



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 121**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07794274 .6**
96 Fecha de presentación : **20.08.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2074427**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.07.2009**

54 Título: **Biomolécula(s) de diagnóstico.**

30 Prioridad: **05.09.2006 SG 200605961**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.06.2011

73 Titular/es: **National University of Singapore
21 Lower Kent Ridge Road
Singapore 119077, SG**

72 Inventor/es: **Choolani, Mahesh Arjandas;
Jabarullah Khan, Khalil Razvi, B., M.;
Annamalai, Loganath;
Biswas, Arijit y
Zhao, Changqing**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 362 121 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

Biomolécula(s) de diagnóstico

Campo de la Invención

5 La presente invención se refiere a proteína haptoglobina como una biomolécula de diagnóstico para cáncer de ovario.

Antecedentes de la Invención

10 El cáncer de ovario epitelial es el más letal de los cánceres del tracto genital femenino. La mayoría de los cánceres de etapa temprana son asintomáticos y más de tres cuartos de los diagnósticos habitualmente se realizan en un momento en el que la enfermedad es con frecuencia incurable debido a que ya se ha establecido metástasis regional o distante (Wingo y col, 1998). Debido a la escasez de síntomas y su aparición insidiosa, la mayoría de los pacientes presentan enfermedad avanzada siendo las tasas de supervivencia en cinco años solamente del 30% (Kristensen y col, 1997).

15 Examinaciones pélvicas regulares y mediciones del biomarcador CA-125 seguido de diagnóstico radiológico de una manera individualizada ha sido la práctica actual para detección de esta afección enigmática. Aunque los protocolos de detección tempranos actuales han implicado generalmente una combinación de ultrasonido y niveles en suero de CA-125, estos protocolos han conseguido un éxito limitado (Karlán y col., 1999). La mayor prueba de exploración aleatoria hasta la fecha, que evaluó más de 20.000 mujeres indicó un beneficio de supervivencia, sin embargo, que no se tradujo en menos muertes entre el grupo explorado y no explorado de mujeres (Jacobs y col., 1999).

20 Además, las concentraciones de CA-125 son elevadas en mujeres con condiciones ginecológicas benignas incluyendo quistes ováricos, endometriosis y fibromas que forman parte del diagnóstico diferencial para cáncer de ovario (Mackey y col., 1995). Además, mujeres con enfermedad hepática, insuficiencia renal, pancreatitis y otras afecciones pueden tener CA-125 elevado limitando de este modo el papel de esta proteína como un marcador para cáncer de ovario (Devarbhavi y col., 2002). La exploración con marcadores de suero adicionales incluyendo CA-19-9 y ácido lisofosfatídico como adjuntos a exploración de CA-125 tampoco se han mostrado que sean clínicamente
25 relevantes para fines de diagnóstico (Woolas y col., 1999).

La mayoría de las mujeres con cáncer de ovario son asintomáticas durante las etapas tempranas de esta enfermedad y la mayoría de las mujeres presentes en etapas III y IV de FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). El tratamiento actualmente aceptado para cáncer de ovario de etapa avanzada es cirugía primaria de citorreducción para conseguir una citorreducción óptima (definida como tumor residual menor de 2 cm) seguido de quimioterapia. La cirugía implica habitualmente histerectomía abdominal total, salpingo-ooforectomía bilateral, omentectomía y linfadenectomía paraaórtica y pélvica. A pesar de la cirugía citoreductora, las tasas de morbilidad y mortalidad siguen siendo altas con impacto mínimo en las tasas de supervivencia (Michel y col., 1997; Vergote y col., 1998). Por el contrario, la enfermedad de etapa temprana está asociada con hasta 95% de supervivencia (Cannistra, 2004) y puede usarse un enfoque quirúrgico que conserve la fertilidad en pacientes que
30 deseen la preservación de la fertilidad (Robinson y col., 1992).

Los avances en laparoscopia han permitido a los ginecólogos realizar procedimientos previamente conseguidos solamente por laparotomía. Los ginecólogos actualmente realizan procedimientos de laparoscopia para el tratamiento de quistes ováricos benignos y ocasionalmente encuentran tumores malignos inesperados (Maiman y col., 1991). Una cirugía inapropiada debido a diagnóstico erróneo está asociada con un resultado negativo para el paciente. Es por lo tanto importante que se realice un diagnóstico intraoperatorio preciso de tumor maligno para una intervención terapéutica y quirúrgica apropiada.
40

El estado de la técnica actual para diagnóstico intraoperatorio es biopsia en sección congelada (Yeo y col., 1998). Este es un ensayo caro, costoso en recursos y en trabajo que no está disponible en muchos hospitales alrededor del mundo e incluso cuando está disponible habitualmente es un servicio limitado durante las horas de oficina. Su precisión se ha indicado desde el 100% (Lim y col, 1997) a un mínimo de 88,7% (Canis y col., 2004). Se necesita una alternativa fiable, más barata y más fácilmente disponible que pudiera ponerse a disposición de la mayoría de los hospitales.
45

Como tal, un procedimiento que resuelve o al menos alivia los problemas y limitaciones de la técnica anterior sería bienvenido.

Sumario de la Invención

50 La presente invención afronta los problemas anteriores y proporciona un procedimiento para detectar, cuantificar la presencia de, predisposición a o gravedad de, o pronosticar el resultado de cáncer de ovario en un sujeto o seleccionar al menos un candidato para ensayo o ensayos clínicos, experimentación o ensayo de diagnóstico para cáncer de ovario o indicar la eficacia del tratamiento, comprendiendo el procedimiento:

- (a) determinar en al menos una muestra de fluido quístico obtenida de un sujeto, la expresión de proteína haptoglobina; y
- (b) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de un control, indicando una diferencia en la expresión la presencia de, predisposición a, gravedad de o pronóstico del resultado de cáncer de ovario en el sujeto o de la adecuación del sujeto como un candidato o indica la eficacia del tratamiento.

5

Un ensayo para determinar el nivel de proteína haptoglobina se desveló en el documento US 6.451.550. Sin embargo, no se proporcionó ninguna sugerencia y/o indicio con respecto al uso de este ensayo asociado con las muestras de fluido quístico y/o para la detección y/o cuantificación de un trastorno celular proliferativo.

10

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar la presencia de, predisposición a, y/o gravedad de un cáncer de ovario en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar al menos una muestra de fluido quístico de un sujeto;
- (b) determinar la expresión de proteína haptoglobina y
- (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de un control, indicando una diferencia en la expresión la presencia de, predisposición a, y/o gravedad de cáncer de ovario en el sujeto.

15

También se proporciona un procedimiento para pronosticar el resultado de cáncer de ovario en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar al menos una muestra de fluido quístico de un sujeto;
- (b) determinar la expresión de proteína haptoglobina y
- (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de al menos un control, indicando una diferencia en la expresión el pronóstico de cáncer de ovario en el sujeto.

20

También se proporciona un procedimiento para seleccionar al menos un candidato para ensayo o ensayos clínicos, experimentación y/o ensayo de diagnóstico que comprende:

- (a) proporcionar al menos una muestra de fluido quístico de un sujeto;
- (b) determinar la expresión de proteína haptoglobina y
- (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de al menos un control, indicando una diferencia en la expresión la adecuación del sujeto como un candidato.

25

También se proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de un tratamiento para cáncer de ovario en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar al menos dos muestras de fluido quístico de un sujeto, obtenida cada muestra en diferentes puntos temporales;
- (b) determinar la expresión de una proteína haptoglobina; y
- (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina, en las al menos dos muestras, indicando una diferencia en la expresión la eficacia del tratamiento en el sujeto.

30

Las muestras de fluido quístico pueden obtenerse de quistes ováricos.

35

El control es al menos un sujeto no diagnosticado con cáncer de ovario o el control puede ser un experimento, valor o sujeto de referencia con el que pueden compararse los valores obtenidos en las muestras o ensayos. La proteína haptoglobina puede ser una proteína haptoglobina humana.

40

La secuencia de una proteína haptoglobina se proporciona en SEC ID N°: 2. El gen de la haptoglobina puede tener la secuencia de ADN de SEC ID N°: 1. La determinación puede ser por colorimetría. La colorimetría puede estar basada en actividad peroxidasa de complejo hemoglobina-haptoglobina en un sustrato. La determinación puede ser por Espectrometría de Masas. La Espectrometría de Masas puede ser Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo-Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz. La determinación puede ser por un ensayo inmunorreactivo. El ensayo inmunorreactivo puede ser ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. El procedimiento puede comprender adicionalmente al menos una medición de CA-125 en la muestra o muestras y/o al menos una evaluación de ultrasonidos del sujeto.

45

Un kit de diagnóstico y/o pronóstico para el diagnóstico y/o evaluación de pronóstico de cáncer de ovario en un sujeto de acuerdo con la invención puede comprender al menos una molécula o compuesto que se une y/o reacciona con una proteína haptoglobina obtenida de una muestra de fluido quístico.

50

La molécula puede ser un polipéptido que se une a la proteína haptoglobina. La molécula puede ser un anticuerpo que se une a la proteína haptoglobina. La molécula puede ser un sustrato de haptoglobina y la reacción puede ser una acción enzimática por la proteína haptoglobina.

El sujeto puede ser un mamífero, en particular un ser humano.

Breve Descripción de las Figuras

- 5 Figura 1. Perfiles proteicos de SELDI-TOF representativos en proteínas de fluido quístico entre 8 y 20 kDa de acuerdo con la relación m/z usando microplacas proteicas NP20. Las intensidades máximas relativas se normalizaron a corriente iónica total para el conjunto completo de datos. La flecha indica la posición del máximo de 17 kDa observado en carcinomas de ovario pero este máximo se observa menos frecuentemente en tumores benignos.
- 10 Figura 2. Electroforesis en gel unidimensional de muestras proteicas de fluido quístico representativas de tumores de ovario. La banda de proteínas indicada entre 15 y 20 kDa fue el máximo correspondiente a proteína única con un peso molecular 17 kDa que también se sometió a análisis de SELDI. Los carriles 1 y 2 representan tumores de ovario benignos; los carriles 3 y 4 representan tumores límite; los carriles 5 y 6 representan cáncer de ovario de etapa temprana; y los carriles 7 y 8 representan cáncer de ovario de etapa tardía.
- 15 Figura 3. Espectro de masas generado por la proteína de 15-20 kDa usando MALDI-TOF/EM. Las flechas en los máximos del espectro de masas representan péptidos de subunidades de haptoglobina α 2.
- 20 Figura 4. Confirmación de la presencia de subunidades de haptoglobina en fluido quístico de tumor de ovario por transferencia de Western. Se cargaron cantidades iguales de proteína (10 ug) de tumor de ovario benigno (Carril 1 y 2); tumor de ovario límite (Carril 3 y 4); cáncer de ovario de etapa temprana (Carril 5 y 6) y cáncer de ovario de etapa tardía (Carril 7 y 8) en el SDS-PAGE al 15%. Pudo detectarse elevación de haptoglobina en fluido quístico de cáncer (carril 7-8) por transferencia de western en comparación con casos benignos (carril 1-2).
- 25 Figura 5. Se realizaron experimentos de inmunocaptura con la microplaca proteica PS20 preincubada con anti-haptoglobina. Se preincubó antígeno de haptoglobina 5 mg/ml (Gráfico 1) con DTT (temperatura ambiente durante 1 hora) como el control positivo e IgG Bovina como el control negativo (Gráfica 2). Se expuso proteína de fluido quístico de cáncer de ovario de etapa tardía y tumor benigno a las series revestidas de anticuerpo.
- 30 Figura 6. Representación de cajas de niveles de haptoglobina (A) o subunidad α de haptoglobina (B) en tumor de ovario benigno; cáncer de ovario de etapa temprana y tardía según se determinó por un procedimiento de ELISA de tipo sándwich como se describe en el Ejemplo 5.
- 35 Figura 7. Resultados representativos obtenidos del ensayo de haptoglobina PHASE RANGE para tumor benigno (Carril C), cáncer de etapa temprana (Carril E) y etapa tardía (Carril G). El carril A demuestra el cambio de color en los controles de diversas concentraciones de haptoglobina. En los casos benignos, en 6 de 57 muestras (10,5%) el ensayo fue positivo, es decir hubo un cambio de color en el ensayo. En casos tempranos, en 8 de 14 muestras (57,1%), el ensayo fue positivo, es decir hubo un cambio de color en el ensayo. En los casos malignos, en 18 de 19 muestras (94,7%), el ensayo fue positivo, es decir hubo un cambio de color en el ensayo.
- 40 Figura 8. Correlación de Pearson entre niveles de haptoglobina medidos por ELISA y los ensayos PHASE RANGE (correlación positiva, $r^2=0,79$). Nivel de haptoglobina (PHASE) = $-0,02 + 0,16 * \text{nivel de Haptoglobina (ELISA)}$.
- Figura 9. Curvas de característica operativa del receptor (ROC), CA125 y análisis de ultrasonidos y una combinación de las tres usando análisis de puntos de separación.

