) Especificidad = 0,98 (0,95-1), Relación de probabilidad positiva= 44,53 relación de probabilidad negativa = 0,1116, prueba T = 1,6951E-43, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0101] Figura 5A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-acil C28:1 (PC aa C28:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Corte = -6,119, Sensibilidad = 0,9483 (0,888-1), Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,05172, Prueba T = 4,1972E-20, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0102] Figura 5B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina Acil-acil C28:1 (PC aa C28:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Corte = -6,335, Sensibilidad = 0,9219 (0,859-0,977), Especificidad = 0,83 (0,75-0,9), Relación de probabilidad positiva= 5,423, relación de probabilidad negativa = 0,09413, Prueba T = 2,1657E-26, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0103] Figura 6A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Sensibilidad = 100%, especificidad = 100%, valor predictivo positivo = 100%, Valor predictivo negativo = 100%, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0104] Figura 6B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación usando dos metabolitos glutamato (Glu) y fosfatidilcolina acil-alquilo C42:1 (PC ae C42:1) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Sensibilidad = 100%, especificidad = 99%, valor predictivo positivo = 98,46%, Valor predictivo negativo = 100%, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0105] Figura 7A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y glutamina (Gln) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 11). Corte = -1,101, Sensibilidad = 1,0 (1-1), Especificidad = 1,1 (1-1), Relación de probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,0, prueba T = 9,9058E-17, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0106] Figura 7B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento usando dos metabolitos glutamato (Glu) y glutamina (Gln) con cáncer de mama (n = 64) en comparación con los controles (n = 77). Corte = -1,101, Sensibilidad = 0,9219 (0,851-0,969), Especificidad = 0,93 (0,86-0,97), Relación de probabilidad positiva= 13,17, relación de probabilidad negativa = 0,08401, Prueba T = 4,6268E-40, valor p <0,001 (1000 permutaciones).

[0107] Tal como puede verse por los datos anteriores, la presente invención permite el cribado y el diagnóstico de pacientes con cáncer de mama con una mayor precisión y fiabilidad en comparación con los procedimientos conocidos. Esto puede en particular representarse mediante la siguiente comparación (Tabla 10).

Tabla 10: Comparación de la presente invención con los estudios de la técnica anterior

Parámetro	Estudio presente n = 665	Qui Y et al* n = 80
Sensibilidad	100 %	98,1 %
Especificidad	97,46 %	96,0 %
Valor predictivo positivo	96,97 %	98,1 %
Valor predictivo negativo	100,00 %	96,0 %
Predicción de respuesta a la quimioterapia	Sí	No
Identificación de subtipos intrínsecos	Sí	No
Número mínimo de metabolitos	2	3

*Qui Y. et al., Int. J. Mol. Sci. 2013, 14, 8047-8061

2. Predicción de alta (Hresp) o baja respuesta (SDPR) a la quimioterapia (Ejemplo de referencia):

[0108] Un total de 10 pacientes alcanzaron una respuesta de al menos el 90% (6 en el entrenamiento y 4 en la configuración de validación), entre ellos 7 pacientes alcanzaron una respuesta patológica completa (pCR) definida como ypT0/ypN0. Se observó el porcentaje total de pCR y SDPR en 11,8% (7/59) y 32% (19/59) de los pacientes, respectivamente.

[0109] El análisis de curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento reveló un conjunto mínimo de metabolitos para predecir con exactitud la respuesta a la quimioterapia que comprende al menos un aminoácido seleccionado de serina y glutamina, arginina metilada, una acil carnitina y un lípido. Los resultados obtenidos de los análisis de la curva ROC se muestran en las figuras 9 a 12.

[0110] Figura 9A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento, utilizando DMA total, PC ae C42:0, glutamina (Gln) y Dodecanedioilcarnitina (C12-DC), comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y pacientes con una respuesta del 35-78% (n = 21). Corte = -11,56, Sensibilidad = 1,0 (1-1), Especificidad = 1,0 (1-1), relación de probabilidad positiva = Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,0, Prueba T = 8,553E-6, valor p < 0,001 (1000 permutaciones).

[0111] Figura 9B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación, utilizando DMA total, PC ae C42:0, glutamina (Gln) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y los pacientes con enfermedad estable/progresión (SDPR, n = 22). Corte = -11,56, Sensibilidad = 0,9091 (0,773-1), Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva = Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,09091, Prueba T = 2,5381E-4, valor p < 0,001 (1000 permutaciones).

[0112] Figura 10A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento, utilizando DMA total, PC ae C30:0, glutamina (Gln) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y los pacientes con un 35-78% de respuesta (n = 21). Corte = -10,12, Sensibilidad = 0,7143 (0,571-0,905), Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,2857, prueba T = 8,553E-6, valor p < 0,001 (1000 permutaciones).

[0113] Figura 10B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación, utilizando DMA total, PC ae C30:0, glutamina (Gln) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y los pacientes con enfermedad estable/progresión (SDPR, n = 22). Corte = -10,12, Sensibilidad = 0,773 (0,591-0,955), Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,2273, prueba T = 4,8125E-4, valor p < 0,001 (1000 permutaciones).

[0114] Figura 11A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento, utilizando DMA total, PC ae C42:0, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y pacientes con baja respuesta (n = 52). Corte = 8,416, Sensibilidad = 0,4902 (0,342-0,638) Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= infinito. Relación de probabilidad negativa = 0,5098, prueba T = 0,018905, valor p < 0,001 (100 permutaciones).

[0115] Figura 11B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación, utilizando DMA total, PC ae C42:0, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y los pacientes con enfermedad estable/progresión (SDPR) (n = 22). Corte = -8,412, Sensibilidad = 0,875 (0,625-1), Especificidad = 1,0 (1-1), relación de probabilidad positiva = Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,125, prueba T = 0,013813, valor p < 0,001 (100 permutaciones).

[0116] Figura 12A: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento, utilizando DMA total, PC ae C32:2, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y 80- 92% (n = 8). Corte = 11,38, Sensibilidad = 0,625 (0,375-0,875) Especificidad = 1,0 (1-1), relación de probabilidad positiva = Infinito, relación de probabilidad negativa = 0,375, prueba T = 0,017765, valor p < 0,001 (100 permutaciones).

[0117] Figura 12B: análisis de la curva ROC obtenida durante la configuración de validación, utilizando DMA total, PC ae C32:2, serina (Ser) y C12-DC, comparando pacientes con respuesta patológica completa (pCR, n = 7) y pacientes con enfermedad estable/progresión (SDPR) (n = 22). Corte = 11,37, Sensibilidad = 0,5909 (0,479-0,797) Especificidad = 1,0 (1-1), Relación de probabilidad positiva= infinito. Relación de probabilidad negativa = 0,4091, prueba T = 0,026961, valor p < 0,001 (100 permutaciones).

[0118] Los datos anteriores muestran la precisión y fiabilidad excepcional de la predicción, tal como se determina por los parámetros de de la especificidad, la sensibilidad, VPP y VPN, mediante el uso de las combinaciones de biomarcadores anteriormente especificados.

3. Metabolitos según los subtipos intrínsecos de cáncer de mama (Ejemplo de referencia)

[0119] El análisis de curva ROC obtenida durante la configuración de entrenamiento reveló un conjunto mínimo de metabolitos para la subclasificación de los subtipos de cáncer de mama que comprenden al menos una acilcarnitina que contiene al menos 10 átomos de carbono en la molécula y al menos un lípido que contiene un máximo de 3 insaturaciones en el molécula. Los resultados obtenidos de los análisis de la curva ROC se muestran en las Figuras 13 a 15.

[0120] Figura 13: Identificación de los subtipos específicos de cáncer de mama usando los metabolitos representados en la Tabla 11. El análisis de la curva ROC muestra la identificación de pacientes con tumores Luminales A/B (n = 30) y pacientes con Triple negativos y HER2-positivos (otros tumores n = 29). AUC = 0,821 (IC 95%: 0,686-0,945), Sensibilidad = 81,08%, especificidad = 82,86%, valor predictivo positivo 83,33%, valor predictivo negativo 80,56%, valor de p = 0,008 (1000 permutaciones).

