

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 372 442**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08859952 .7**
96 Fecha de presentación: **08.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2223115**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2010**

54 Título: **SEPRASA COMO MARCADOR PARA CÁNCER.**

30 Prioridad:
10.12.2007 EP 07023897
29.08.2008 EP 08015310

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.01.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:
ROLLINGER, Wolfgang;
KARL, Johann;
KOCHAN, Jarema, Peter;
ROESSLER, Markus y
TACKE, Michael

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 372 442 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

Seprasa como marcador para cáncer

5 La presente invención se refiere a un método que ayuda a la evaluación del cáncer. Da a conocer la utilización de la proteína de activación de fibroblastos humanos (FAP/seprasa) como marcador universal de diferentes tipos de cáncer. La seprasa ayuda en la evaluación del cáncer pulmonar o de pulmón (LC) o cáncer de colon, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o cáncer colorrectal (CRC) o probablemente también otros tipos específicos de cáncer. Estos tipos específicos de cáncer son, por ejemplo, cáncer de esófago, de cabeza y
10 cuello, de estómago, de conducto biliar, de páncreas, de riñón, de cervix, de ovario, de seno, de vejiga, de endometrio o de próstata. Además, se relaciona especialmente con un método para evaluar un cáncer a partir de una muestra líquida, derivada de un individuo midiendo la seprasa en dicha muestra. La medición de la seprasa puede ser utilizada, por ejemplo, en la detección anticipada de un cáncer o en el control de pacientes sometidos a cirugía.

15 El cáncer sigue siendo un reto importante para la salud pública, a pesar de los avances en la detección y en la terapia. Las células cancerosas se caracterizan por la producción de proteínas marcadoras asociadas al cáncer. Las proteínas asociadas al cáncer se encuentran tanto en los tejidos como en los fluidos corporales de un individuo que es portador de células cancerosas. Sus niveles son habitualmente bajos en las etapas principales del avance carcinogénico y aumenta durante el avance de la enfermedad y solamente en casos raros se observan proteínas que muestran un nivel decreciente en el curso del avance de la enfermedad. La detección sensible de estas proteínas es un enfoque ventajoso y prometedor para el diagnóstico del cáncer, en particular, en etapas previas al diagnóstico del cáncer. Los tipos más prevalentes de cáncer son el cáncer de seno (BC), cáncer de pulmón (LC) y
20 cáncer colorrectal (CRC).

25 Los enfoques terapéuticos más importantes para los tumores sólidos son:

- a) resección quirúrgica del tumor,
- b) quimioterapia,
- 30 c) tratamiento con agentes biológicos, tales como anticuerpos antitumorales o anticuerpos anti-angiogénicos y
- d) una combinación de los métodos indicados.

La resección quirúrgica de los tumores es aceptada ampliamente como tratamiento de primera línea para tumores sólidos en primeras fases. No obstante, la mayor parte de cánceres son detectados solamente cuando resultan
35 sintomáticos, es decir, cuando los pacientes se encuentran ya en una etapa adelantada de la enfermedad.

La evaluación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, avance y gravedad. Agrupa los pacientes de cáncer de manera que se puedan realizar generalizaciones sobre el pronóstico y la elección de la
40 terapia.

Las diferentes etapas de CRC se solían clasificar, de acuerdo con las etapas A a D de Duke. En la actualidad, el sistema TNM es la clasificación más utilizada de la extensión anatómica de cáncer. Representa un sistema de evaluación uniforme, internacionalmente aceptado. Hay tres variables básicas: T (extensión del tumor primario), N (estado ganglios linfáticos regionales) y M (presencia o ausencia de metástasis alejadas). Los criterios TNM son
45 publicados por la UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds): TNM Classification of Malignant Tumours, sexta edición, 2002). Una vez se ha determinado la situación TNM, los pacientes son agrupados en etapas de enfermedad indicadas con numerales romanos de I a IV siendo IV la etapa más avanzada de la enfermedad. La evaluación TNM y etapas UICC se corresponden entre sí, tal como se muestra en la siguiente tabla tomada de la obra de Sobin L.H. y Wittekind (eds.) *supra*.