Descripción Detallada

Las referencias bibliográficas mencionadas en la presente memoria descriptiva se enumeran por conveniencia en forma de una lista de referencias y se añaden al final de los ejemplos. El contenido completo de dichas referencias bibliográficas se incorpora en el presente documento por referencia.

45 **Definiciones**

Biomolécula – Una molécula biológica tal como aminoácido, péptido, proteína, ácido nucleico (ADN y/o ARN), lípido, carbohidrato y sus derivados.

50 Biomarcador – Los biomarcadores son agentes bioquímicos o biomoléculas (proteínas, polipéptidos, carbohidratos, lípidos, etc, y sus derivados) asociados con la presencia y gravedad de patologías específicas o diferentes condiciones de tratamiento. La biomolécula puede ser una molécula de tipo silvestre o un mutante, un derivado y/o un fragmento de la misma. Para el fin de la presente invención, un mutante, derivado y/o un fragmento de la misma significa una biomolécula que posee o comparte características tales como estructura y/o actividad biológica similares a o que pueden relacionarse o compararse con las de la molécula de tipo silvestre. De acuerdo con la presente invención, una proteína o derivado proteico puede usarse como un biomarcador. Los biomarcadores son

detectables y medibles por una diversidad de procedimientos. Para identificar un biomarcador, habitualmente es necesario detectar una diferencia o cambio en la expresión o abundancia de una molécula biológica e identificar la molécula particular cambiada.

5 Expresión o abundancia de un biomarcador – la expresión de un marcador puede determinarse a partir de la presencia o abundancia de su gen, transcrito génico y producto génico. Las expresiones “gen” y “transcrito génico” incluyen secuencias de ARN complementarias al gen y secuencias de ADNc obtenidas por transcripción inversa del transcrito génico. Las expresiones también incluyen el gen de tipo silvestre, variaciones y mutaciones del gen y transcrito génico en las que la variación o mutación comparte identidad sustancial con el gen o transcrito génico. De forma similar, “producto génico” incluye producto génico de tipo silvestre, variaciones, fragmentos o derivados del mismo. “identidad sustancial” significa que las variantes del gen o producto génico conservan suficiente identidad para que sean detectables por procedimientos y sondas usados para el producto génico o gen de tipo silvestre y conservan las mismas funciones que los productos génicos o gen de tipo silvestre. La determinación puede ser cualitativa, tal como si el biomarcador se expresa, la determinación puede ser cuantitativa o la determinación puede ser semicuantitativa por cualquier procedimiento conocido en la técnica tal como tecnología de microseries, reacción en cadena de la polimerasa o procedimiento colorimétrico. Una diferencia (aumento o reducción) con los niveles normales en el estado no enfermo puede indicar una patología o predisposición a una patología. Por ejemplo, la sobreexpresión o abundancia aumentada de una proteína puede ser indicativo de una patología, la gravedad de la patología y por lo tanto el pronóstico para el sujeto en el que el biomarcador se determinó y/o podría ser un indicador de susceptibilidad a una patología. La diferencia en expresión y abundancia puede determinarse entre diferentes biomarcadores o entre el mismo biomarcador en diferentes condiciones o puntos temporales. La expresión del biomarcador o biomarcadores puede después compararse y correlacionarse con un valor de referencia u otros valores obtenidos en diferentes puntos temporales o entre diferentes biomarcadores para determinar la correlación con la presencia, gravedad de una patología, para determinar la eficacia de un tratamiento o para determinar un pronóstico del resultado de la enfermedad para el sujeto. Los valores de referencia pueden determinarse a partir de un número estadísticamente significativo de sujetos que padecen o no padecen la enfermedad. La expresión del biomarcador o biomarcadores también puede usarse junto con otros marcadores de pronóstico o diagnóstico, biomarcadores o índices adecuados para obtener un nivel mayor de confianza. Cuando se dice que un biomarcador está “sobreexpresado” en comparación con controles, significa que la expresión de ese biomarcador está en una abundancia o un nivel que es estadísticamente significativamente mayor que el expresado de forma natural por al menos un sujeto control no mutante o de tipo silvestre no diagnosticado con la patología o afección. De forma similar, cuando un biomarcador está “infraexpresado”, la expresión de ese biomarcador es estadísticamente significativamente menor que la expresada de forma natural por al menos un sujeto control no mutante o de tipo silvestre no diagnosticado con la patología o afección. Con esta definición, un sujeto genéticamente deficiente para ese biomarcador no puede decirse que esté infraexpresando ese biomarcador. De forma similar, cuando se transfecta con el gen para ese biomarcador de modo que se exprese el biomarcador, no puede decirse que el sujeto deficiente esté sobreexpresando el biomarcador puesto que originalmente era deficiente para ese biomarcador.

Control – Un experimento, valor o sujeto de referencia con el que pueden compararse valores obtenidos en ensayos. Los intervalos o valores control habitualmente representan el estado “normal” de modo que una diferencia o desviación estadística de los intervalos o valores control representa un estado anómalo o una patología. Un experto en la materia sabrá cómo seleccionar y/u obtener experimentos, valores o sujetos control para su uso como referencias.

45 Seleccionar un sujeto o candidato – determinar la adecuación de un sujeto o candidato para un ensayo clínico, experimentación, diagnóstico y/u otros ensayos midiendo al menos una característica del sujeto o candidato. El valor que representa la característica se compara después con un valor o intervalo de valores de control o de referencia y el resultado se usa para determinar si el sujeto o candidato es adecuado para la prueba, experimentación, diagnóstico y/u otro ensayo. Un experto en la materia sabrá como seleccionar sujetos o candidatos basándose en su susceptibilidad a un tratamiento particular o su susceptibilidad a una enfermedad o problema particular.

Cáncer- Un crecimiento maligno e incontrolado de células en una parte del cuerpo que puede extenderse a otras partes del cuerpo.

50 Fluido quístico – Un quiste es un saco lleno de fluido que puede localizarse en cualquier parte del cuerpo. El fluido que contiene es fluido quístico.

Ácido nucleico – “Ácidos nucleicos” son polímeros lineales de nucleótidos, enlazados por enlaces fosfodiéster 3', 5'. En ADN, ácido desoxirribonucleico, el grupo azúcar es desoxirribosa y las bases de los nucleótidos adenina, aguanina, timina y citosina. ARN o ácido ribonucleico, tiene ribosa como el azúcar y el uracilo reemplaza a la timina. Un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico la estructura del cual no es idéntica a la de ningún ácido nucleico de origen natural o a la de cualquier fragmento de un ácido nucleico genómico de origen natural. La expresión abarca por lo tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómico de origen natural pero no está flanqueado por ambas secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que aparece de forma natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota de modo que la molécula resultante no sea idéntica a ningún vector o ADN genómico de origen natural; (c) una molécula separada tal como un ADNc, un fragmento genómico, un

5 fragmento producido por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que es parte de un gen híbrido, es decir un gen que codifica una proteína de fusión. La invención también presenta un ácido nucleico aislado al menos 50% (incluyendo cualquier porcentaje entre 50% y 100%, por ejemplo, 85%, 95% o 100%) idéntico a SEC ID N°: 1, que puede usarse, por ejemplo, para la detección del gen de haptoglobina humana en un sujeto o exploración de compuestos terapéuticos para tratar un trastorno asociado a proliferación celular.

Producto génico – De acuerdo con la presente invención, el producto génico se refiere a un producto génico distinto de una proteína. El producto génico puede ser un tramo de ARN con una función biológica distinta de un transcrito génico codificado por un gen particular. Transcrito génico – la secuencia de ARN mensajero codificada por un gen.

10 Proteína – Una molécula biológica compuesta de una o más cadenas de aminoácidos en un orden específico. Las proteínas pueden tener derivados tales como isoformas. Una isoforma proteica es una versión de una proteína con algunas pequeñas diferencias, habitualmente una variante de corte y empalmen o el producto de alguna modificación postraduccional. De acuerdo con la presente invención, además de isoformas, una proteína también puede abarcar fragmentos que son suficientemente grandes para que la proteína se detecte, identifique y/o cuantifique por el procedimiento o los procedimientos usados. Un complejo proteico es una mezcla de diferentes proteínas. La expresión de proteínas puede verse afectada o influida por un fármaco. Tales proteínas se denominan proteínas sensibles a fármaco. La invención también presenta una proteína aislada al menos 50% (incluyendo cualquier porcentaje entre 50% y 100%, por ejemplo, 85%, 95% o 100%) idéntica a SEC ID N°: 2, que puede usarse, por ejemplo, para detección de la proteína haptoglobina humana en un sujeto o exploración de compuestos terapéuticos con respecto a tratamiento de un trastorno asociado con proliferación celular.

20 Proteoma – El conjunto de proteína expresado por una célula u órgano en un momento particular y en condiciones específicas. En consecuencia, el análisis proteómico es el estudio del conjunto completo de proteínas codificadas por un genoma.

25 Porcentaje de Identidad – La “identidad porcentual” de dos secuencias de ácido nucleico se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul (1990), modificado como en Karlin y Altschul (1993). Un algoritmo tal se incorpora en los programas XBLAST de Altschul y col. (1990). Se realizan búsquedas de ácido nucleico de BLAST con el programa XBLAST. Cuando existen huecos entre dos secuencias, se utiliza BLAST con huecos como se describe en Altschul y col. (1997). Cuando se utilizan los programas de BLAST y BLAST con huecos, se usan los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST). Véase la dirección Web ncbi.nlm.nih.gov. El porcentaje de identidad de otras secuencias tales como secuencias proteicas puede determinarse de forma similar.

30 Anticuerpo – Una proteína de inmunoglobulina producida por linfocitos B del sistema inmune que se une a una molécula antigénica específica. El término incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fab, F(ab')₂ y Fv.

35 Fármaco – cualquier compuesto usado para el tratamiento (mitigación de, reducción de o cura para) cualquier enfermedad o condición o estado patológico.

Explorar – seleccionar un compuesto que tiene un efecto en cualquier enfermedad o condición patológica. La exploración puede implicar detectar, identificar y/o cuantificar cualquier biomolécula tal como una proteína, la expresión de la cual se ve afectada por el compuesto.

40 Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, de acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar y/o cuantificar la presencia de, o predisposición a, y/o gravedad de cáncer de ovario en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar al menos una muestra de fluido quístico de un sujeto;
- (b) determinar la expresión de proteína haptoglobina y
- (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de un control, indicando una diferencia en la expresión la presencia de, predisposición a, y/o gravedad de cáncer de ovario en el sujeto.

También se proporciona un procedimiento para pronosticar el resultado de cáncer de ovario en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- (a) proporcionar al menos una muestra de fluido quístico de un sujeto;
- (b) determinar la expresión de proteína haptoglobina y
- (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de al menos un control, indicando una diferencia en la expresión el pronóstico de cáncer de ovario en el sujeto.

También se proporciona un procedimiento para seleccionar al menos un candidato para ensayo o ensayos clínicos, experimentación y/o ensayo de diagnóstico que comprende:

- (a) proporcionar al menos una muestra de fluido quístico de un sujeto;
- (b) determinar la expresión de proteína haptoglobina y

(c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de al menos un control, indicando una diferencia en la expresión la adecuación del sujeto como un candidato.

También se proporciona un procedimiento para controlar la eficacia de un tratamiento para cáncer de ovario en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

- 5 (a) proporcionar al menos dos muestras de fluido quístico de un sujeto, cada muestra obtenida en diferentes puntos temporales;
 (b) determinar la expresión de una proteína haptoglobina; y
 (c) comparar la expresión de la proteína haptoglobina, en las al menos dos muestras, indicando una diferencia en la expresión la eficacia del tratamiento en el sujeto.

10 El control puede ser al menos un sujeto no diagnosticado con cáncer de ovario. El control también puede ser un sujeto, experimento o valor de referencia con el que pueden compararse los valores obtenidos en ensayos. Los valores o intervalos de control habitualmente representan el estado "normal" de modo que una diferencia o desviación estadística de los valores o intervalos de control representan un estado anómalo o patológico. La proteína haptoglobina puede ser proteína haptoglobina humana.

15 Como también se ha indicado en el presente documento anteriormente, la secuencia de una proteína haptoglobina se proporciona en SEC ID N°: 2. La determinación también puede ser por colorimetría. La colorimetría puede basarse en actividad peroxidasa de un complejo hemoglobina-haptoglobina en un sustrato. La determinación también puede ser por Espectrometría de Masas. La Espectrometría de Masas puede ser Espectrometría de Masas de Tiempo de Vuelo - Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz. La determinación también puede ser por un ensayo inmunorreactivo. El procedimiento puede comprender adicionalmente al menos una medición de CA-125 en la muestra o muestras y/o al menos una evaluación de ultrasonidos del sujeto.

Un kit de diagnóstico y/o pronóstico para la evaluación de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de ovario en un sujeto de acuerdo con la invención, puede comprender al menos una molécula o compuesto que se une y/o reacciona con una proteína haptoglobina obtenida de una muestra de fluido quístico.

25 La molécula puede ser al menos un polipéptido que se une a la proteína haptoglobina. La molécula puede ser un anticuerpo que se une a la proteína haptoglobina. La molécula puede ser un sustrato de haptoglobina y la reacción puede ser una acción enzimática por la proteína haptoglobina.