Tabla 11: Lista de metabolitos utilizados en el análisis multivariante para identificar tumores luminales A/B

Metabolitos	AUC	Valor p
Lys/C16:1-OH/PC ae C40:1	0,81379	7,4353E-6
C16:1-OH/PC ae C40:1	0,79655	4,2815E-5
C16:1-OH/PC ae C40:1	0,79195	9,1894E-5
lisoPC a C24:0/C9/C10:2	0,78966	5,8548E-5
C16:1-OH/PC ae C42:0	0,78736	5,783E-5
C16:1-OH/PC aa C38:0	0,78621	9,1278E-5
PC ae C30:2/C9/C10:2	0,78621	4,0237E-5
His/C16:1-OH/PC ae C40:1	0,78391	8,8153E-5

[0121] Figura 14: Identificación de los subtipos específicos de cáncer de mama usando los metabolitos representados en la Tabla 12. El análisis de la curva ROC muestra la identificación de pacientes con tumores HER2 (lumb-HER2 + HER2) (n = 19) y pacientes con Triple negativos y Luminales A/B (otros tumores n = 40). AUC = 0,803 (IC 95%: 0,639-0,926) 0,803, Sensibilidad = 86,36%, especificidad = 76,92%, valor predictivo positivo = 61,29%, valor predictivo negativo = 93,02%, valor de p = 0,002 (1000 permutaciones).

Tabla 12: Lista de metabolitos utilizados en el análisis multivariante para identificar tumores positivos de HER2

Metabolitos	AUC	Valor p
PC aa: 0/C9/C14:1-OH	0,80921	7,6516E-5
Met-SO/C9/C10:2	0,80132	1,4739E-4

PC ae C30:2/C9/C10:2	0,79342	2,3424E-4
----------------------	---------	-----------

[0122] **Figura 15:** Identificación de los subtipos específicos de cáncer de mama usando los metabolitos representados en la Tabla 13. El análisis de la curva ROC muestra la identificación de pacientes con triple negativos (n = 10) y HER2-positivo/Luminales A/B (otros tumores n = 49). (IC 95%: 0,762-0,98) 0,875, Sensibilidad = 83,33%, especificidad = 85,96%, valor predictivo positivo = 55,56 %, valor predictivo negativo = 96,08%, valor de p < 0,001 (1000 permutaciones).

Tabla 13: Lista de metabolitos utilizados en el análisis multivariante para identificar tumores triple negativo

Metabolitos	AUC	Valor p
NOS Act*/C12/C10/isoPC a C20:3	0,89388	6,193E-5
NOS Act/C12/C10/PC ae C42:0	0,89388	1,7304E-5
NOS Act/C12/C10/PC ae C38:3	0,89184	5,94E-5
*NOS Act = relación de citrulina/arginina (actividad de óxido nítrico sintasa)		

10

[0123] Los datos anteriores muestran que es posible discriminar entre ciertos tipos de tumores de cáncer de mama sobre la base de los biomarcadores, que son específicos para este tumor, con gran precisión y fiabilidad, tal como se determina por los parámetros de la especificidad, la sensibilidad, VPP y VPN.

15 Aplicabilidad industrial

[0124] La presente invención posibilita el cribado de sujetos, en particular pacientes humanos, que sufren potencialmente cáncer de mama, así como el diagnóstico de cáncer de mama en sujetos de una manera mejorada, proporcionando de este modo procedimientos de cribado y de diagnóstico más precisos, fiables y eficaces.

20

[0125] Además, la presente invención permite además predecir si un paciente que sufre de cáncer de mama es probable que responda a la quimioterapia, tal como la quimioterapia neoadyuvante, ya en una etapa temprana de la enfermedad. De hecho, los biomarcadores de acuerdo con la invención son fácilmente detectables en sangre, y su nivel está consistentemente relacionado con la etapa del cáncer de mama. Por lo tanto, los procedimientos de la invención se pueden realizar fácilmente en alto rendimiento en un corto período de tiempo y por lo tanto permiten una complacencia mejorada del paciente.

25

[0126] Además, es posible con los biomarcadores y conjuntos de biomarcadores de la presente invención discriminar los subtipos de tumores, lo que permite un tratamiento individual basado en el subtipo de tumor, con lo que, además, se aumenta la complacencia del paciente, y la mejora del éxito de la terapia.

30

[0127] Además, la invención permite la determinación de la actividad del tumor mediante biomarcadores metabólicos, lo que es ventajoso y superior en comparación a la caracterización del tumor, tal como se realiza en la técnica. La evaluación de la reflexión bioquímica de la actividad tumoral del cáncer de mama proporciona una herramienta adecuada para adaptar y ajustar la terapia del paciente, incrementando por lo tanto en gran medida la complacencia y la calidad de vida del paciente.

35

[0128] En base a esto es posible preparar un kit que es adecuado para ser de ayuda en el cribado y el diagnóstico de cáncer de mama, la clasificación de tumor del paciente y la determinación de su actividad bioquímica, la monitorización de la progresión de la enfermedad y la respuesta terapéutica del paciente a la quimioterapia neoadyuvante.

40

REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación de metabolitos contenidos en una muestra de sangre de un sujeto mamífero, comprendiendo la combinación de metabolitos al menos
- 5 (a) un aminoácido seleccionado de glutamina, glutamato y serina, y un lípido, o
(b) glutamina y glutamato,
como un conjunto de biomarcadores para el cribado y/o diagnóstico del cáncer de mama.
2. Uso, según la reivindicación 1, en el que el lípido se selecciona de fosfatidilcolina acil-alquilo poliinsaturada
- 10 araquidónica, fosfatidilcolina acil-alquilo monoinsaturada araquidónica y fosfatidilcolina acil-alquilo saturada araquidónica.
3. Uso, según la reivindicación 1 o 2, la combinación de metabolitos que comprende además uno o más de una esfingomielina y glutaconil carnitina.
- 15 4. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los metabolitos se miden en base a un procedimiento de análisis cuantitativo, preferiblemente cromatografía, espectroscopia, analizadores de masa/espectrometría de masas.
- 20 5. Uso según la reivindicación 4, en el que la cromatografía comprende CG, CE, CL, HPLC, y UHPLC; espectroscopia comprende UV/Vis, IR, NIR y RMN; y analizadores de masas/espectrometría de masas comprenden ESI, analizadores de masas de cuadrupolo, analizadores de masas de trampa de iones, analizadores de masas de TOF (tiempo de vuelo), analizador de masas Orbitrap, analizador de masas de sector magnético, analizador de masas de sector electrostático, resonancia de ciclotrón de iones (ICR) y combinaciones de los
- 25 mismos, incluyendo cuadrupolo único (Q) y triple cuadrupolo (QqQ), QqTOF, TOF-TOF, Q-Orbitrap, APCI-QqQ, APCI-QqTOF, MALDI-QqQ, MALDI-QqTOF y MALDI-TOF-TOF.

Figura 1A.