50 **Interrelación de la evaluación TNM y etapas de enfermedad UICC**

Etapa UICC de la enfermedad	Evaluación T	Evaluación N	Evaluación M
Etapa 0	Tis	N0	M0
Etapa I	T1, T2	N0	M0
Etapa IIA	T3	N0	M0
Etapa IIB	T4	N0	M0
Etapa IIIA	T1, T2	N1	M0
Etapa IIIB	T3, T4	N1	M0
Etapa IIIC	Cualquier T	N2	M0
Etapa IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

55 Lo que es especialmente importante es que un diagnóstico anticipado de cáncer, por ejemplo de CRC, se traduce en una prognosis mucho mejor. En CRC se presentan tumores malignos de la zona colorrectal a partir de tumores benignos, es decir, de adenoma. Por lo tanto, los pacientes tendrán una mejor prognosis cuando se diagnostican en

la etapa de adenoma. Los pacientes diagnosticados de forma previa, por ejemplo, en la etapa Tis, N0, M0 ó T1-3; N0; M0, si se tratan adecuadamente, tienen una probabilidad superior al 90% de supervivencia a los 5 años después del diagnóstico, en comparación con una tasa de supervivencia de 5 años de solamente el 10% de pacientes diagnosticados cuando solamente existen metástasis distantes.

5 Los métodos de detección actuales, incluyendo métodos de formación de imágenes, tales como rayos X o resonancia nuclear, pueden, en teoría, ser por los menos parcialmente apropiados para su utilización como herramienta de exploración general. No obstante, son muy costosos y no se encuentran a disposición de los sistemas de salud para utilización general y amplia en exploraciones en masa de gran número de personas, particularmente en personas sin ningún síntoma de tumor.

10 Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención dar a conocer un procedimiento simple y eficaz en cuanto a costes de evaluación de tumores, por ejemplo, para identificar individuos sospechosos de tener cáncer. Con este objetivo, sería deseable un marcador general de tumores detectable en fluidos corporales, por ejemplo, en sangre o suero o plasma o un panel de estos marcadores.

15 Se encuentran ya en utilización clínica una serie de marcadores por suero. Por ejemplo, el fragmento soluble 30 kDa de citoceratina 19 (CYFRA 21-1), antígeno carcinoembriogénico (CEA), enolasa específica de neuronas (NSE) y antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC) son los marcadores LC más notables. No obstante, ninguno de ellos cumple los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos como herramienta de exploración (Thomas, L., Labor und Diagnose (2000) TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, Alemania).

20 Para ser de utilidad clínica, un nuevo marcador de diagnóstico como marcador único debe ser comparable a otros marcadores conocidos en esta técnica o mejor. Es decir, un nuevo marcador debe conducir a un avance en la sensibilidad del diagnóstico y/o especificidad utilizado solo o en combinación de uno o varios otros marcadores, respectivamente. La sensibilidad de diagnóstico y/o la especificidad de una prueba se evalúa mejor por sus características de recepción-funcionamiento, que se describirán a continuación de manera detallada.

25 La sangre completa, el suero o el plasma son las fuentes más utilizadas de muestras de rutina clínica. La identificación de un marcador anticipado de tumor que ayudaría en una detección fiable de cáncer o proporcionaría información adelantada de pronóstico conduciría a un método que ayudaría notablemente en el diagnóstico y en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejorar la evaluación in vitro de cáncer y, en particular, de LC. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico adelantado de cáncer, por ejemplo, LC, puesto que para los pacientes diagnosticados de manera anticipada, las probabilidades de supervivencia son mucho mayor en comparación con los diagnosticados en una etapa más avanzada de la enfermedad.

30 La utilidad clínica de marcadores bioquímicos en el cáncer de pulmón se ha estudiado recientemente (Duffy, M.J., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38 (2001) 225-262).

35 Se considera actualmente que CYFRA 21-1 es el mejor marcador de tumor actualmente conocido para el cáncer de pulmón. Aunque no es específico del órgano, se encuentra de manera predominante en los tejidos del pulmón. La sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón se describe que es de 46-61% con una especificidad de 95% con respecto a otras enfermedades benignas del pulmón. Los niveles de suero incrementados de CYFRA 21-1 están también asociados con enfermedades benignas y pronunciadas de hígado, insuficiencia renal y cáncer invasivo de vejiga. La prueba de CYFRA 21-1 se recomienda para supervisión de la terapia post-operatoria.