El sujeto puede ser un mamífero, en particular un ser humano.

30 Dado el conocimiento actual sobre el pronunciado gradiente de supervivencia en relación con la etapa en la que el cáncer se diagnostica, se propone que la detección temprana siga siendo el enfoque más prometedor para mejorar las tasas de supervivencia a largo plazo para cáncer de ovario. El conocimiento de las etapas tempranas del desarrollo de cáncer de ovario en los niveles celular y molecular es importante puesto que una expresión proteica alterada es una característica del cambio neoplásico. Por lo tanto, las proteínas secretadas por células de cáncer de ovario en fluido quístico pueden demostrar ser marcadores útiles para diferenciación intraoperatoria de cáncer y quistes benignos. También pueden proporcionar una fuente más rica de marcadores tumorales potenciales que son más difíciles de aislar e identificar cuando están diluidos entre proteínas más abundantes en el gran volumen de sangre circulatoria. Los marcadores tumorales cancerosos es un área en el que el enfoque de investigación proteómica es la diana de la investigación actual.

40 Niveles elevados de CA125, CA19-9, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 6 (IL-6), IL-8 y factor de necrosis tumoral (TNF) se han observado en fluido ascítico de estos pacientes con tumor (Darai y col., 2003). Además, se han indicado concentraciones significativas en los marcadores del sistema de activación de plasminógeno incluyendo uPA, PAI-1 y la relación de uPA:PAI-1, tPA:PAI-1 en fluido quístico de tumores de ovario en estos pacientes (Boss y col., 2002). Sin embargo, no existe enseñanza o sugerencia de que la haptoglobina en fluido quístico pueda ser útil como un biomarcador de diagnóstico para un trastorno proliferativo celular.

45 Se han llevado a cabo investigaciones para detectar biomarcadores potenciales para diagnóstico temprano de cáncer de ovario epitelial usando el enfoque basado en proteómica de fluido quístico de tumor de ovario.

50 Para obtener información adicional sobre el mecanismo bioquímico de los procedimientos neoplásicos, se han aplicado enfoques basados en proteómica a diagnóstico y aplicación médica. La tecnología proteómica de alto rendimiento es un nuevo campo emergente de la ciencia de las proteínas que complementa la electroforesis en gel uni y bidimensional convencional. A este respecto, la reciente técnica SELDI puede emplearse para separar y fraccionar proteínas, seguido de identificación de estas proteínas específicas por espectrometría de masas (EM) (Zhang y col., 2004) en un intento de caracterizar biomarcadores potenciales en fluidos biológicos.

55 Investigando diferencias en la expresión proteica entre tumores de ovario benignos y malignos en fluido quístico de ovario, puede ser posible detectar proteínas que están relacionadas con tumores malignos pero no con enfermedades benignas del ovario. Los inventores emplearon varias metodologías para identificar cambios en expresión proteica según el procedimiento de la presente invención.

5 En una realización en el presente estudio, los inventores emplearon técnicas SELDI (Tiempo de Vuelo de Desorción / Ionización Láser Potenciada en Superficie), SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), análisis de transferencia de western, MALDI-TOF-EM/EM en tándem (espectrometría de masas en tándem con tiempo de vuelo-desorción/ionización láser asistida por matriz) y ensayos inmunorreactivos tales como ELISA cuantitativo (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima). Los inventores fueron capaces de establecer las primeras pruebas para haptoglobina como un biomarcador potencial en fluido quístico que diferencia cáncer de ovario de tumores de ovario benignos.

10 Se recogieron y procesaron sesenta y tres casos de fluido quístico (28 de tumores de ovario epiteliales malignos y 35 de tumores de ovario epiteliales benignos) y se procesaron para análisis de espectrometría de masas SELDI-TOF. Se usaron SDS-PAGE y MALDI-TOF-EM-EM seguido de búsqueda en base de datos usando MASCOT para identificar el marcador proteico potencial.

15 Se realizaron ensayos de inmunocaptura y técnica de transferencia de Western para confirmar la identidad de haptoglobina. También se desarrolló un procedimiento de ELISA de tipo sándwich como se describe en el Ejemplo 5 para comparar los niveles de esta proteína en fluido quístico de cáncer de ovario epitelial y tumor benigno. Además, para introducir relevancia clínica y adecuación para exploración rápida (aproximadamente 5 minutos), los inventores emplearon un ensayo colorimétrico, de unión a colorante para determinar la identificación en tiempo real de esta proteína diana que podría facilitar el diagnóstico de la etapa específica del cáncer.

20 La espectrometría de masas (EM) separa moléculas basándose en sus relaciones de masa y carga (m/z). En un sistema de EM, las moléculas de interés se ionizan, se separan en un analizador basándose en sus relaciones m/z y después se detectan por un detector. Los resultados pueden presentarse en forma de un espectro de m/z. El sistema de EM habitualmente incluye un subsistema de análisis de datos para el análisis de los datos.

25 Puede conseguirse ionización de las moléculas por cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, la ionización de las moléculas puede conseguirse por los siguientes procedimientos, incluyendo: Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Ionización por Termopulverización (TSP), Ionización Química (CI), Impacto de Electrones (EI), Ionización por Electropulverización (ESI), Bombardeo Rápido de Átomos (FAB), Desorción de Campo / Ionización de Campo (FD/FI), Ionización y Desorción por Láser Potenciada en Superficie (SELDI) e Ionización y Desorción por Láser Asistida por Matriz (MALDI).

30 El analizador puede utilizar diferentes principios para el análisis de los iones, incluyendo cuadrípolos, sectores magnéticos y analizadores de transformada de Fourier, trampas iónicas de cuadrípulo y tiempo de vuelo (TOF). Pueden disponerse dos o más analizadores en tándem. Las geometrías de tándem habitualmente usadas incluyen geometría de cuadrípulo-cuadrípulo, sector magnético-cuadrípulo y cuadrípulo-tiempo de vuelo.

Un experto en la materia será capaz de seleccionar diferentes procedimientos de ionización, análisis y/o detección diferentes para estudiar mejor una biomolécula de interés tales como proteínas.

35 Un procedimiento de pronóstico de la presente invención implica comparar la expresión del biomarcador en muestras de pacientes con valores de referencia obtenidos de uno o más pacientes con resultados de enfermedad conocidos o de tejidos o células malignos o benignos conocidos. A continuación, será posible determinar los pronósticos de estos pacientes.

40 Un procedimiento de diagnóstico implica comparar uno o más de los niveles de proteína haptoglobina y/o ácido nucleico en una muestra preparada de un sujeto (es decir, un animal o un ser humano) con la de una muestra preparada de un sujeto normal, es decir, un sujeto que no padece o está en riesgo de desarrollar un trastorno asociado a proliferación celular o los de una muestra control.

45 Para procedimientos de pronóstico y diagnóstico, un nivel mayor de haptoglobina indica que el sujeto padece, o está en riesgo de, un trastorno asociado con proliferación celular. Este procedimiento puede usarse por sí mismo o junto con otros procedimientos para diagnosticar un trastorno asociado a proliferación celular en sujetos apropiados y para proporcionar un pronóstico para el resultado de la enfermedad.

Habiendo descrito ahora de manera general la invención, la misma se entenderá más fácilmente a través de la referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan como ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

Ejemplos

50 Materiales y Procedimientos

Muestras clínicas y de pacientes

Se reclutaron mujeres de 20 a 72 años de edad con tumores de ovario epiteliales malignos (n=28 incluyendo 11 cánceres de etapa temprana y 17 tardía) y 35 benignos para tratamiento quirúrgico abierto o laparoscópico en el Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Universitario Nacional, Singapur. Se recogieron fluidos del

quiste de carcinomas de ovario y tumores benignos durante la cirugía sin vertido intraoperatorio. Los fluidos se centrifugaron a 1500 g durante 10 minutos a 4°C y los sobrenadantes se dividieron en alícuotas de 1 ml y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta el análisis. La colección de muestras de fluido quístico usada para este estudio se aprobó por el Comité de Evaluación Específico de Dominio, National Healthcare Group, Singapur y se obtuvo consentimiento informado de cada paciente.

Análisis de SELDI-TOF

Se obtuvo descripción de perfiles de SELDI-TOF para proteínas de fluido quístico hidrófilas usando microplacas proteicas de fase normal (superficie hidrófila-NP20) (CIPHERGEN Biosystems, CA, Estados Unidos). Las microplacas proteicas se preincubaron con 5 µl de agua Millipore durante 5 minutos. Se añadieron después 5 µl de muestra a los puntos de microplaca proteica NP20 y se incubaron durante 1 hora. Se realizaron experimentos de inmunocaptura usando una serie de microplaca proteica PS20 (CIPHERGEN Biosystems, CA, Estados Unidos) previamente revestida con anticuerpo anti-haptoglobina. Se incubaron muestras (10 µl) con 90 µl de tampón de unión y se permitió que se unieran durante 2 horas. Después de dos lavados con tampón de lavado (Tritón X-100 0,5% en PBS), se secó al aire la serie y se trató con ácido sinapínico saturado en ácido trifluoroacético al 0,5% y acetonitrilo al 50% y se analizó usando el lector de microplaca proteica CIPHERGEN (modelo PBSII; CIPHERGEN Biosystems, CA, Estados Unidos). Se realizaron conjuntos por triplicado para cada muestra.

Las series se analizaron con el lector de microplaca proteica CIPHERGEN. Los espectros de masas de proteínas se generaron usando una media de 80 aplicaciones de láser en una muestra. Para adquisición de los datos de proteínas de bajo peso molecular, el intervalo de tamaño de detección fue de entre 8 y 25 kDa, con un tamaño máximo de 30 kDa. La intensidad del detector se estableció en 10 y la intensidad del láser se estableció en 240 V. Para las proteínas con el intervalo de masa molecular entre 25 y 50 kDa con un tamaño máximo de 60 kDa, se usó la sensibilidad del detector e intensidad de láser de 10 y 260 V respectivamente. La relación de masa y carga (m/z) de cada una de las proteínas capturadas en la superficie de la serie se determinó de acuerdo con patrones calibrados de forma externa (CIPHERGEN Biosystems, CA, Estados Unidos): insulina bovina (5.733,6 Da), ubiquitina humana (8.564,8 Da), citocromo bovino c (12.230,9 Da), mioglobina equina (16.951,5 Da), β-lactoglobulina A bovina (18.363,3 Da) y peroxidasa de rábano rústico (43.240 Da).

Los espectros de masas obtenidos del espectrómetro se procesaron primero usando software de microplaca proteica CIPHERGEN versión 3.0 para corrección de medida basal y detección máxima en el modo automático. Se restó la medida basal en un espectro para eliminar cualquier señal de medida basal que se debiera principalmente a ruido químico causado por la Molécula de Absorción de Energía (EAM). La detección de máximos identificó áreas del espectro de masas como máximos por comparación de la señal con cálculos de profundidad de valles adyacentes con una señal para relación de ruido de más de 5.

Separación e identificación de proteínas

Se concentró la proteína de fluido quístico usando procedimiento de precipitación con acetona durante una noche a 4°C. Se resuspendieron los sedimentos proteicos en tampón PBS y se centrifugaron. Se estimó la concentración proteica usando el procedimiento de Bradford (Bradford, 1976) y se cargó una cantidad igual de proteína (20 µg) en gel de SDS-PAGE 15%. El gel se tiñó usando kit de tinción de plata plus compatible con espectrometría de masas (Bio-Rad laboratories, CA, Estados Unidos). Se cortaron las bandas proteicas y se procesaron para digestión en gel. Las bandas de gel se cortaron en pequeños trozos que después se destiñeron, se lavaron y se deshidrataron. Se realizó reducción y alquilación por la adición de ditioneitol (DTT; 10mM) y yodacetamida (IAA; 55mM) (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) seguido de lavado y deshidratación. Los trozos de gel se suspendieron después en tripsina 12,5 ng/µl en bicarbonato de amonio 50 mM. Los péptidos se extrajeron y se concentraron en vacío y se desalaron usando Zip-Tip (Millipore, MA, Estados Unidos). Se llevó a cabo identificación de péptidos usando un espectrómetro de masas Tandem Mass Spectrometry Voyager-DE STR MALDI-TOF (Applied Biosystems, CA, Estados Unidos) con las siguientes especificaciones de rejilla. La adquisición de datos automáticos de EM se realizó en extracción retardada, modo de reflejo con potencial acelerante de 20.500 voltios; potencial de rejilla 73,5%, cable de rejilla 0,01% y tiempo de extracción de 380 ns: La intensidad de láser se estableció en 2700, con 100 aplicaciones por espectro. El intervalo de masas se estableció entre 800 y 3500 Da. La mezcla de angiotensina I y péptidos de ACTH (iones de 1296,6835 Da y 2465,1989 Da (M+H⁺)) se estableció como patrón de calibración interno.