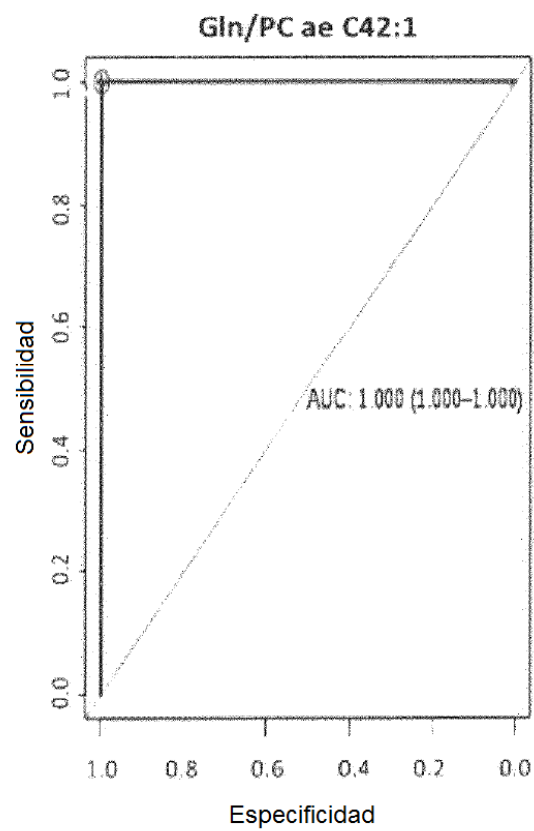


Figura 1B

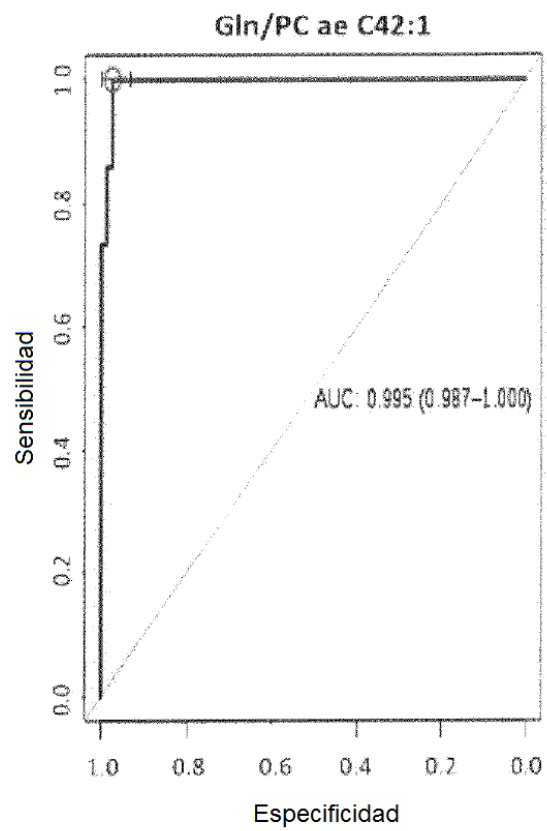


Figura 2A

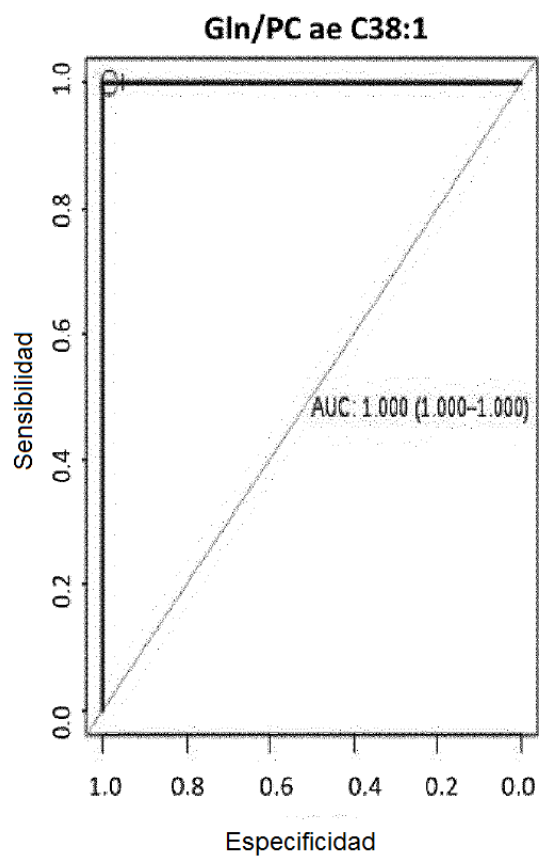


Figura 2B

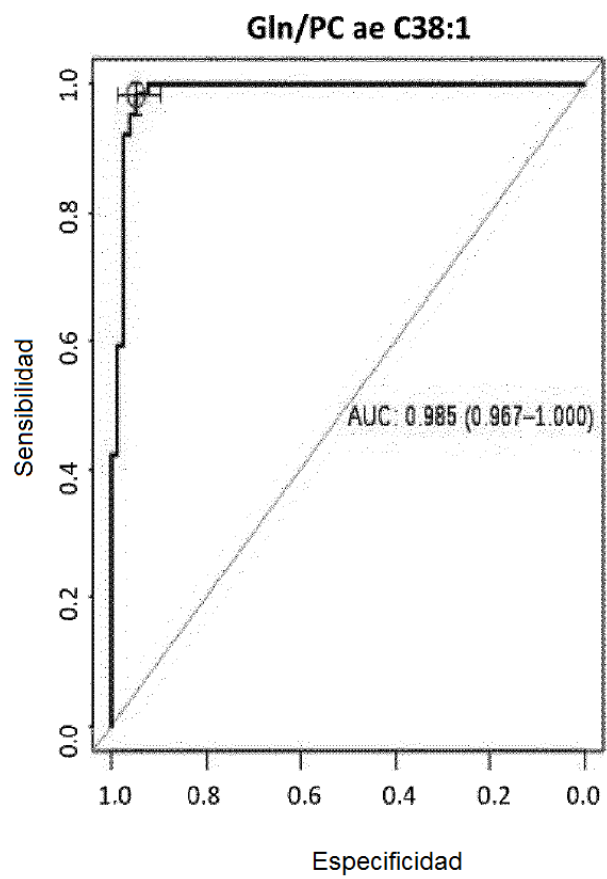


Figura 3A