40 El CEA pertenece al grupo de antígenos carcinofoetales, usualmente producidos durante la embriogénesis. El CEA no es un órgano específico y es utilizado predominantemente para controlar el cáncer colorrectal. Además de enfermedades malignas, también varias enfermedades benignas, tales como cirrosis, bronquitis, pancreatitis y enfermedades autoinmunes están asociadas con niveles incrementados de CEA en suero. Al 95% de especificidad hacia las enfermedades benignas de pulmón, su sensibilidad para el cáncer de pulmón se indica que es de 29-44%. Una utilización preferente de CEA es el control de la terapia de cáncer de pulmón.

45 El NSE es un marcador de tumor para SCLC. De manera general, se encuentran niveles de NSE incrementados en el suero en asociación con tumores neuroectodermales y neuroendocrinos. Se encuentran también niveles incrementados en el suero en pacientes con enfermedades benignas de pulmón y enfermedades cerebrales, tales como meningitis y otras enfermedades inflamatorias del cerebro y heridas traumáticas en la cabeza. Si bien la sensibilidad de SCLC con 95% de especificidad se ha indicado de 60-87%, el comportamiento de las pruebas de NSE para NSCLC es pobre (sensibilidad de 7-25%). El NSE se recomienda para control de terapia de SCLC.

50 Con respecto a perfiles de marcador y deseando un diagnóstico mejorado del cáncer de pulmón, se publicó un método (Schneider, J., y otros, Int. J. Clin. Oncol. 7 (2002) 145-151) utilizando algoritmos de clasificación basados en la lógica difusa ("fuzzy") para combinar niveles de suero de CYFRA 21-1, NSE y proteína C reactiva (CRP), que es un marcador general de inflamación. Los autores indican una sensibilidad del 92% con una especificidad del 95%. No obstante, en este estudio, por ejemplo, la sensibilidad de CYFRA 21-1 como marcador único de tumor se indica

que es del 72% con una especificidad del 95%, lo que es significativamente mayor que en muchos otros estudios dados a conocer. Duffy, M.J., en *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38 (2001) 225-262 indica una sensibilidad comprendida entre un 46% y 61%. Este rendimiento excepcionalmente elevado conseguido por Schneider y otros, suscita algunas dudas y podría ser debido a varios factores. En primer lugar, el colectivo de los pacientes de control parece ser más joven que el colectivo de los pacientes, es decir, los grupos no se corresponden bien en cuanto a edad y el colectivo de los pacientes comprende muchas etapas tardías. En segundo lugar, e incluso de manera más crítica, el comportamiento del algoritmo se comprueba en muestras del conjunto de prueba que se utilizaron para la determinación de los calificadores de la lógica difusa. Por lo tanto, estos cualificadores desde el punto de vista estricto han sido "hechos expresamente" para este conjunto, y no se aplican a un conjunto de validación independiente. En circunstancias normales, se tiene que esperar que el mismo algoritmo aplicado a un conjunto de validación bien equilibrado, independiente y más grande, conducirá a un rendimiento global significativamente reducido.

Ha constituido el objetivo de la presente invención investigar si un marcador bioquímico puede ser identificado para que pueda ser utilizado en la evaluación de enfermedades de cáncer. En particular, los inventores de la presente invención han investigado si se podría identificar un marcador bioquímico para la evaluación de diferentes tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, seno, colon, próstata y riñón en fluidos corporales, en un aspecto muy preferente de la invención, la identificación de un marcador bioquímico para la evaluación de cáncer de pulmón (LC) o cáncer colorrectal (CRC) ha sido objeto de investigación.

De manera sorprendente, se ha descubierto que la utilización del marcador seprasa puede, por lo menos parcialmente, superar algunos de los problemas de los marcadores actualmente conocidos en el estado de la técnica.

En la técnica anterior, Iwasa y otros, *Cancer letters* 227 (2005) 229-236, la seprasa presenta una expresión incrementada asociada con metástasis de ganglios linfáticos en cáncer colorrectal.

La presente invención se refiere a un método de evaluación de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar in Vitro, comprendiendo la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración y/o actividad de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo y utilizando el resultado de la medición, particularmente la concentración y/o actividad determinadas en la evaluación de cáncer.

De manera sorprendente, se ha descubierto que para una concentración y/o actividad reducida de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo en la muestra de pruebas, se asocia con el riesgo y/o aparición de cáncer. Además, se descubrió que la seprasa es un marcador no específico para un solo tipo de cáncer, sino un marcador para diferentes tipos de cáncer, es decir, un marcador general de tumores. Dado que la seprasa parece ser más bien específica para procesos tumorigénicos, el nuevo marcador de tumores seprasa tiene un gran potencial para su utilización clínica con diferentes tipos de tumor.