Condiciones para búsqueda en base de datos Mascot:

La búsqueda en base de datos se realizó con Mascot (<http://matrixscience.com>). Para búsqueda de Mascot, los parámetros se establecieron como sigue: la base de datos se seleccionó con bases de datos no redundantes de NCBI y Swissprot, Homo sapiens, masa molecular de 0-250 kDa, digestión trípica con un número máximo de una escisión errónea. Las masas peptídicas se indicaron como monoisotópicas y se asumió que los restos de metionina estaban parcialmente oxidados. Adicionalmente, las búsquedas se llevaron a cabo con carbamidometilación de restos de cisteína. La tolerancia de masa se estableció en 100 ppm.

Análisis de transferencia de Western

Para analizar análisis de transferencia de Western para haptoglobina, se separaron 10 µg de proteína de cada muestra por SDS-PAGE 15%. Las bandas se transfirieron eléctricamente después a membranas de nitrocelulosa de 0,45 µm usando Celda de Transblot Semisecca (Bio-Rad laboratories, CA, Estados Unidos). Las membranas se empaparon en leche seca sin grasa al 5% en TBST (base Tris 20 mM; NaCl 500 mM, Tween 20 0,05%; pH 7,5) durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron durante una noche a 4°C con anticuerpo policlonal de conejo anti-haptoglobina humana (1:5000) (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca). Se lavaron tres veces con TBST y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con HRP (Pierce Biotechnology, IL, Estados Unidos) diluido en leche seca sin grasa al 5% en TBST (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron después y se revelaron con sustratos quimioluminiscentes (Pierce Biotechnology, IL, Estados Unidos).

Generación de anticuerpo y análisis Cuantitativo por el procedimiento de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) de tipo sándwich

Se generó anticuerpo de conejo policlonal contra la subunidad α de Hp usando la secuencia de aminoácidos, CKNYYKLRTQGQGVY (SEC ID N°: 3) (BioGenes, Berlín, Alemania). Después se usó el anticuerpo purificado por afinidad revelado para el análisis de ELISA. Se cuantificó el nivel total de haptoglobina o subunidad α de haptoglobina usando ELISA de tipo sándwich con anticuerpos policlonales contra Hp o subunidad α de Hp. Se revisitaron placas de PVC (NUNC, Roskilde, Dinamarca) con anticuerpo anti Hp humana de cabra (Biodesign, ME, Estados Unidos) en una dilución apropiada (1:200) con BSA 0,5% en tampón PBST (Tween20 0,05% en tampón PBS) durante una noche a 4°C. Después de bloquear con 200 µl de leche seca sin grasa 3% en PBST durante 2 horas a temperatura ambiente, se mezcló la muestra de fluido quístico individual con BSA 0,5% en tampón PBST (1:100). La mezcla diluida de 200 µl se añadió e incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Se usó haptoglobina humana purificada (Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) o subunidad α de haptoglobina (BioGenes, Berlín, Alemania) como patrón.

La placa se incubó después con anticuerpo anti Hp humana de conejo (1:400) (Dakocytomation, Glostrup, Dinamarca) o anticuerpo de subunidad α de Hp (1:100) diluido en BSA 0,5% en PBST a temperatura ambiente durante 2 horas seguido de adición de anticuerpo secundario anti-conejo marcado con biotina (1:400) y estreptavidina de fosfatasa alcalina (1:400) (Vector Laboratories, CA, Estados Unidos). Se aplicó p-Nitrofenilfosfato (Vector Laboratories, CA, Estados Unidos) a 5 mM en solución de bicarbonato sódico 100 mM a 37°C durante aproximadamente 1 hora. Para determinar la concentración de haptoglobina, se leyó la placa a 405 nM usando lector de ELISA (Tecan, Salzburg, Austria). Entre cada etapa de un ensayo, la placa se lavó 4 veces por inmersión en tampón PBST y después vaciando.

La medición de haptoglobina usando los kits de ensayo de haptoglobina PHASE RANGE para determinar la eficacia de un procedimiento rápido y preciso para detectar la malignidad de un tumor de ovario basándose en proteínas presentes en el ensayo de haptoglobina de fluido quístico se realizó en un ambiente de pH bajo con un ensayo de haptoglobina comercial PHASE RANGE (Tridelta Development Ltd, Kildare, Irlanda; también descrito en la patente de Estados Unidos 6.451.550). Se seleccionaron quistes transparentes para este ensayo y fluido quístico de 20 tumores de ovario benignos y 14 malignos se incluyeron para esta evaluación. El ensayo se basa en el hecho de que la actividad peroxidasa de hemoglobina libre se inhibe en un ambiente de pH bajo. La unión de haptoglobina con hemoglobina en un complejo conservará la actividad peroxidasa de la hemoglobina unida. Por lo tanto la actividad peroxidasa es directamente proporcional a la cantidad de haptoglobina presente en la muestra de ensayo. El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En este ensayo, se transfirieron 7,5 µl de cada calibrador preparado (0-2 mg/ml) junto con muestras de ensayo por duplicado, a la microplaca de blanco. Después se añadieron 100 µl de solución de hemoglobina y se mezcló minuciosamente con la muestra. Se añadieron 140 µl de una mezcla de cromógeno y sustrato y la placa se incubó durante 3 y 5 minutos. Se realizaron ensayos iniciales y se decidió el color patrón como un punto de corte para diferenciar quiste maligno de benigno. Se registró reacción de color positivo a 3 y 5 minutos respectivamente.

Evaluación de tumor de ovario usando sistema de puntuación ultrasonográfico

Se realizó examinación de ultrasonido transvaginal en una vejiga urinaria vacía usando un transductor de sector (5-8 MHz) con una sección de imagen de 290° /240° (Acuson Sequoia Echo Ultrasound System, CA, Estados Unidos). La información de ultrasonidos de estos pacientes se registró usando un sistema de puntuación simple para evaluar el estado de malignidad de tumores de ovario basándose en 1) presencia de tumor sólido o quístico, 2) presencia de área sólida en el quiste, 3) presencia de septos y 4) flujos sanguíneo descrito anteriormente (Daskalakis y col., 2004). Estos criterios morfológicos permiten a los inventores superar la interpretación subjetiva de lesiones de ovario y evaluar un papel preciso para esta técnica de diagnóstico en el tratamiento de pacientes con lesiones de ovario persistentes. Una puntuación global mayor de tres se consideró un valor de punto de corte en la diferenciación de tumores de ovario malignos y benignos. Después de la cirugía se realizó una comparación de los hallazgos ultrasonográficos e histopatológicos.

Análisis estadístico

Para la comparación de las diferencias entre la media de concentración de haptoglobina en fluido quístico de cáncer de ovario benigno y maligno, se llevó a cabo un ensayo de t de muestras independientes usando el software SPSS 11.0. Se realizó un análisis de correlación de Pearson para evaluar cualquier relación en las concentraciones de haptoglobina medidas por el procedimiento de PHASE RANGE y procedimientos de ELISA. Se realizaron curvas de característica operativa del receptor (ROC) para evaluar el rendimiento de biomarcadores en fluido quístico usando análisis de puntos separados basándose en el estudio previo. Se establecieron treinta y cinco umbrales para cada biomarcador para minimizar las relaciones de falso positivo y falso negativo.

Resultados

10 Análisis de espectrometría de masas

Electroforesis en gel unidimensional, análisis de MALDI-TOF-EM-EM y experimentos de inmunocaptura confirmaron la subunidad de haptoglobina $\alpha 2$ como un biomarcador potencial para tumores de ovario malignos. El análisis de SELDI-TOF mostró la presencia de un biomarcador potencial de aproximadamente 17 kDa.

15 La Figura 1 muestra perfiles de SELDI representativos que varían de 7 kDa a 20 kDa de acuerdo con la relación de m/z. Los perfiles proteicos de fluido quístico de cáncer de ovario epitelial mostraron la presencia de un pico de alta intensidad con la media de intensidad de $3,23 \pm 0,85$ a 17 kDa que se redujo en gran medida o estaba ausente en los tumores benignos.

20 La Figura 2 indica las bandas proteicas entre 15 kDa y 20 kDa que se expresaron predominantemente en fluidos quísticos de muestras de cáncer de ovario en comparación con fluidos quísticos de tumores de ovario benignos. Las bandas proteicas seleccionadas se escindieron del gel y se sometieron a digestión en gel seguido de análisis de MALDI-TOF-EM/EM en tándem. Se usaron espectros correspondientes de la proteína para búsqueda proteica en la base de datos de NCBI por identificación genética de masa peptídica. Se seleccionaron los cuatro péptidos más intensos para análisis de EM/EM. Los péptidos coincidentes de la secuencia tienen una homología del 74% con la de la subunidad $\alpha 2$ de haptoglobina.

25 La espectrometría de masas de proteínas de fluidos biológicos resuelta por electroforesis en gel típicamente requiere proteína en el intervalo de microgramos (Mortz y col, 1994). El fluido quístico de pacientes que presentan carcinomas ováricos epiteliales de etapa temprana y tardía está dotado de abundantes proteínas y por lo tanto es apropiado para esta evaluación. Para descubrir la identidad del marcador proteico potencial con la masa de aproximadamente 17 kDa, que distinguía cáncer de ovario de tumores benignos; los inventores utilizaron SDS-PAGE para separar las mezclas proteicas y aislar las bandas proteicas correspondientes entre 15 y 20 kDa.

35 Los perfiles proteicos explícitos que usan este análisis de alto rendimiento confirmaron la presencia de subunidad $\alpha 2$ de haptoglobina (Figura 3). Se muestra posteriormente un sumario de la información de secuencia para SEC ID N°: 4 mientras que las secuencias peptídicas determinadas por análisis de EM/EM se representan en la Tabla 1. Para reconfirmar que la haptoglobina en SDS-PAGE es el pico correspondiente de la microplaca proteica y los experimentos de inmunocaptura, se repitió el experimento de microplaca proteica con la diferencia de que se preincubó la microplaca proteica PS20 con anti-haptoglobina. Los resultados de este procedimiento proporcionaron pruebas que confirmaron que el pico de 17 kDa es la haptoglobina identificada en el SDS-PAGE (Figura 5).

SEC ID N°: 4 es la secuencia de la subunidad $\alpha 2$ de haptoglobina humana (N° de acceso de base de datos de NCBI 701184A) y la secuencia peptídica coincidente está en negrita y subrayada. La cobertura de secuencias es del 74%

40 VNDSGNDVTD IADDGQPPPK CIAHGYVEHS **VRYQCKNYK LRTQGDGVY LNNEKQWINK AVGDKLPECE AD-DGQPPPK IAHGYVEHSV RYQCKNYKL RTQGDGVYTL NNEKQWINKA VGDKLPECEA VGKPKNPANP VQ**
(SEC ID N°: 4)

Tabla 1 La secuencia peptídica de los cuatro picos más intensos observados en los espectros de masas usando análisis de EM/EM.

Observado	Mr (expt)	Comienzo	Final	Iones	Péptido (SEC ID N°)
1439,72	1438,71	60	72	106	TEGDGVYTLNDKK (5)
1580,85	1579,84	58	71	17	LRTEGDGVYTLNDK (6)
1708,91	1707,90	117	131	49	LRTEGDGVYTLNNEK (7)
1857,98	1856,97	137	153	29	AVGDKLPECEAVCGKPK (8)

45

Análisis de transferencia de Western

Para confirmar adicionalmente la identidad de la proteína, los inventores realizaron análisis de transferencia de western usando anticuerpo policlonal anti-haptoglobina humana de conejo para detectar las diferentes subunidades de haptoglobina. Los resultados del procedimiento de transferencia indicaron la presencia de diferentes subunidades de haptoglobina en el fluido quístico de tumores de ovario epiteliales (Figura 4). Basándose en el peso molecular, las unidades correspondientes identificadas fueron β (40 kDa); $\alpha 2$ (16,5 kDa) y $\alpha 1$ (9 kDa).

Estos resultados, junto con los datos de SELDI y SDS-PAGE, claramente indicaron que los niveles de haptoglobina eran elevados en cáncer de ovario epitelial en comparación con enfermedad benigna.

Ejemplo 1 – Validación cuantitativa por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

Para explorar adicionalmente y cuantificar los niveles de subunidad α de Hp o haptoglobina en fluido quístico totales, se estableció un procedimiento de ELISA de tipo sándwich interno. Se ensayaron tres muestras de diferentes concentraciones 8 veces el mismo día (intraensayo) y se repitieron en 5 días consecutivos (inter-ensayo). Los coeficientes de varianza (CV) fueron de 3,8% y 14,2% para el intraensayo y los interensayos para Hp; 4,5% y 13,2% para el ensayo de subunidad α de Hp, respectivamente. La comparación de la media de los niveles de Hp o subunidad α de Hp en sujetos benignos y los que presentaban cáncer de etapa temprana y tardía se analizó usando análisis ANOVA. Se observó una diferencia significativa entre los tres grupos de pacientes como se indica en la Tabla 2 y pudo obtenerse de este modo un pronóstico basándose en la etapa de enfermedad identificada. Se proporciona una representación de cajas de los datos en la Figura 6.