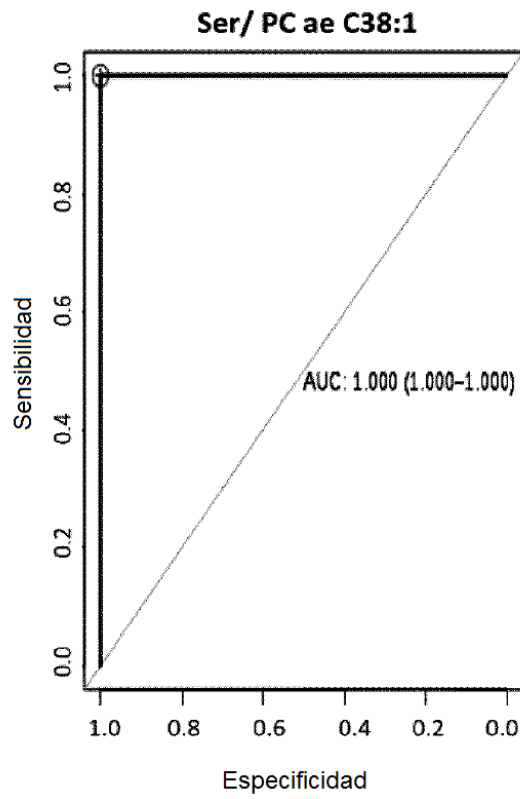


Figura 3B

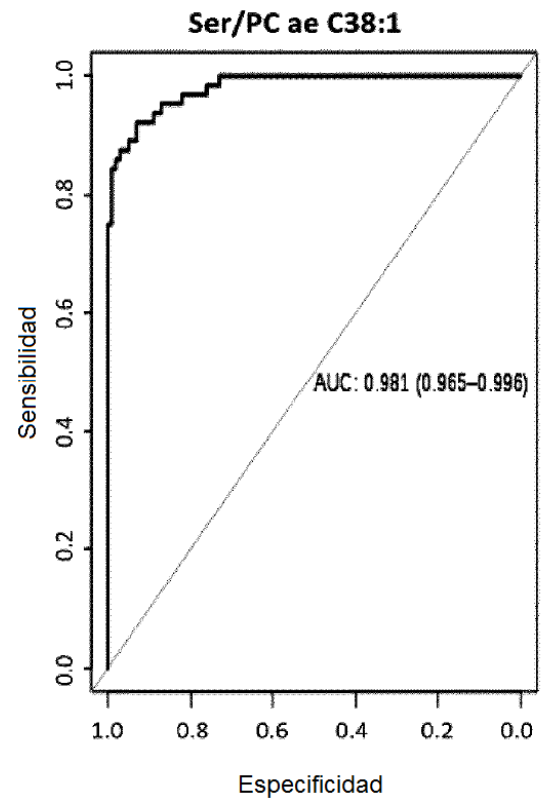


Figura 4A

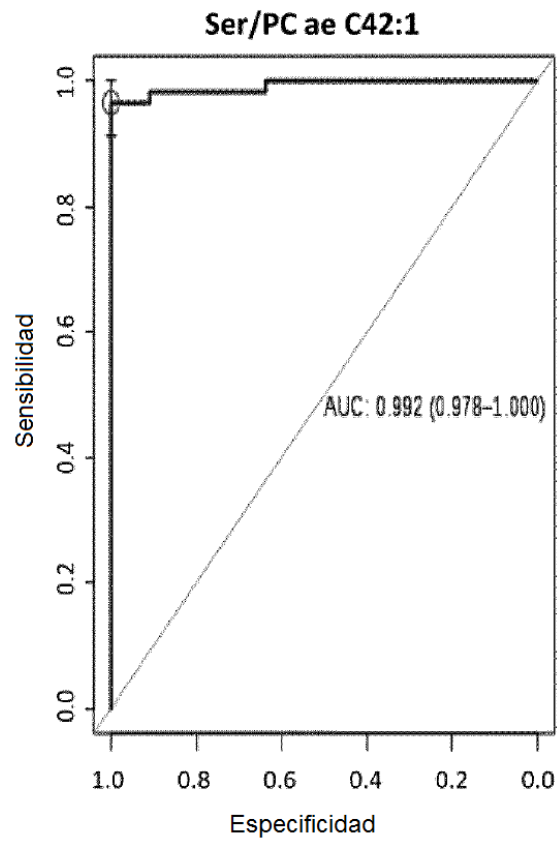


Figura 4B

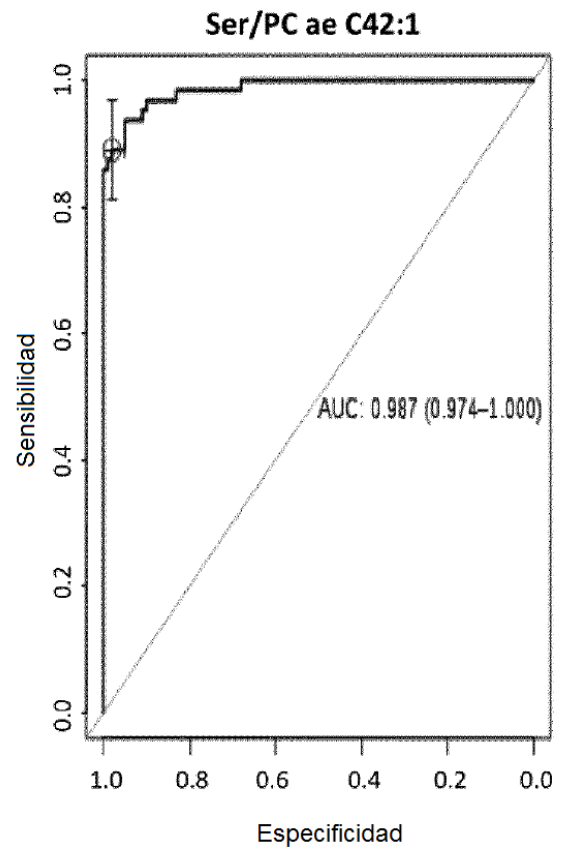


Figura 5A

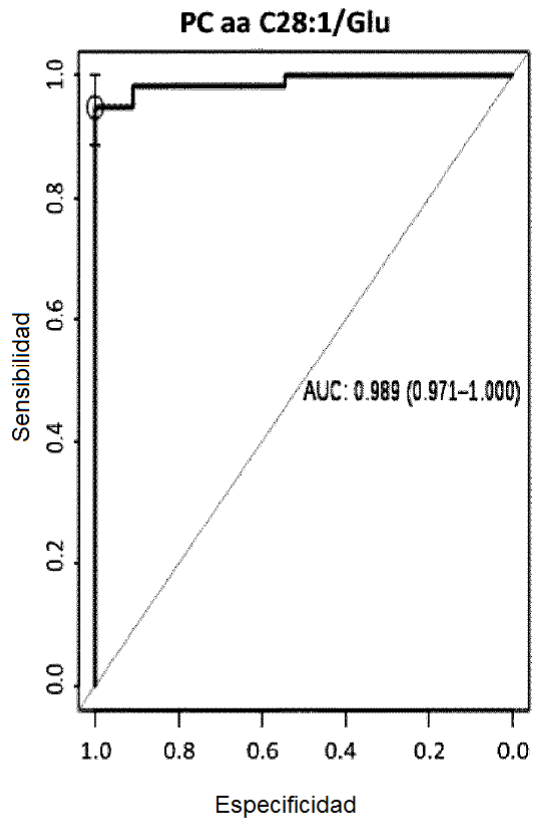