El método de la presente invención es adecuado para la evaluación de muchos tipos diferentes de cáncer. Las concentraciones y/o actividad disminuida de seprasa o fragmentos de la misma en una muestra en comparación con controles normales se ha descubierto, por ejemplo, en tipos de cáncer específicos, tales como cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago, de conducto biliar, de páncreas, de riñón, de cervix, de ovarios, de seno, de vejiga, de endometrio y de próstata, respectivamente.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, la concentración y/o actividad de seprasa se mide en una muestra para evaluar tipos de cáncer específicos tales como pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago, de conducto biliar, de páncreas, de riñón, de cervix, de ovarios o de seno, in vitro.

De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la concentración y/o actividad de seprasa se mide en una muestra a efectos de evaluar cáncer tal como cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago, de conducto biliar, de páncreas o de riñón, in vitro.

De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la concentración y/o actividad de seprasa se mide en una muestra para evaluar cáncer tal como cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago o de conducto biliar, in Vitro.

De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la concentración y/o actividad de seprasa es medida en una muestra para evaluar cáncer, tal como cáncer de pulmón (LC) o cáncer colorrectal (CRC), in vitro.

De acuerdo con otra realización preferente de la invención, la concentración y/o actividad de seprasa es medida en una muestra para evaluar un cáncer, tal como cáncer de pulmón in vitro.

Una realización de la presente invención se refiere a la exploración en masa de una población para distinguir entre individuos que se encuentran probablemente libres de cáncer e individuos que pueden ser clasificados como casos

“sospechosos”. Este último grupo de individuos podría ser sometido a continuación a otros procesos de diagnóstico, por ejemplo, métodos de imagen u otros medios adecuados.

5 Una realización adicional de la presente invención se refiere a una mejora de los paneles marcadores de tumores que son adecuados para el diagnóstico de cáncer en general o paneles marcadores de tumores que son adecuados para el diagnóstico de un tipo determinado de tumor, por ejemplo, cáncer de pulmón o cáncer de colon.

10 La presente invención está dirigida también a un método para evaluar un cáncer in vitro por un marcador bioquímico, comprendiendo la medición en una muestra de la concentración y/o actividad de seprasa y de uno o varios otros marcadores específicos para el cáncer, y utilizar los resultados de la medición, particularmente concentraciones determinadas en la evaluación de cáncer. Los marcadores preferentes a utilizar en combinación con seprasa son, por otra parte, marcadores que son en general marcadores de tumor (es decir, marcadores que no son específicos para un solo tipo de tumor) o bien, por otra parte, marcadores específicos de tumor (marcadores que son específicos para un solo tipo de tumor). Son marcadores preferentes, por ejemplo, para la evaluación de cáncer, tales como
15 cáncer de pulmón o de colon Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT. Estos marcadores pueden ser utilizados individualmente, cada uno de ellos o conjuntamente en cualquier combinación con seprasa.

20 Si, de acuerdo con este método de la invención, se evalúa cáncer, uno o varios otros marcadores del cáncer correspondiente se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.

25 Por lo tanto, en la presente invención, en una realización preferente, se refiere también a la utilización de un panel de marcadores que comprende el marcador seprasa y, como mínimo, otro marcador de tumores, por ejemplo, Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT en la evaluación de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón y/o de colon.

30 Preferentemente, la presente invención está dirigida a un método para la evaluación de un cáncer, tal como cáncer de pulmón o de colon in vitro por marcadores bioquímicos, comprendiendo la medición en una muestra de la concentración y/o actividad de seprasa y/o fragmentos de la misma y uno o varios otros marcadores de cáncer, por ejemplo, uno o varios marcadores de cáncer de pulmón o de colon y utilizando los resultados de la medición, particularmente concentraciones determinadas en la evaluación de cáncer. Es preferible que el otro u otros varios marcadores sean seleccionados del grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.
35

La presente invención, en una realización preferente, se refiere también a la utilización de un panel marcador que comprende como mínimo seprasa y CYFRA 21-1 en la evaluación de cáncer, particularmente LC o cáncer de colon, y más particularmente NSCLC o cáncer colorrectal.