Tabla 2

	Nº de Grupo	Nivel de Hp (mg/ml)		Subunidad α de H ($\mu\text{g/ml}$)	
		Media	P	Media	P
Cáncer Tardío	15	6,35	<0,001	216,3	<0,001
Cáncer Temprano	11	3,33	<0,05	137,9	
Benigno	35	1,43		71,4	

Por lo tanto es posible diagnosticar y calificar el cáncer midiendo el nivel de proteína haptoglobina, fragmento o derivado de la misma en fluido quístico usando la técnica de ELISA.

Ejemplo 2 – Validación cuantitativa por los kits de ensayo de Haptoglobina PHASE RANGE.

La diferencia del valor de DO en los puntos temporales de 3 minutos y 5 minutos para los ensayos de PHASE RANGE en fluido quístico de tumores de ovario benignos y malignos se analizaron usando el software SPSS 13.0. Se observó una diferencia significativa en la intensidad del desarrollo de color en 25 de las 28 muestras (89%) de pacientes con cáncer de ovario epitelial en comparación con los que presentaban tumores benignos (Figura 7).

Además, como se ha indicado en la Figura 7, existió una correlación positiva significativa entre los niveles de haptoglobina medida por ELISA y los ensayos de PHASE RANGE con un valor de coeficiente de r cuadrado de correlación de Pearson de 0,81. Las mediciones de haptoglobina en fluido quístico por cualquiera de los procedimientos sería por lo tanto útil en la diferenciación de cánceres de ovario benignos y malignos y también para la evaluación de pronóstico del cáncer. Basándose en estos criterios, nuestros datos indican que los ensayos de PHASE RANGE de 5 minutos de haptoglobina serían un predictor rápido y útil de tumores malignos en pacientes que presentan esta enfermedad insidiosa. Este procedimiento de unión a colorante de ensayo rápido es útil por sí mismo o como un adjunto para otras medidas de diagnóstico tales como técnicas de sección congelada que se emplean actualmente en centros de oncología establecidos y permitirán al ginecólogo discernir estados malignos durante el procedimiento operatorio.

Ejemplo 3 – Medición de haptoglobina junto con otras medidas de diagnóstico

Evaluación de ultrasonidos

Usando ultrasonido de Doppler de color transvaginal los inventores identificaron correctamente 25 de 28 tumores malignos así como 24 de 33 tumores benignos. La sensibilidad y especificidad del ultrasonido de Doppler de color fue del 89,3% y 72,7% respectivamente. Los valores predictivos positivos y negativos (PPV y NPV respectivamente) del procedimiento fueron del 52,2% y 88,4% respectivamente.

Análisis multivariable de haptoglobina en combinación con CA-125 y ultrasonido. Se observó que el ensayo de unión a colorante de haptoglobina por sí solo poseía sensibilidad del 89%; especificidad del 91%; valor predictivo positivo

(PPV) del 76,7% y valor predictivo negativo (NPV) del 96,8% respectivamente. Se realizaron después curvas de ROC (característica operativa del receptor) para haptoglobina en fluido quístico, niveles de CA-125 en suero y ultrasonografía para examinar la capacidad de estos parámetros para diferenciar mejor tumores de ovario malignos y benignos. Se mostró que la haptoglobina tenía un rendimiento predictivo potenciado en combinación con CA-125 y parámetros de ultrasonido dando un área bajo la curva (AUC) de 0,957 con un intervalo de confianza del 95% de 0,903-1,012 (Figura 9). Además, se observó que una combinación de tres parámetros en nuestros pacientes tenían una sensibilidad del 89% y especificidad del 94,3% con un PPV del 83,9% y NPV del 96,4% para cánceres de ovario (Tabla 3).

Tabla 3

	AUC	95% C.I.
Combinación	0,957	0,903-1,012
Ultrasonido	0,853	0,753-0,952
CA-125	0,866	0,773-0,952
Hp	0,903	0,821-0,984

Por lo tanto, el uso de una combinación de medidas multivariadas con la cuantificación de haptoglobina de fluido quístico posibilita la detección sensible de cáncer de ovario con alta confianza.

Kit

Uso de la invención

La progresión de cáncer de ovario está asociada con la acumulación de fluido quístico en el quiste ovárico dentro de la cavidad abdominal. La haptoglobina es una glucoproteína ácida α_2 determinada genéticamente con capacidad de unión a hemoglobina (Bowman y col., 1982), presente en la mayoría de los fluidos corporales de seres humanos y otros mamíferos. Se sintetiza predominantemente por el hígado y actúa como un antioxidante y, en virtud de unión a hemoglobina, evita daño oxidativo a tejidos que puede mediarse por hemoglobina libre, Langlois y col. (1996).

Los datos del estudio de los inventores han mostrado que la haptoglobina sirve como un marcador en fluido quístico de pacientes que presentan cáncer de ovario epitelial. Los inventores usaron análisis de SELDI y procedimientos de SDS-PAGE para detectar la presencia de una proteína de 17 kDa que estaba presente predominantemente en fluido quístico de pacientes con cáncer con tumores malignos en comparación con los de tumores benignos. Esta proteína se identificó posteriormente como haptoglobina usando el enfoque de MALDI-TOF-EM/EM. La identidad de esta glucoproteína se confirmó adicionalmente usando análisis de transferencia de Western. Además, un procedimiento de ELISA de tipo sándwich también indicó una diferencia significativa en la concentración de este biomarcador entre los grupos de cáncer y benignos examinados ($P < 0,001$). La precisión diagnóstica global usando niveles de haptoglobina y CA-125 con parámetros de ultrasonidos fueron como sigue: sensibilidad 89%, especificidad 94,3%, valor predictivo positivo (PPV) 83,9% y valor predictivo negativo (NPV) 96,4% respectivamente. Sin embargo, usando el ensayo de unión a colorante de haptoglobina por sí solo se observó que poseía una sensibilidad del 89%; especificidad del 91%; PPV del 76,7% y NPV del 96,8% respectivamente. Los datos de los inventores demuestran que la haptoglobina es un biomarcador fiable que podría permitir la detección rápida de tumores malignos.

Una comparación de los perfiles proteicos de SELDI-TOF, SDS-PAGE y transferencia de western confirmó un péptido de 17 kDa identificado como subunidad α_2 de haptoglobina. De forma similar nuestra técnica de ELISA interna para la molécula haptoglobina indicó concentraciones significativamente más altas de esta glucoproteína en fluido quístico de cáncer de ovario epitelial de etapa temprana y tardía en comparación con las que se presentan con enfermedades benignas.

La elevación de haptoglobina en sueros y fluido ascítico de cáncer de ovario se ha indicado en estudios previos usando el procedimiento de ELISA (Elg y col., 1993;). Recientemente, se han utilizado enfoques basados en proteómica para descubrir e identificar nuevas proteínas como biomarcadores de diagnóstico potenciales. Ye y col. (2003) han identificado la subunidad α de haptoglobina como un biomarcador de suero potencial en cáncer de ovario con una sensibilidad del 95% y una especificidad del 91% combinado con CA-125. Sin embargo, no hubo enseñanza o sugerencia de que la haptoglobina de fluido quístico pueda usarse como un biomarcador para cáncer de ovario.

Usando el análisis de SELDI-TOF, los investigadores descubrieron que se encontraba un pico a aproximadamente 17 kDa predominantemente en cánceres de ovario de etapa tardía. Se usó SDS-PAGE y MALDI-TOF-EM/EM para identificar esta proteína particular como subunidad α de haptoglobina. Además, usando el procedimiento de ELISA de tipo sándwich interno, los investigadores han demostrado que las concentraciones de haptoglobina eran significativamente elevadas en fluido quístico de cáncer de ovario epitelial en comparación con tumores benignos. A

partir de la presente invención puede usarse medición de punto de corte simple como un predictor fiable de tumor maligno.

5 Esto tiene importantes implicaciones clínicas puesto que la experiencia de los inventores, el ensayo de haptoglobina de PHASE RANGE es un procedimiento fiable para confirmar malignidad en cáncer de ovario. La determinación de cáncer de ovario actualmente se realiza por sección congelada de tejido ovárico por un patólogo durante la cirugía. En nuestra experiencia, el uso del kit PHASE RANGE en un momento de corte de 5 minutos permitió la diferenciación de tumores de ovario epiteliales malignos de benignos con las características generales de que el ensayo tiene sensibilidad del 89%; especificidad del 91%, PPV del 76,7% y NPV del 96,8% respectivamente. En comparación, la técnica de sección congelada es cara y consume tiempo y en muchas instituciones médicas o establecimientos clínicos, depende de la disponibilidad de un patólogo a cargo. El procedimiento de la presente invención puede implicar una combinación de los tres parámetros, haptoglobina, CA125 y ultrasonografía en nuestros pacientes para obtener una mejor precisión diagnóstica en comparación con el uso de cualquier parámetro único.

15 Sin embargo, cuando se considera por sí misma, la haptoglobina es un marcador de diagnóstico viable capaz de detectar malignidad de estos tumores con una AUC de 0,903 (Figura 9; Tabla 3).

20 Estudios anteriores, sin embargo, han indicado que la exploración de población general de marcadores proteicos en suero con un PPV mínimo del 10% (es decir no más de nueve falsos positivos por cada positivo auténtico) será beneficiosa en diferenciación de cáncer de ovario epitelial. Sin embargo esto no es viable ni rentable en una situación clínica en la que se produce una baja prevalencia de este cáncer en mujeres, puesto que se ha calculado que se requiere un 99,6 por ciento de especificidad para que cualquier ensayo de exploración de cáncer de ovario tenga un verdadero impacto (Mor y col., 2005). En este estudio, sin embargo los inventores seleccionaron solamente los pacientes con quiste ovárico para diferenciar quiste ovárico benigno de maligno durante el procedimiento operatorio. Esta medida mejoraría la relativamente alta prevalencia de cáncer de ovario en el presente grupo de estudio, el PPV del cual se observó que era 83,9%. Basándose en este criterio, los inventores destacan un límite de punto temporal simple para la reacción de color de haptoglobina en fluido quístico que podría utilizarse de forma eficaz en el ambiente operatorio para identificar tumores malignos con mayor facilidad y rapidez.

25 Los informes de Bin Ye y col y Ahmed y col se han centrado en la identificación proteómica de precursores de haptoglobina o subunidades en los sueros de mujeres con cáncer de ovario y su posible papel como marcadores tumorales (Ye y col., 2003; Ahmed y col., 2004). Sin embargo, la principal fuente de haptoglobina circulante en humanos es el hígado y el aumento de haptoglobina en suero al que contribuye la enfermedad maligna no se ha estudiado bien. Además es un marcador no específico que está elevado en otras afecciones diversas, por lo tanto su validación como un marcador tumoral en suero clínicamente útil puede ser difícil de establecer.

30 Sin embargo, usando técnicas inmunohistoquímicas Ahmed y col. (2004) también han indicado ausencia de actividad de haptoglobina en tejido ovárico normal pero se observó tinción de moderada a fuerte en tejidos de cáncer de ovario. La identificación de niveles significativamente aumentados de haptoglobina en fluido quístico de cáncer de ovario identificados por los inventores pueden tener implicaciones clínicas más importantes.

35 La determinación de niveles de haptoglobina en fluido quístico intraoperatoria usando un kit de ensayo simple con un valor de corte específico permite la identificación de mujeres que pueden requerir evaluación patológica adicional con sección congelada y por lo tanto, puede instituirse un procedimiento operatorio más complejo. Se ha documentado que la cirugía inicial realizada por un oncólogo ginecológico entrenado tiene un impacto favorable en la supervivencia a largo plazo de pacientes con esta enfermedad (Guidelines, Gynecol Oncol, 2000). Un procedimiento tal permitirá la determinación de la fase de cáncer de ovario de forma quirúrgica apropiada y de este modo evita la necesidad de repetir la cirugía en tumores malignos que se han diagnosticado erróneamente como quistes "benignos". El biomarcador de haptoglobina posee el potencial para reflejar el estado maligno de las mujeres aquejadas y tendrían impacto positivo en el resultado clínico.

40 Incluso un resultado negativo para el procedimiento de la presente invención es informativo. A medida que se operan más quistes de ovario de forma laparoscópica, un resultado negativo indicará que el quiste no es canceroso y el cirujano puede proceder con la cistectomía con un mayor nivel de confianza.

45 Resultará evidente para un experto en la materia que la presente invención también puede usarse en medicina veterinaria para animales.