Figura 5B

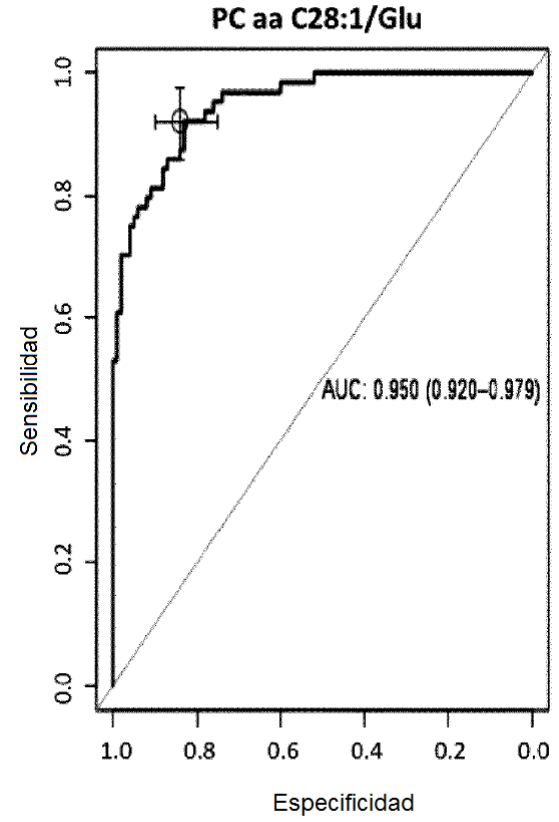


Figura 6A

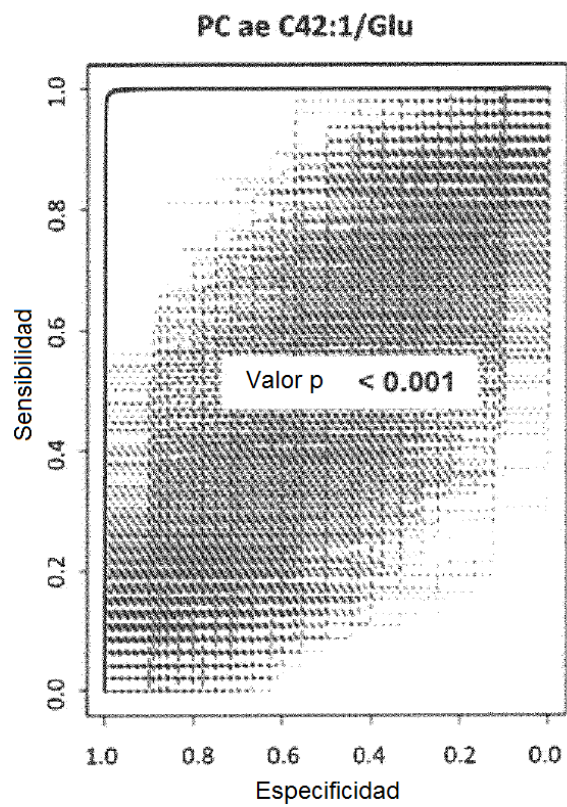


Figura 6B

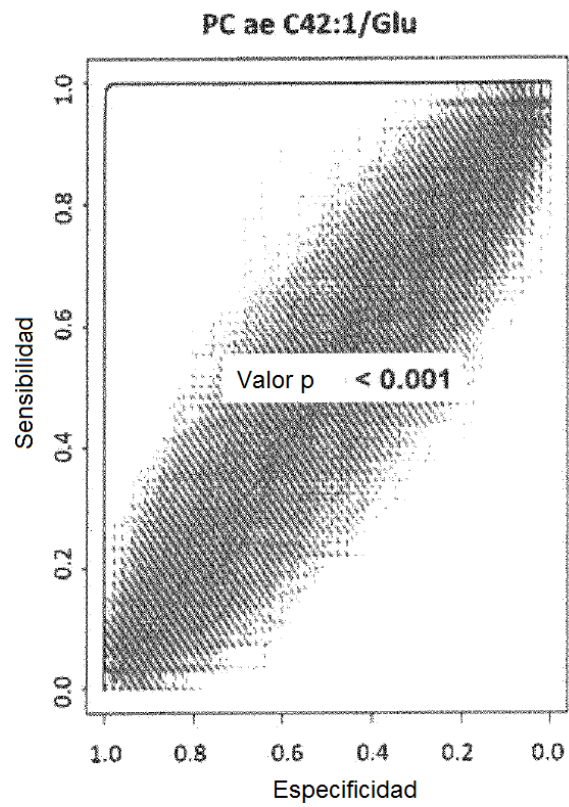


Figura 7A

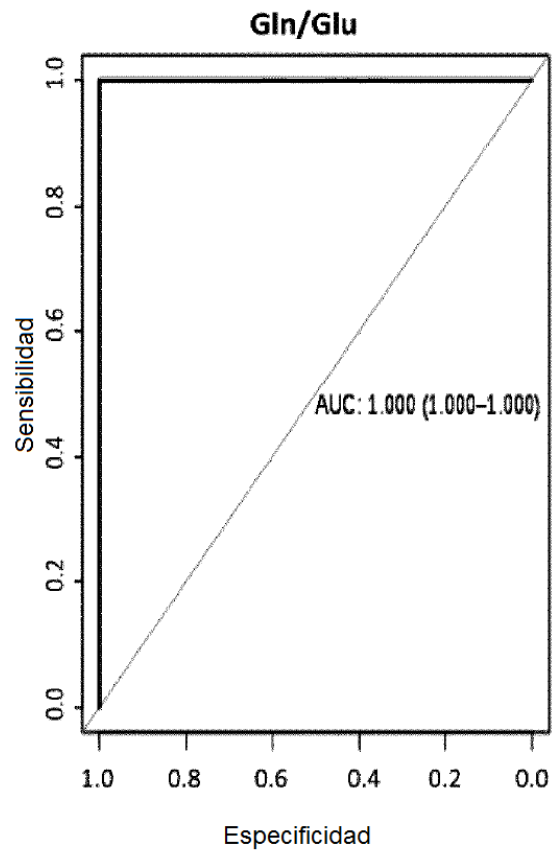


Figura 7B