40 La presente invención se refiere también a la utilización de un panel marcador que comprende como mínimo seprasa y CEA en la evaluación de cáncer, particularmente LC o cáncer de colon, y más particularmente NSCLC o cáncer colorrectal.

45 La presente invención se refiere también a la utilización de un panel marcador que comprende como mínimo seprasa y SCC en la evaluación de cáncer, particularmente LC o cáncer de colon, y más particularmente NSCLC o cáncer colorrectal.

50 La presente invención se refiere también a la utilización de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo para la evaluación de cáncer, en el que una concentración y/o actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer.

55 La presente invención se refiere también a la utilización de seprasa en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, particularmente de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cérvix, ovario, seno, vejiga, endometrio o próstata.

La presente invención también se refiere a la utilización de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo en la evaluación de cáncer, en el que una concentración y/o actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer.

60 La presente invención se refiere también a la utilización de un reactivo para la medición de la actividad enzimática de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos de la misma en la evaluación de cáncer, en el que una concentración y/o actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer.

65 La presente invención da a conocer también un kit para llevar a cabo un método, según la presente invención que comprende, como mínimo, los reactivos requeridos para medir específicamente un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo y uno o varios otros marcadores de cáncer.

La presente invención también da a conocer un kit para llevar a cabo el método según la presente invención que comprende como mínimo los reactivos requeridos para medir específicamente seprasa y uno o varios marcadores de cáncer, por ejemplo, marcadores de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cérvix, ovario, seno, vejiga, endometrio o próstata, tal como se ha descrito anteriormente, de manera que los otros marcadores pueden estar dirigidos cada uno de ellos individualmente o en combinación de los mismos.

La presente invención da a conocer también un kit para llevar a cabo un método, según la presente invención, que comprende, como mínimo, los reactivos requeridos para medir específicamente seprasa y CYFRA 21-1, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición.

La presente invención da a conocer también un kit para llevar a cabo un método, según la presente invención, que comprende, como mínimo, los reactivos requeridos para medir específicamente seprasa y CEA, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición.

La presente invención también da a conocer un kit para llevar a cabo un método, según la presente invención, que comprende como mínimo los reactivos requeridos para medir específicamente seprasa y SCC, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para la evaluación de cáncer *in vitro* que comprende la medición en una muestra de la concentración y/o actividad de (a) un polipéptido de seprasa y/o fragmentos de la misma, (b) opcionalmente uno o varios otros marcadores de cáncer, y (c) utilización del resultado de medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación de cáncer, en el que una concentración y/o actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer.

El término "medición" preferentemente comprende una medición cualitativa, semi-cuantitativa o cuantitativa de un polipéptido de seprasa en una muestra. En una realización preferente, la medición es una medición semi-cuantitativa, es decir, se determina si la concentración y/o actividad de seprasa se encuentra por encima o por debajo de un valor límite. Tal como conocer los expertos en la materia, en un ensayo de SI (presencia) o NO (ausencia), la sensibilidad del ensayo se ajusta habitualmente para adecuarse al valor límite o de corte. Un valor límite o de corte puede ser determinado, por ejemplo, a partir de la prueba de un grupo de individuos sanos. Preferentemente, el valor límite es ajustado para que resulte en una especificidad de 90%, asimismo, de forma preferente, el corte es ajustado para que resulte en una especificidad de 95%, o también es preferente el ajuste del corte para que resulte en una especificidad de 98%. Un valor por debajo del valor de corte puede ser indicativo, por ejemplo, de la presencia de cáncer. En particular, un valor por debajo del valor de corte puede ser indicativo, por ejemplo, de la presencia de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cérvix, ovario, seno, vejiga, endometrio o próstata. En una realización adicional preferente, la medición de seprasa es una medición cuantitativa. En otra realización, la concentración y/o actividad de seprasa es correlacionada a una cuestión de diagnóstico subyacente, tal como etapa de la enfermedad, avance la enfermedad, o respuesta a la terapia.