Referencias

Ahmed N, Barker G, Oliva KT, y col. Proteomic-based identification of haptoglobin-1 precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer. *Br J Cancer*; 91 (1): 129-40 (2004)

55 Boss EA, Massuger LF, Thomas CM, y col. Clinical value of components of the plasminogen activation system in ovarian cyst fluid. *Anticancer Res*; 22(1A): 275-82 (2002)

Bowman BH, Kurosky A. Haptoglobin: the evolutionary product of duplication, unequal crossing over, and

- point mutation. *Adv Hum Genet*; 12: 189-261, 453-4 (1982)
- Bradford MM *Anal. Biochem.* 72, 248 (1976)
- Canis y col. Frozen section in laparoscopic management of macroscopically suspicious ovarian masses. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*; 11: 365-9 (2004).
- 5 Cannistra SA. Cancer of the ovary. *N Engl J Med.* 1993; 329(21): 1550-1559
- Darai E, Detchev R, Hugol D, Quang NT. Serum and cyst fluid levels of interleukin (IL) -6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha in women with endometriomas and benign and malignant cystic ovarian tumours. *Hum Reprod*;18(8): 1681-5 (2003)
- 10 Daskalakis G, Kalmantis K, Skartados N, Thomakos N, Hatzioannou L, Antsaklis A. Assessment of ovarian tumors using transvaginal color Doppler ultrasonography. *Eur J Gynaecol Oncol*; 25(5): 594-6 (2004).
- Devarbhavi H, Kaese D, Williams AW, Rakela J, Klee GG, Kamath PS. Cancer antigen 125 in patients with chronic liver disease. *Mayo Clin Proc*; 77(6): 538-41 (2002)
- Elg SA, Carson LF, Fowler JM, Twiggs LB, Moradi MM, Ramakrishnan S. Ascites levels of haptoglobin in patients with ovarian cancer. *Cancer*; 71(12): 3938-41 (1993)
- 15 Guidelines for referral to a gynecologic oncologist: rationale and benefits. The Society of Gynecologic Oncologists. *Gynecol Oncol*; 78(3 Pt 2): S1-13 (2000).
- Jacobs IJ, Menon U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Mol Cell Proteomics*; 3(4): 355-66 (2004)
- 20 Jacobs IJ, Skates SJ, MacDonald N, y col. Screening for ovarian cancer: a pilot randomised controlled trial. *Lancet*; 353(9160): 1207-10 (1999)
- Jennings TS, Dottino PR. The application of operative laparoscopy to gynecologic oncology. *Curr Opin Obstet Gynecol.*; 6(1): 80-5 (1994).
- 25 Karlan BY, Baldwin RL, Lopez-Luevanos E, y col. Peritoneal serous papillary carcinoma, a phenotypic variant of familial ovarian cancer: implications for ovarian cancer screening. *Am J Obstet Gynecol*; 180(4): 917-28 (1999)
- Kristensen GB., Trope C. Epithelial ovarian carcinoma. *Lancet.* 1997; 349(9045): 113-117.
- Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem*; 42(10): 1589-600 (1996)
- 30 Lim y col., 1997 Lim FK, Yeoh CL, Chong SM, Arulkumaran S. Pre and intraoperative diagnosis of ovarian tumours: how accurate are we? *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* Mayo de 1997; 37(2): 223-7.
- Mackey SE, Creasman WT. Ovarian cancer screening. *J Clin Oncol*; 13(3): 783-93 (1995)
- Maiman M. Seltzer V, Boyce J Laparoscopic excision of ovarian neoplasms subsequently found to be malignant. *Obstet Gynecol.*; 77(4): 563-5 (1991).
- 35 Michel G, De Iaco P, Castaigne D y col. Extensive cytoreductive surgery in advanced ovarian carcinoma. *Eur J Gynaec Oncol*; 18: 9-15 (1997).
- Mor G, Visintin I, Lai Y, y col. Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 102(21): 7677-82 (2005)
- 40 Mortz E, Vorm O, Mann M, Roepstorff P. Identification of proteins in polyacrylamide gels by mass spectrometric peptide mapping combined with database search. *Biol Mass Spectrom*; 23(5): 249-61 (1994)
- Robinson WR, Curtin JP, Morrow CP. Operative staging and conservative surgery in management of low malignant potential ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer*; 2: 113-8 (1992).
- Vergote IB, De Wever I, Decloedt J y col. Neoadjuvant chemotherapy or primary debulking surgery in advanced ovarian carcinoma: a retrospective analysis of 285 patients. *Gynecol Oncol*; 71: 431-436 (1998).
- 45 Wingo, P. A., Ries, L. A., Rosenberg, H. M., Miller D. S., Edwards B. K. Cancer incidence and mortality, 1973-1995: a report card for the U. S. *Cancer* 1998; 82: 1197-1207.
- Woolas RP, Oram DH, Jeyarajah AR, Bast RC, Jacobs IJ. Ovarian cancer identified through screening with

serum markers but not by pelvic imaging. *Int J Gynecol Cancer*; 9(6): 497-501 (1999)

Ye B, Cramer DW, Skates SJ, y col. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res*; 9(8): 2904-11 (2003)

5 Yeo ELK, Ju KM, Poddar NC, Hui PK, Tang LCH. The accuracy of intraoperative frozen section in the diagnosis of ovarian tumors. *J Obstet Gynaecol*; 24: 189-95 (1998).

Zhang R, Barker L, Pinchev D, y col. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics*; 4(1): 244-56 (2004)

Documento US6.451.550

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Nacional de Singapur

<120> Biomoleculas de diagnóstico

<130> FP3804

<150> SG 200605961-2

15 <151> 05-09-2006

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1433

20 <212> ADN

<213> Humano

<400> 1

ES 2 362 121 T3

```

agatgcccc a cagcactgct cttccagagg caagaccaac caagatgagt gccctgggag      60
ctgtcattgc cctcctgctc tggggacagc tttttgcagt ggactcaggc aatgatgtca      120
cggatatcgc agatgacggc tgcccgaagc cccccgagat tgcacatggc tatgtggagc      180
actcggttcg ctaccagtgt aagaactact acaaactgcg cacagaagga gatggagtat      240
acaccttaaa tgataagaag cagtggataa ataaggctgt tggagataaa cttcctgaat      300
gtgaagcaga tgacggctgc ccgaagcccc ccgagattgc acatggctat gtggagcact      360
cggttcgcga ccagtgtgag aactactaca aactgcgcac agaaggagat ggagtgtaca      420
ccttaaacia tgagaagcag tggataaata aggctgttgg agataaactt cctgaatgtg      480
aagcagtatg tgggaagccc aagaatccgg caaaoccagt gcagcggatc ctgggtggac      540
acctggatgc caaaggcagc tttccctggc aggctaagat ggtttccac cataatctca      600
ccacaggtgc cacgctgac aatgaacaat ggctgctgac cacggctaaa aatctcttcc      660
tgaaccattc agaaaatgca acagcgaaag acattgcccc tactttaaca ctctatgtgg      720
ggaaaagca gcttgtagag attgagaagg ttgttctaca ccctaactac tcccaggtag      780
atattgggct catcaaaactc aaacagaagg tgtctgttaa tgagagagtg atgcccattc      840
gcctaccttc aaaggattat gcagaagtag ggcgtgtggg ttatgtttct ggctgggggc      900
gaaatgcaa ttttaaattt actgaccatc tgaagtatgt catgctgcct gtggctgacc      960
aagaccaatg cataaggcat tatgaaggca gcacagtccc cgaaaagaag acaccgaaga     1020
gccctgtagg ggtgcagccc atactgaatg aacacacctt ctgtgctggc atgtctaagt     1080

accaagaaga cacctgctat ggcgatgagg gcagtgcctt tgccgttcac gacctggagg     1140
aggacacctg gtatgcgact gggatcttaa gctttgataa gagctgtgct gtggctgagt     1200
atggtgtgta tgtgaagggt acttccatcc aggactgggt tcagaagacc atagctgaga     1260
actaatgcaa ggctggccgg aagcccttgc ctgaaagcaa gatttcagcc tgggaagaggg     1320
caaagtggac gggagtggac aggagtggat gcgataagat gtggtttgaa gctgatgggt     1380
gccagccctg cattgctgag tcaatcaata aagagctttc tttgacca ttt                1433

<210> 2
<211> 406
<212> PRT
5 <213> Humano
<400> 2

```

ES 2 362 121 T3

Met Ser Ala Leu Gly Ala Val Ile Ala Leu Leu Leu Trp Gly Gln Leu
 1 5 10 15

Phe Ala Val Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly
 20 25 30

Cys Pro Lys Pro Pro Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val
 35 40 45

Arg Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly
 50 55 60

Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly
 65 70 75 80

Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Cys Pro Lys Pro Pro
 85 90 95

Glu Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys
 100 105 110

Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn
 115 120 125

Asn Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu
 130 135 140

Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln

Glu Tyr Gly Val Tyr Val Lys Val Thr Ser Ile Gln Asp Trp Val Gln
 385 390 395 400

Lys Thr Ile Ala Glu Asn
 405

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

5

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia para generar anticuerpo de conejo policlonal contra subunidad alfa de Hp

<400> 3

Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Gln Gly Asp Gly Val Tyr
 1 5 10 15

10

<210> 4

<211> 142

<212> PRT

<213> Humano

<400> 4

Val Asn Asp Ser Gly Asn Asp Val Thr Asp Ile Ala Asp Asp Gly Gln
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Lys Cys Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg
 20 25 30

Tyr Gln Cys Lys Asn Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Gln Gly Asp Gly Val
 35 40 45

Tyr Thr Leu Asn Asn Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp
 50 55 60

Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Asp Asp Gly Gln Pro Pro Pro Lys Cys
 65 70 75 80

Ile Ala His Gly Tyr Val Glu His Ser Val Arg Tyr Gln Cys Lys Asn
 85 90 95

Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr Gln Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asn
 100 105 110

15

ES 2 362 121 T3

Glu Lys Gln Trp Ile Asn Lys Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys
115 120 125

Glu Ala Val Gly Lys Pro Lys Asn Pro Ala Asn Pro Val Gln
130 135 140

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 5

Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys Lys
1 5 10

<210> 6

<211> 14

10 <212> PRT

<213> Humano

<400> 6

Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asp Lys
1 5 10

<210> 7

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Humano

<400> 7

Leu Arg Thr Glu Gly Asp Gly Val Tyr Thr Leu Asn Asn Glu Lys
1 5 10 15

20 <210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Humano

<400> 8

Ala Val Gly Asp Lys Leu Pro Glu Cys Glu Ala Val Cys Gly Lys Pro
1 5 10 15

25 Lys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para detectar o cuantificar la presencia de, o predisposición a, o gravedad de o pronosticar el resultado de cáncer de ovario en un sujeto o seleccionar al menos un candidato para ensayo o ensayos clínicos, experimentación o ensayo de diagnóstico para cáncer de ovario o indicar la eficacia del tratamiento, comprendiendo el procedimiento:
- 10 (a) determinar en al menos una muestra de fluido quístico obtenida de un sujeto, la expresión de proteína haptoglobina; y
(b) comparar la expresión de la proteína haptoglobina con la de un control, indicando una diferencia en la expresión la presencia de, predisposición a, gravedad de o pronostico del resultado de cáncer de ovario en el sujeto o la adecuación del sujeto como un candidato o indicación de la eficacia del tratamiento.
- 15 2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:
- (a) determinar en al menos dos muestras de fluido quístico obtenidas de un sujeto, cada muestra obtenida en diferentes puntos temporales, la expresión de una proteína haptoglobina; y
(b) comparar la expresión de la proteína haptoglobina en las al menos dos muestras, indicando una diferencia en la expresión la eficacia del tratamiento en el sujeto.
- 20 3. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el control es al menos un sujeto no diagnosticado con cáncer de ovario.
4. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la proteína haptoglobina es proteína haptoglobina humana.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de la proteína haptoglobina se da en SEC ID N°: 2.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el procedimiento comprende adicionalmente al menos una medición de CA-125 en la muestra o muestras.
- 30 7. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el procedimiento comprende adicionalmente al menos una evaluación de ultrasonidos del sujeto.
8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto es un mamífero.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la expresión de proteína haptoglobina se mide por determinación de la presencia de:
- 35 (a) proteína haptoglobina total;
(b) al menos una subunidad de la proteína haptoglobina y/o
(c) transcrito génico que codifica la proteína haptoglobina.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la expresión de proteína haptoglobina se mide por determinación de la presencia de subunidad α o subunidad β de la proteína haptoglobina.
- 35 11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la subunidad α de la proteína haptoglobina es la subunidad α_2 .
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la expresión de proteína haptoglobina se determina usando al menos un anticuerpo.