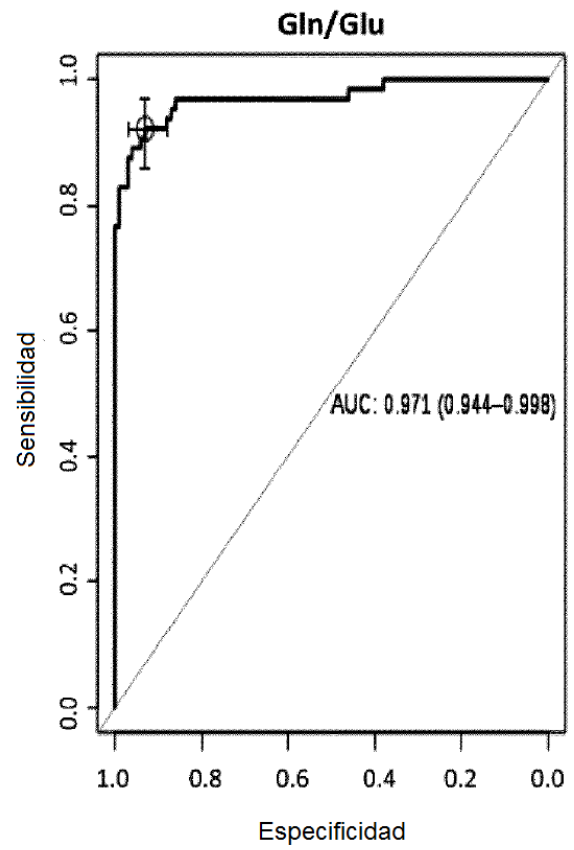


Figura 8A

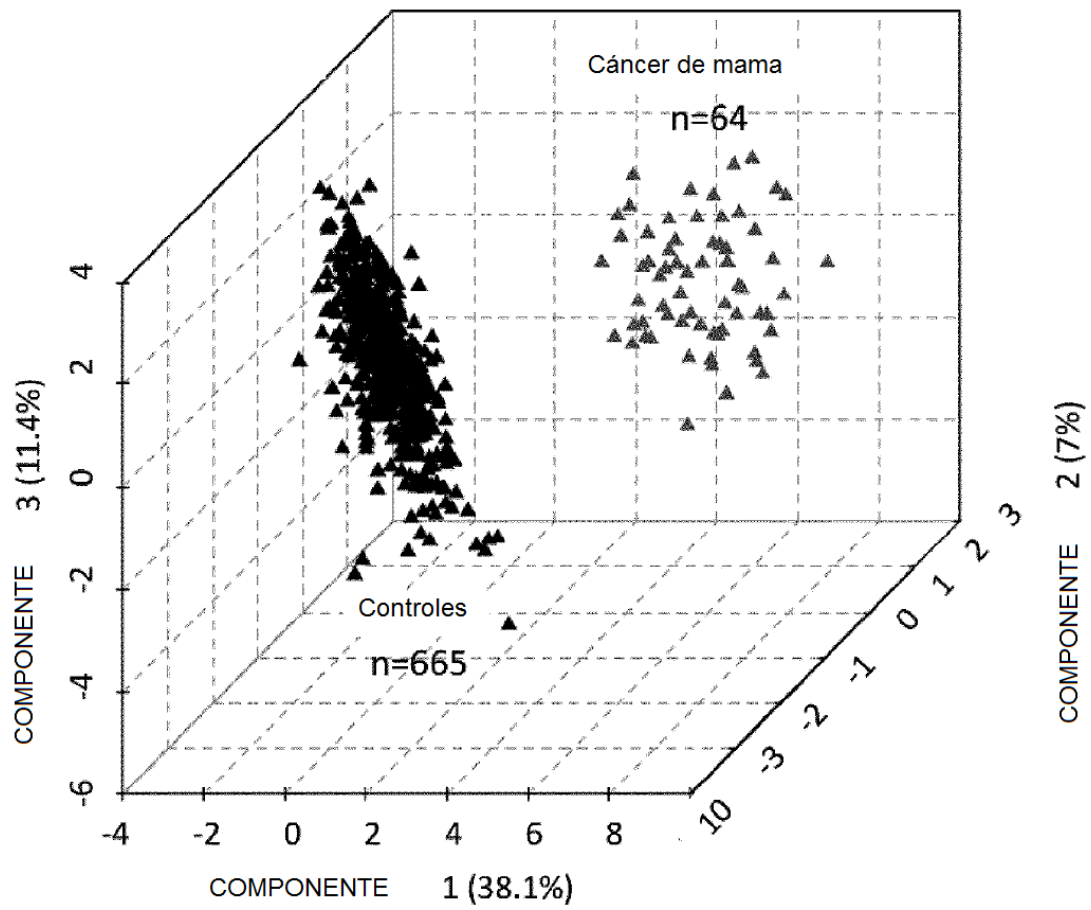


Figura 8B

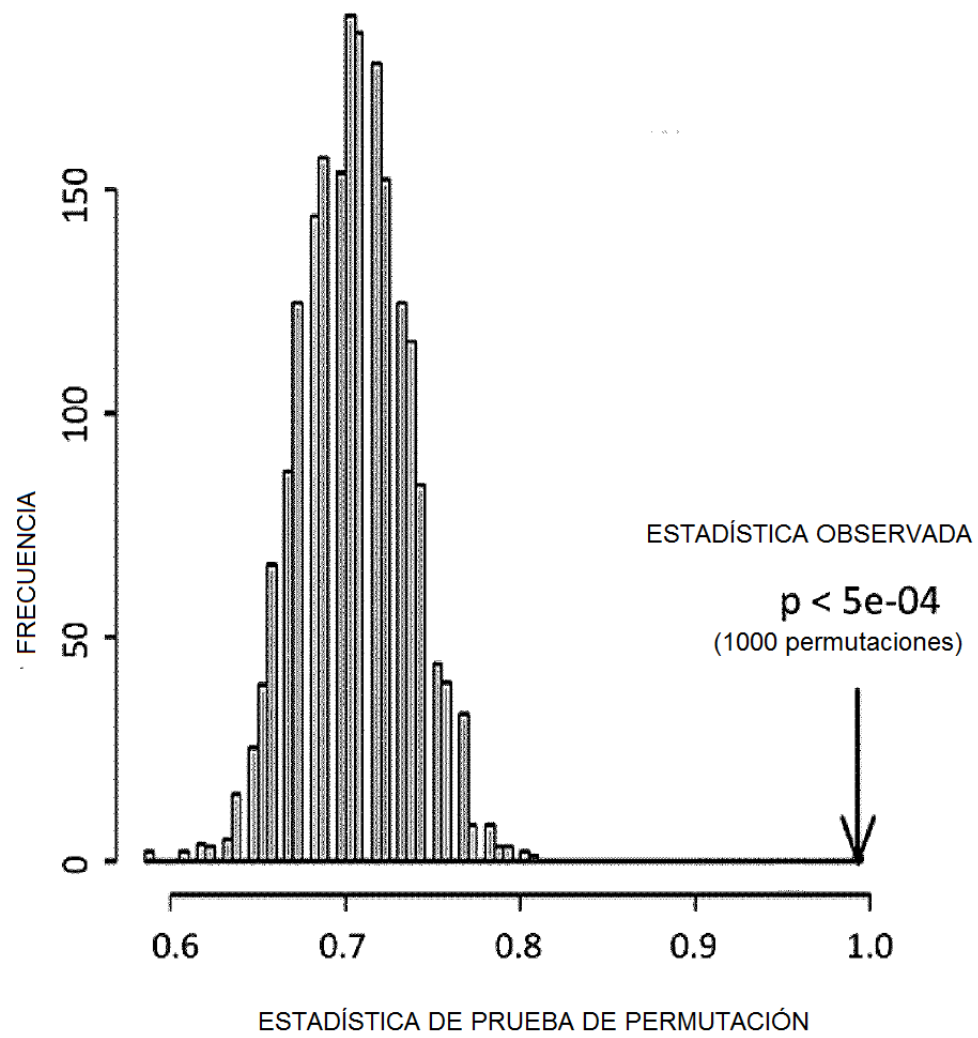


Figura 9A

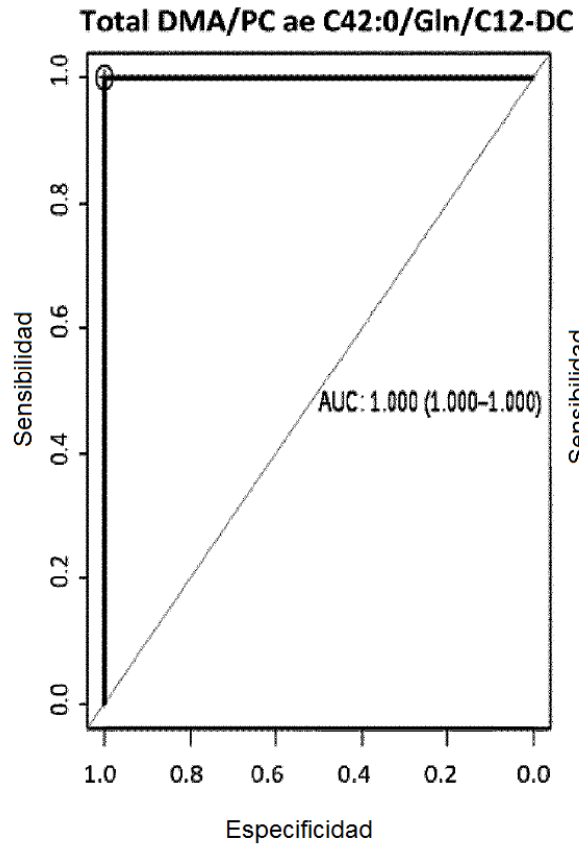


Figura 9B