La seprasa humana (designada proteína de activación de fibroblastos (FAP)) es una glicoproteína unida a membrana de 170 kDa que tiene actividad de gelatinasa y de dipeptidil peptidasa. Consiste en dos unidades monómeras idénticas (acceso a base de datos Uni Prot KB No. 27487) caracterizadas por la secuencia indicada en SEQ ID NO: 1 (Figura 3). El monómero de seprasa comprende 766 aminoácidos y tiene un peso molecular aparente de 97 kDa (SDS-PAGE) (Pineiro-Sánchez y otros, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7595-7601; Park y otros, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36505-36512). Una forma soluble de seprasa es la enzima fraccionadora de antiplasmina APCE (Lee y otros, *Blood* 103 (2004) 3783-3788; y otros, *Blood* 107 (2006) 1397-1404). La secuencia de aminoácidos del terminal N de APCE corresponde a residuos 24-38 de seprasa que se ha predicho, que tiene sus primeros 6 residuos del terminal N dentro del citoplasma del fibroblasto, seguido por un dominio transmembrana de 20 residuos, y a continuación un dominio catalítico de terminal C extracelular de 734 residuos (Goldstein y otros, *Biochim. Biophys. Acta.* 1361 (1997) 11-19; Scanlan y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5657-5661).

Piñeiro-Sánchez y otros (ver anterior) descubrieron que una expresión incrementada de seprasa se correlaciona con el fenotipo invasivo del melanoma humano y células de carcinoma. Henry y otros, *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1736-1741 describen que los pacientes de tumor de colon humano que tienen elevados niveles de seprasa en el estroma tienen mayores probabilidades de avance agresivo de la enfermedad y potencial desarrollo de metástasis o de recurrencia.

Por lo tanto, ninguno de los documentos anteriores de la técnica sugiere que una concentración y/o disminuida de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos de la misma en fluidos corporales sea indicativo de cáncer.

De manera sorprendente, se ha descubierto en la presente invención que una determinación de la concentración y/o actividad, por ejemplo, la actividad enzimática de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos de la misma, particularmente de APCE en el un fluido corporal, permite la evaluación de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón,

colon, esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cérvix, ovario, seno, vejiga, endometrio o próstata. Incluso, de manera más sorprendente, se descubrió que una concentración y/o actividad disminuida de seprasa o fragmentos de la misma en una muestra en comparación con controles normales es indicativa del riesgo de aparición de cáncer.

5 Tal como se utiliza en esta descripción, cada uno de los términos siguientes tiene el significado que se le asocia en esta sección.

10 Los artículos “un” y “unos” son utilizados para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, como mínimo uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, “un marcador” significa un marcador o más de un marcador. El término “como mínimo” es utilizado para indicar que opcionalmente pueden encontrarse presentes uno o varios otros objetos. A título de ejemplo, un panel marcador que comprende como mínimo (los marcadores) seprasa y CYFRA 21-1 puede comprender opcionalmente uno u otros marcadores más.

15 La expresión “uno o más” indica de 1 a 50, preferente de 1 a 20, también de manera preferente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15.

20 El término “marcador” o “marcador bioquímico” utilizado en esta descripción, se refiere a una molécula a utilizar como diana para analizar la muestra de prueba del paciente. Son ejemplos de dichas dianas moleculares proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se prevé que incluyan variantes que se presentan de manera natural de dicha proteína y también fragmentos de dicha proteína o de dicha variante, en particular, fragmentos detectables inmunológicamente. Los fragmentos inmunológicamente detectables comprenden preferentemente como mínimo 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un técnico en la materia reconocería que las proteínas que son liberadas por células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular pueden ser dañadas, por ejemplo, durante inflamación, y se podrían degradar o fraccionar en los mencionados fragmentos. Ciertos marcadores son sintetizados en forma inactiva, que puede ser activada subsiguientemente por proteólisis. Tal como apreciarán los técnicos en la materia, las proteínas o fragmentos de la misma pueden encontrarse también presentes como parte de un complejo. Este complejo puede ser también utilizado como marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador son codificadas por el mismo gen, pero pueden diferir en su punto isoeléctrico (=PI) o peso molecular (=MW), o ambos, por ejemplo, como resultado de proceso alternativo mRNA o pre-mRNA. La secuencia de aminoácidos de una variante es hasta 95% o más idéntica a la correspondiente secuencia del marcador. Además, o de manera alternativa, un polipéptido del marcador o una variante del mismo, puede llevar una modificación post-translacional. Son ejemplos no limitativos de modificaciones post-translacionales la glicosilación, acilación, y/o fosforilación.

Seprasa:

40 De acuerdo con la presente invención, el término “polipéptido de seprasa y/o fragmentos de la misma” se refieren a polipéptidos monómeros o multímeros, particularmente dímeros. Además, el término “polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo” se refiere particularmente a formas solubles de seprasa y/o fragmentos de la misma, particularmente una enzima fraccionadora de antiplasmina (APCE) y también seprasa y/o fragmentos de seprasa presentes en forma de un complejo con otro polipéptido.