Figura 1

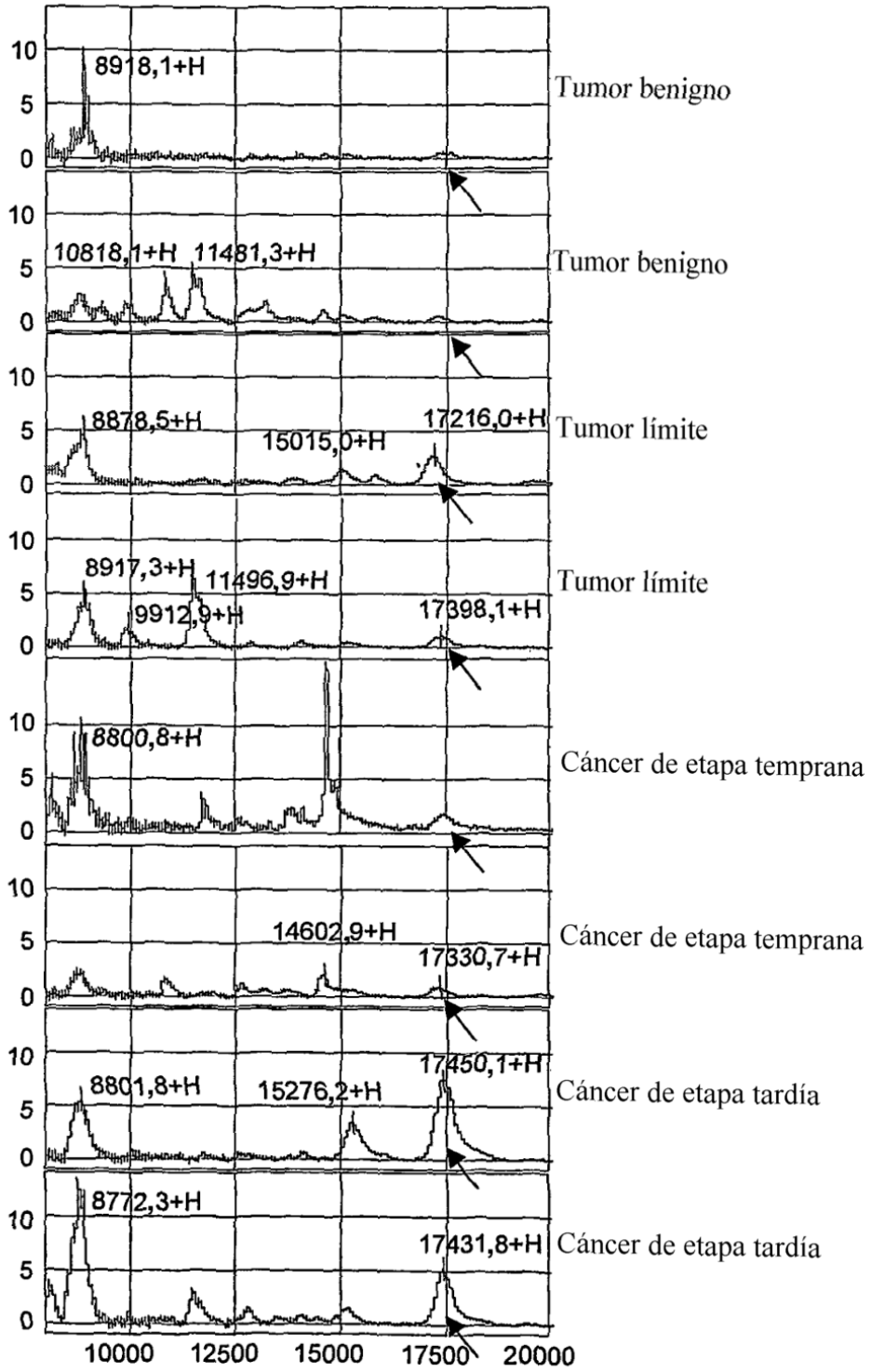


Figura 2

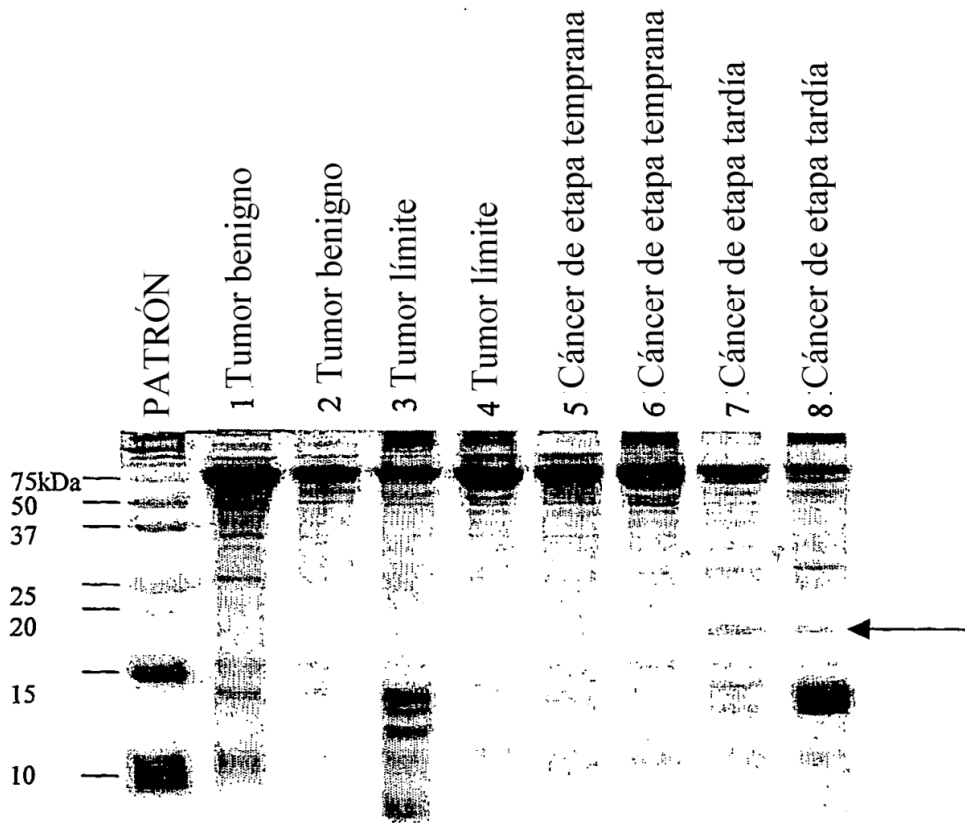


Figura 4

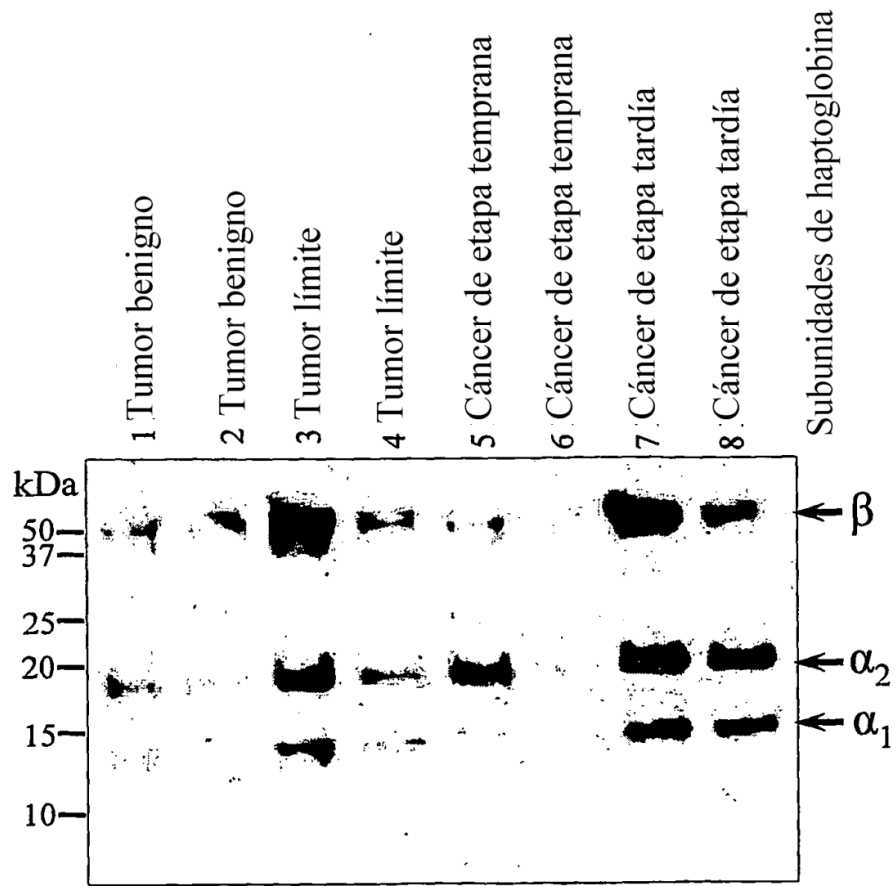


Figura 5

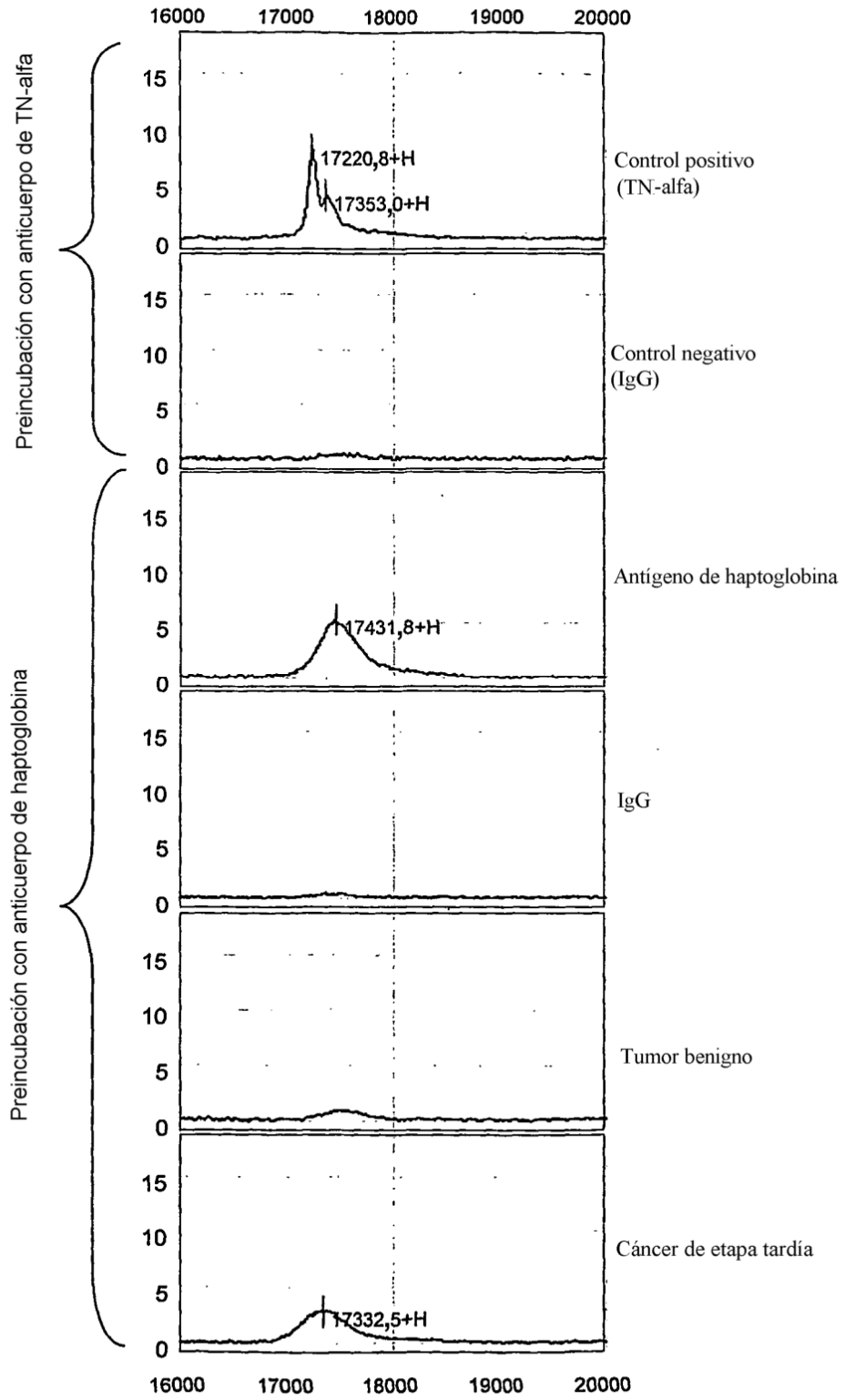
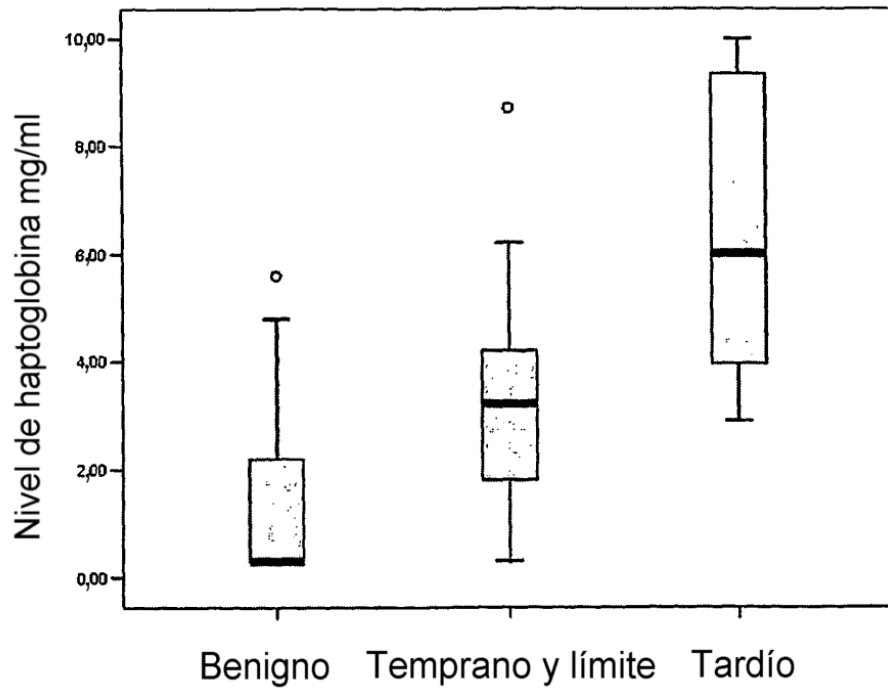