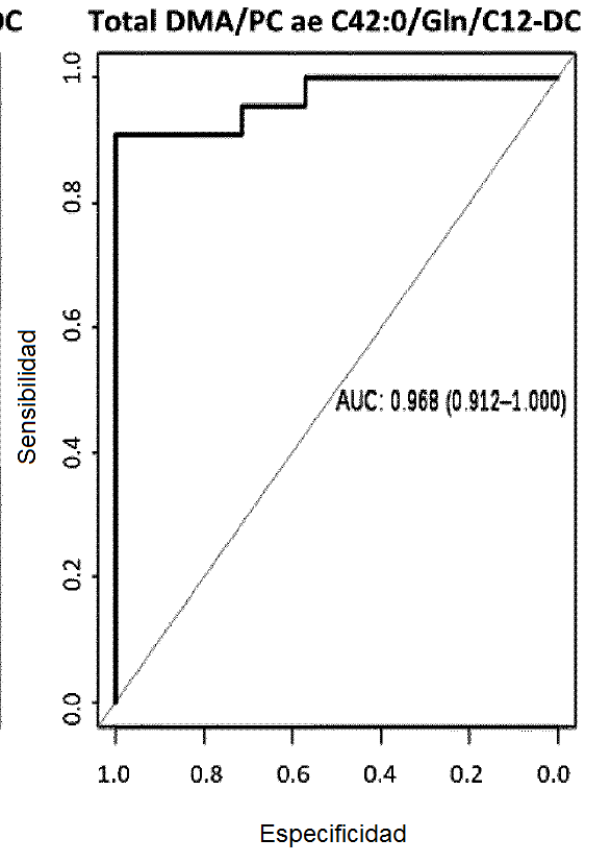


Figura 10A

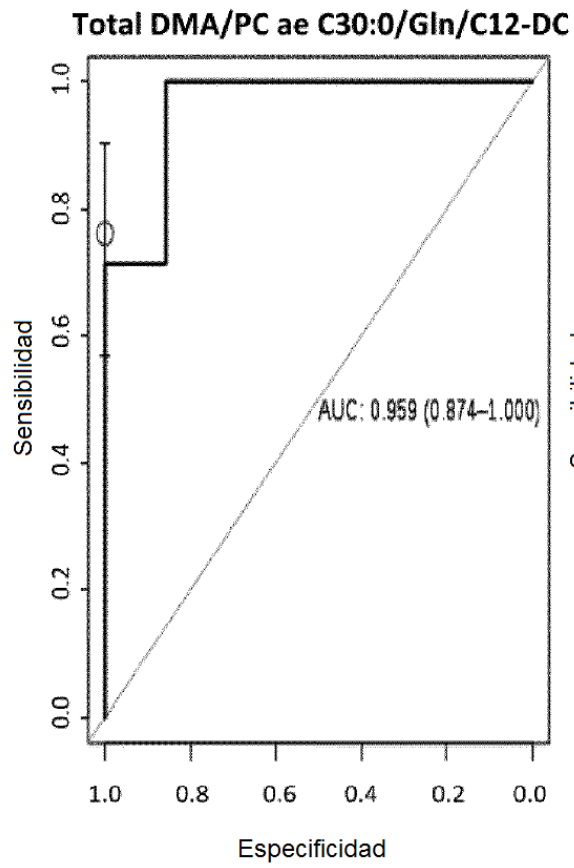


Figura10B

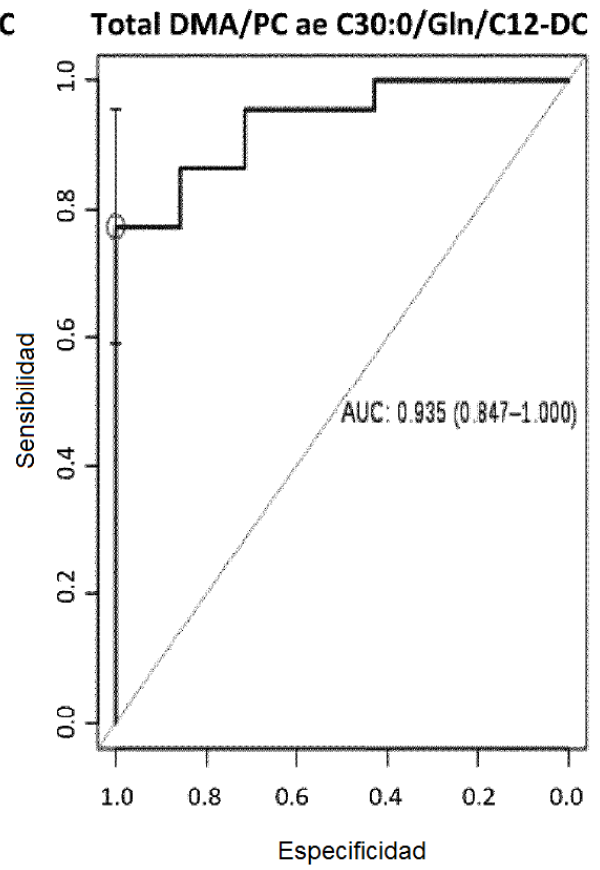


Figura 11A

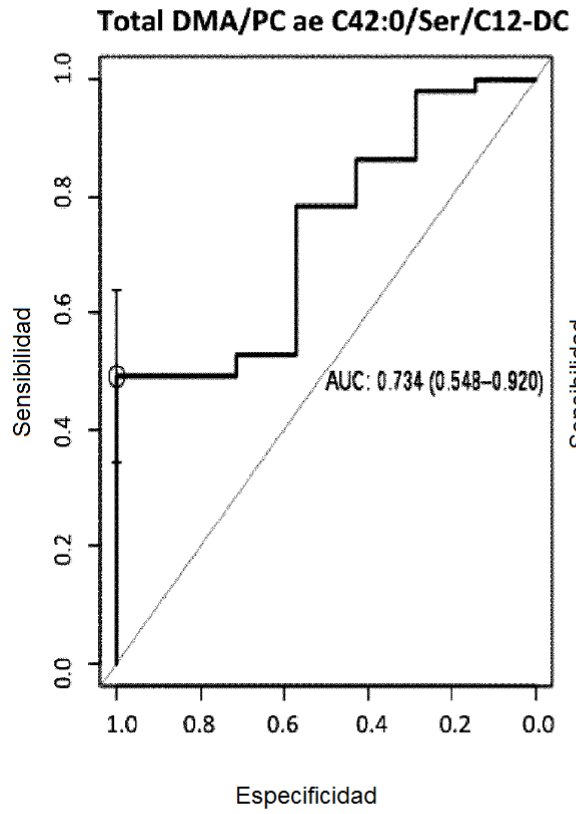


Figura 11B

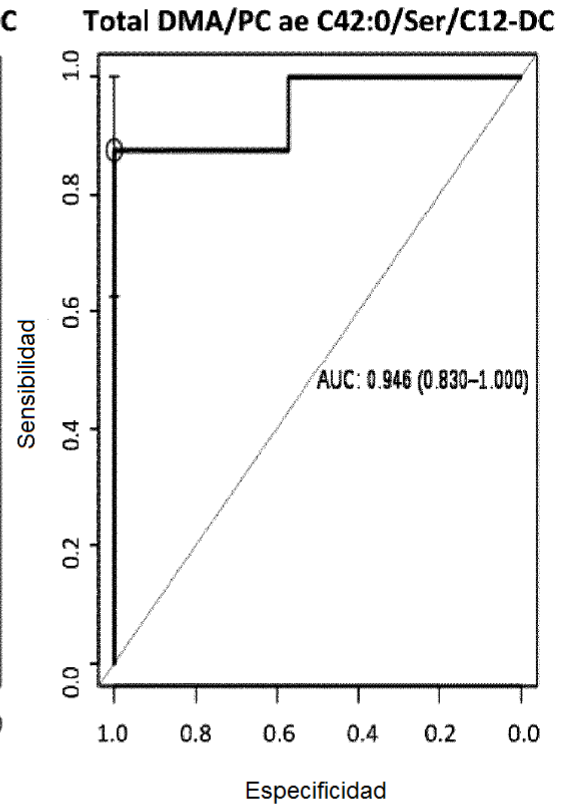


Figura 12A

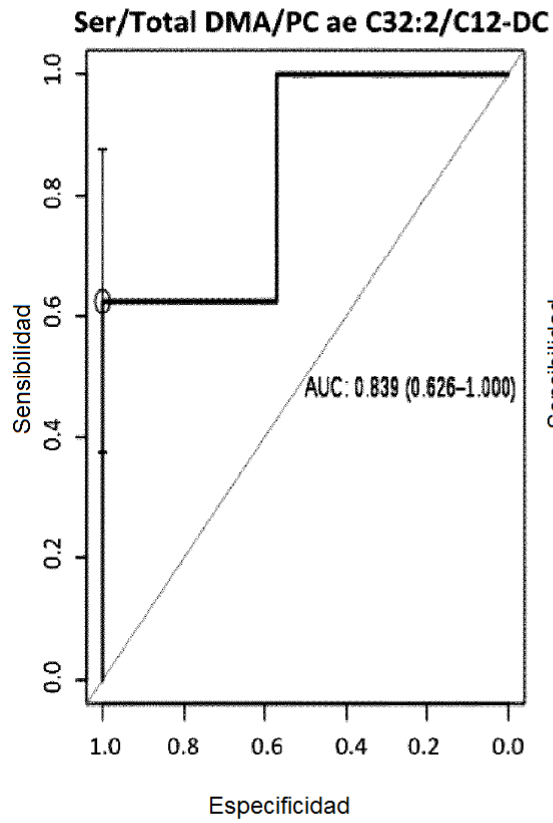


Figura 12B

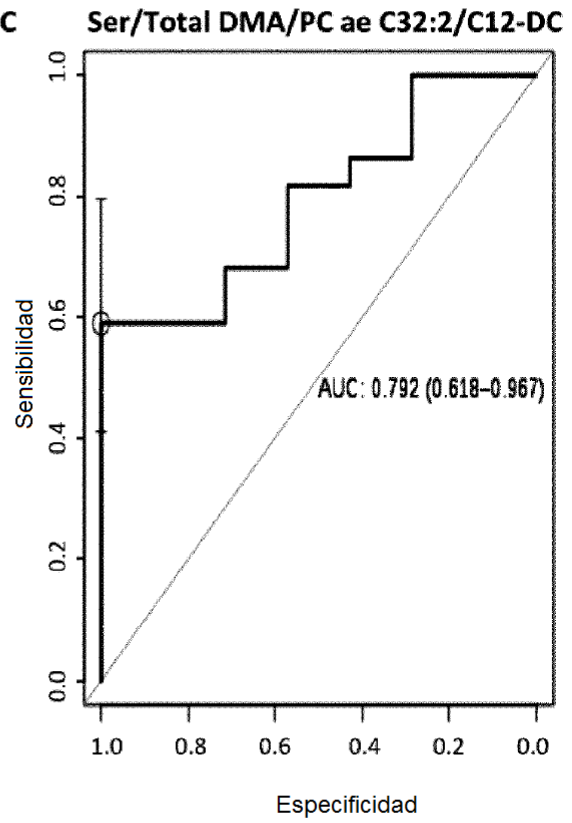


Figura 13

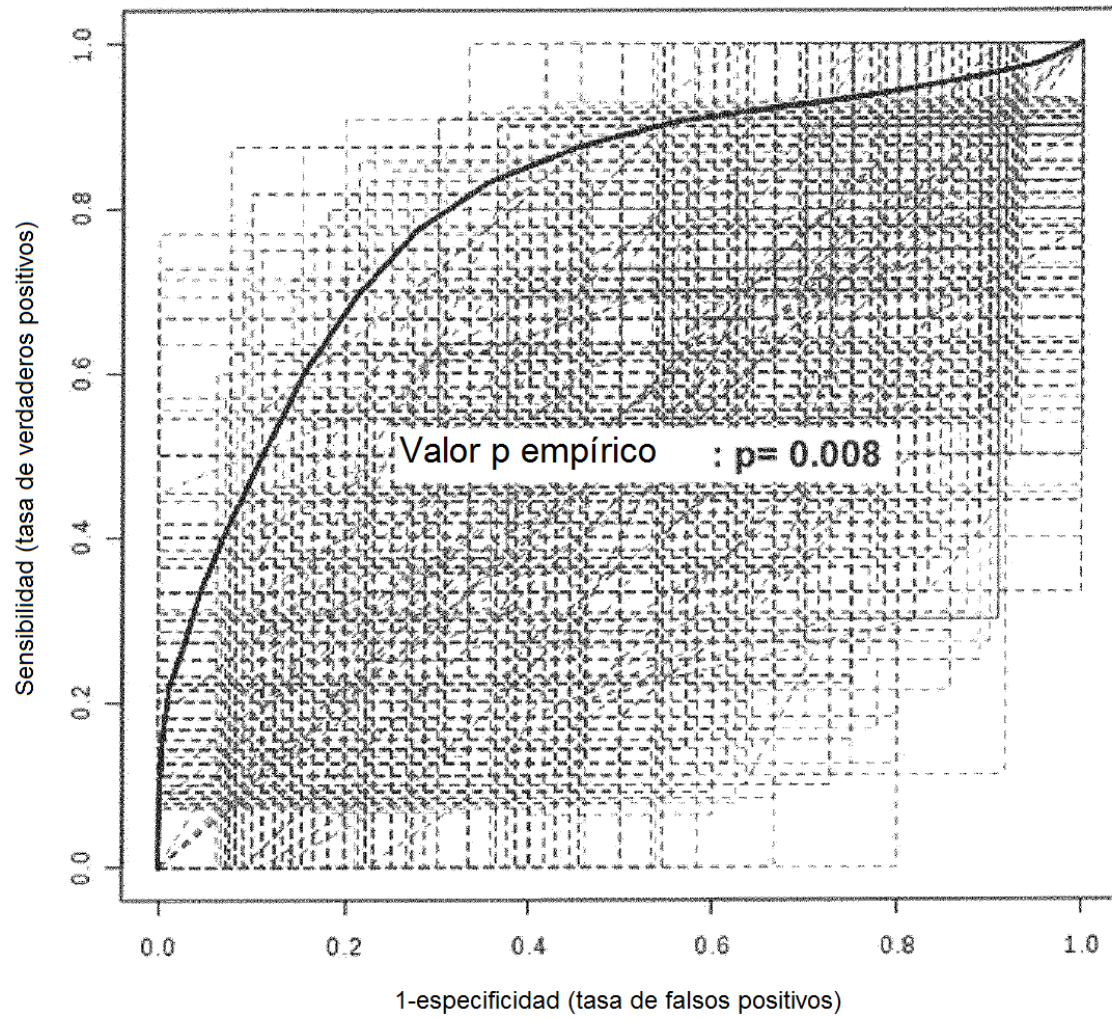


Figura 14

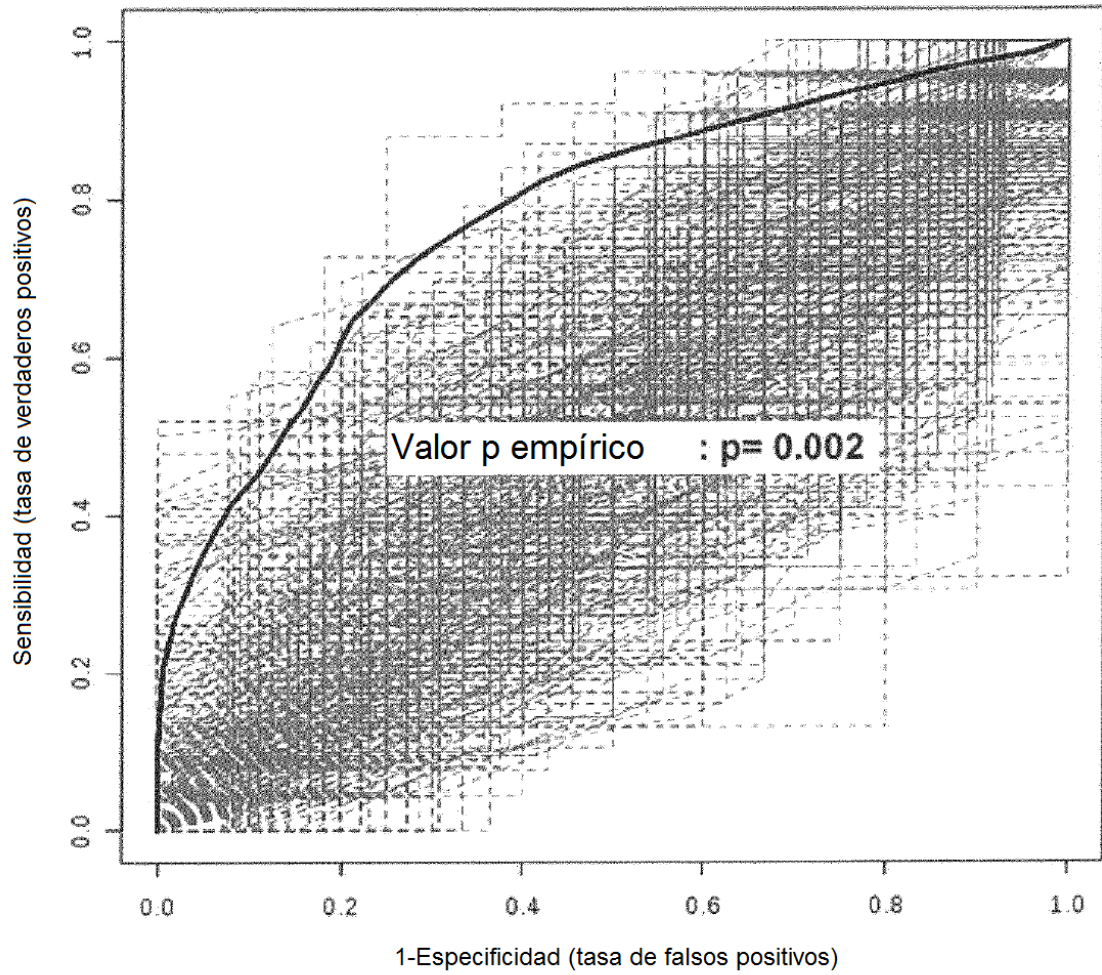


Figura 15