Figura 6

A



B

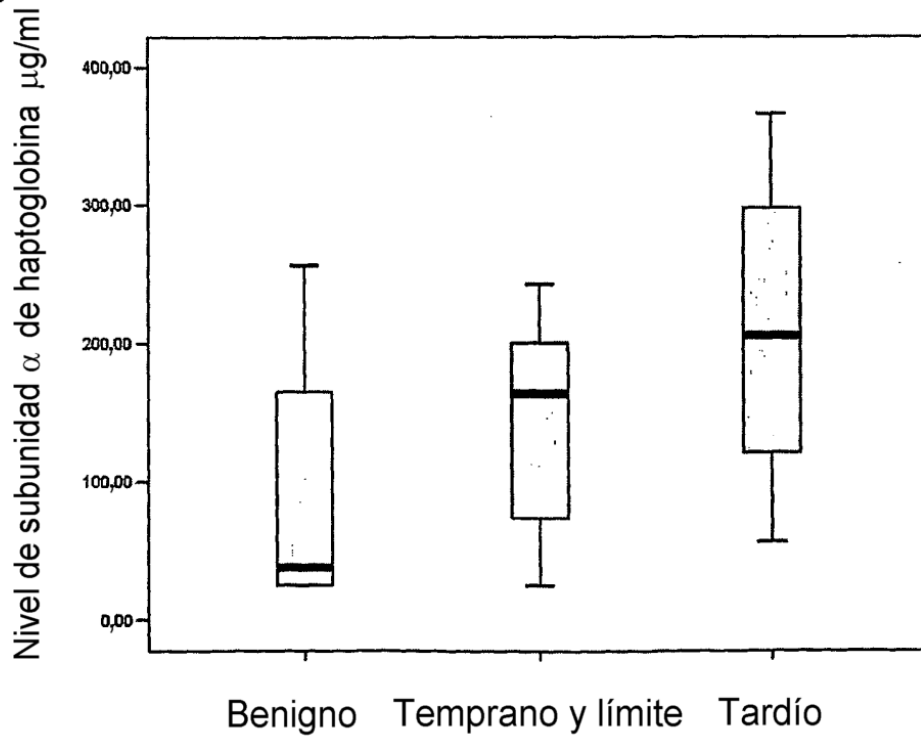


Figura 7

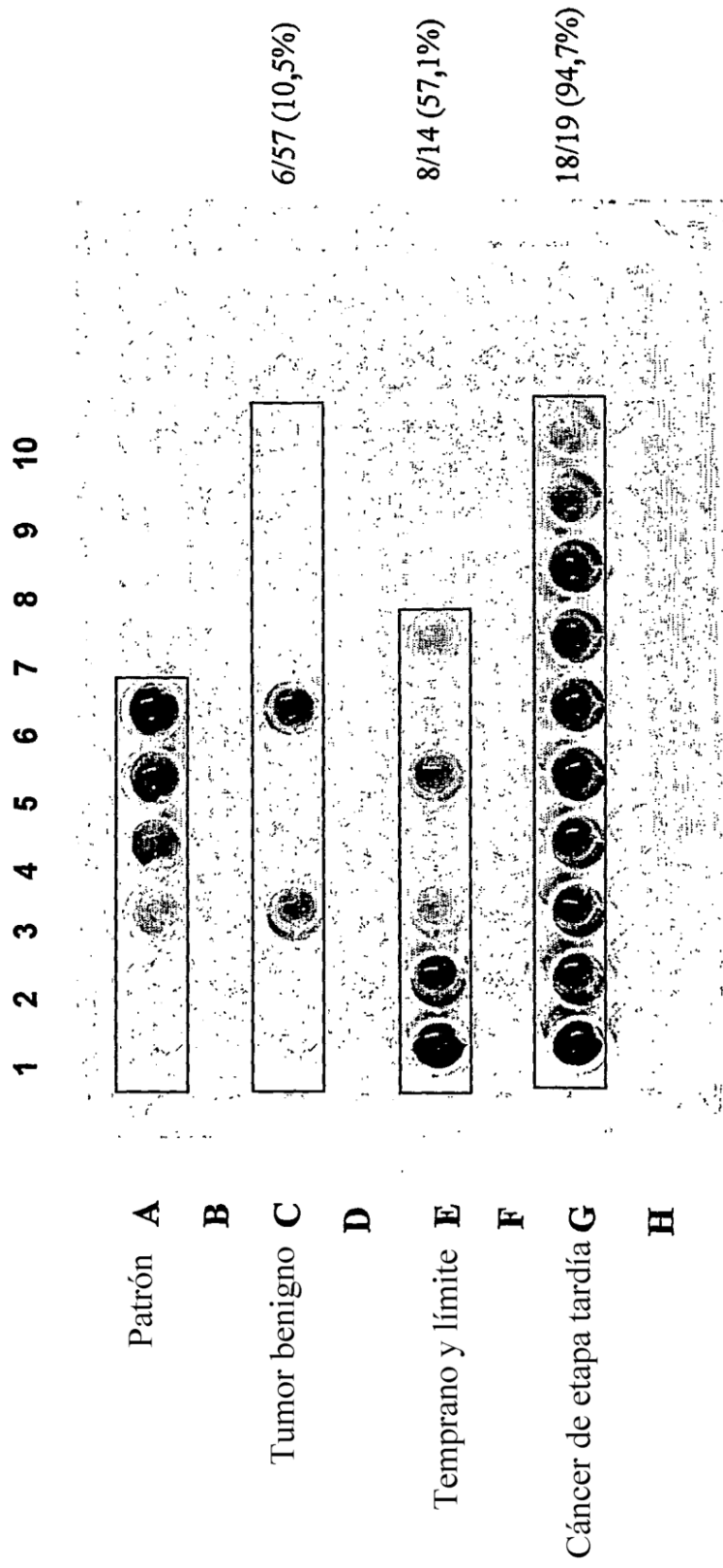


Figura 8

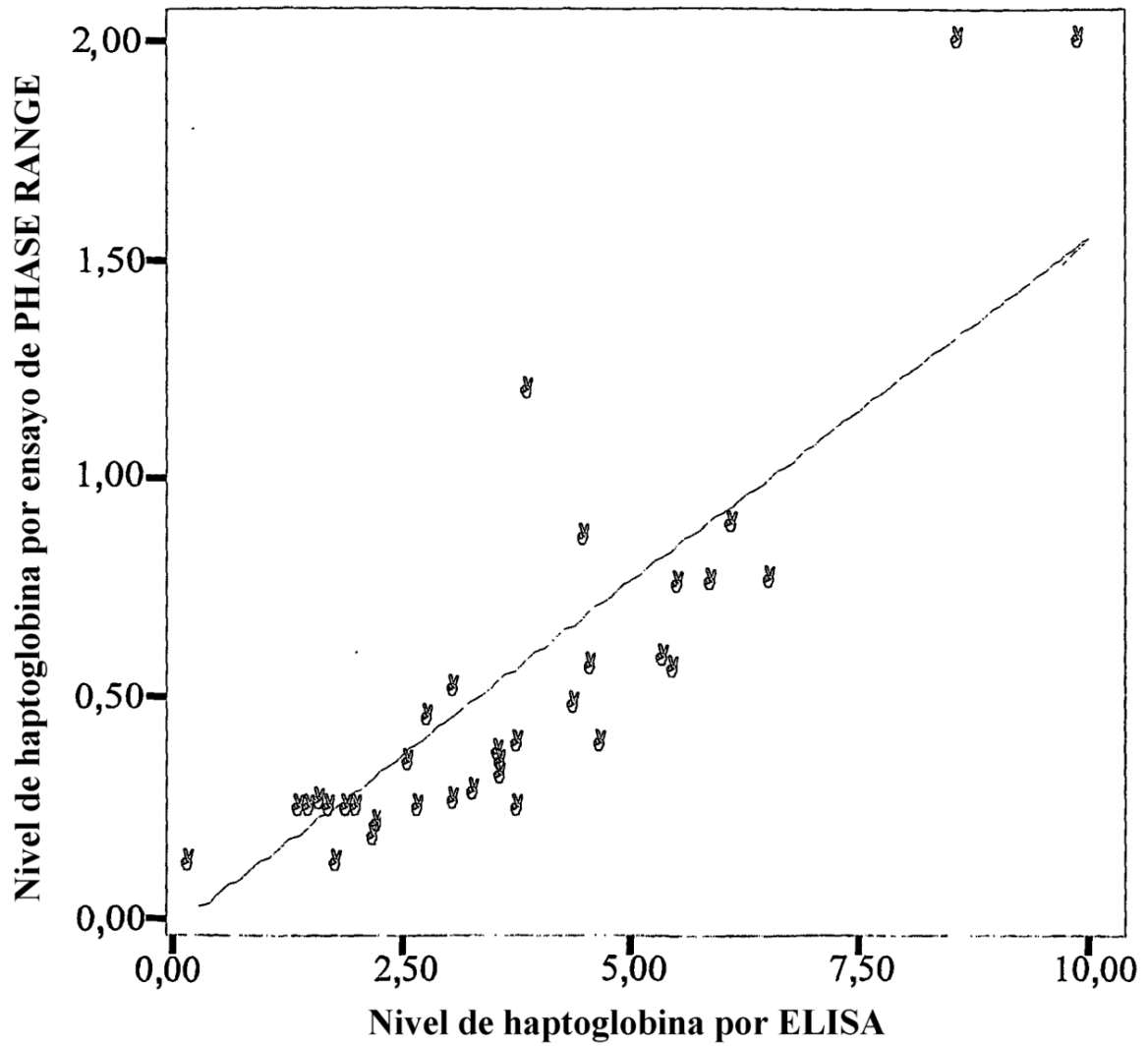
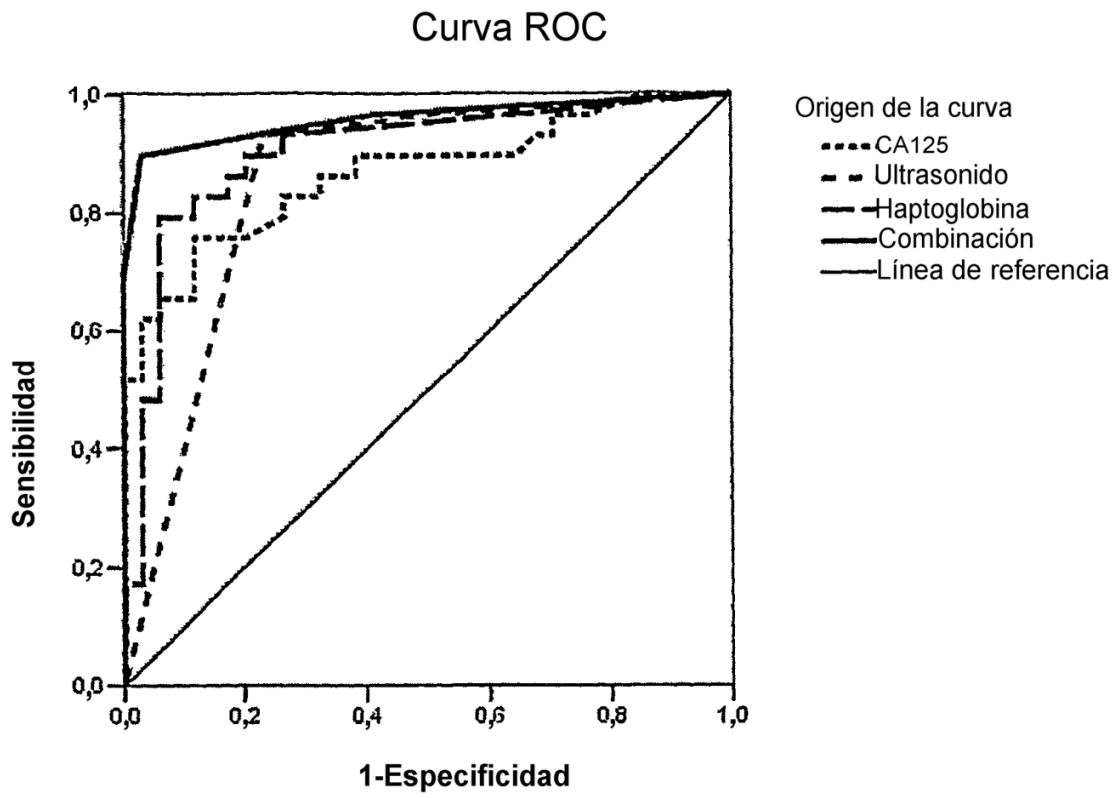


Figura 9



Los segmentos diagonales se producen por equivalencias