45 Los polipéptidos de seprasa, particularmente formas solubles de polipéptidos de seprasa y/o fragmentos de la misma, se detectan preferentemente en muestras apropiadas, particularmente fluidos corporales. Son muestras preferentes los fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, esputos, orina, heces, etc. Preferentemente, la muestra es obtenida de un ser humano, por ejemplo un paciente de tumor o una persona con riesgo de tumor o una persona de la que se sospecha que tenga un tumor.

50 De acuerdo con la presente invención, se determina la concentración y/o actividad de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos de la misma. En una realización, el marcador seprasa es medido específicamente a partir de una muestra por utilización de un agente de unión específico.

55 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para seprasa, una lectina que se une a seprasa o un anticuerpo a seprasa. Un agente de unión específico tiene como mínimo una afinidad de 10^7 l/mol para su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico tiene preferentemente una afinidad de 10^8 l/mol o, asimismo, de modo preferente 10^9 l/mol para su molécula diana. Tal como apreciarán los técnicos en la materia, el término específico es utilizado para indicar qué otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para seprasa. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana resulta en una afinidad a la unión que es, como máximo, sólo 10% o menos, sólo 5% o menos, sólo 5% o menos, sólo 2% o menos, solamente 1% o menos de la afinidad de la molécula diana, respectivamente. Un agente preferente específico de unión cumplirá los criterios mínimos indicados para afinidad y también para especificidad.

65 Un agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo reactivo con seprasa. El término anticuerpo se

refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión de antígeno de dichos anticuerpos, anticuerpos de cadena única y también constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

- 5 Cualquier fragmento de anticuerpo que conserve los criterios anteriores de un agente de unión específico, podrá ser utilizado. Los anticuerpos son generados por procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo, el descrito en Tijssen, P., *Practice and theory of enzyme immunoassays*, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, la obra completa, especialmente páginas 43-78). Además, los técnicos en la materia conocen métodos basados en inmunoabsorbentes que pueden ser utilizados para el aislamiento específico de anticuerpos. Por estos medios se puede mejorar la calidad de anticuerpos policlonales, y por lo tanto, su comportamiento en inmunoensayos (Tijssen, P., citado anteriormente, páginas 108-115).

- 15 Para las mejoras que se dan a conocer en la presente invención, se pueden utilizar anticuerpos policlonales criados en conejos. No obstante, es evidente que también se podrían utilizar anticuerpos policlonales de especies distintas, por ejemplo, ratas o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en cualquier cantidad requerida con características constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para rutina clínica. La generación y utilización de anticuerpos monoclonales por seprasa en un método, según la presente invención, respectivamente, representan otras mejoras preferentes. Son ejemplos preferentes de anticuerpos adecuados para la detección de seprasa los que se dan a conocer en Piñeiro-Sánchez y otros, citados anteriormente, por ejemplo los anticuerpos D8, D28 y D43.

- 25 Tal como apreciará el técnico en la materia, la seprasa ha sido identificada como marcador útil en la evaluación de cáncer, preferentemente cáncer de pulmón o de colon. Se pueden utilizar varios procesos inmunodiagnósticos para llegar a un resultado comparable a las mejoras de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Estas estrategias comprenden entre otros, la utilización de péptidos sintéticos que representan un epítipo de seprasa para inmunización. De manera alternativa, se puede utilizar también inmunización de ADN también conocida como vacuna de ADN.

- 30 Para medición, la muestra obtenida de un individuo es incubada con un agente de unión específico para seprasa en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de seprasa y agente de unión. Estas condiciones no es necesario que sean especificadas dado que los técnicos de la materia pueden identificar sin esfuerzo inventivo las condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo de seprasa y agente de unión se mide y se utiliza en la evaluación de cáncer, preferentemente cáncer de pulmón. Tal como prefieran los técnicos en la materia, hay numerosos métodos para medir la cantidad de complejo de seprasa y agente de unión, todos ellos descritos en detalle en libros relevantes (ver por ejemplo, Tijssen, P., citado anteriormente, o Diamandis, E.P., y Christopoulos, T.K. (eds.), *Immunoassay*, Academic Press, Boston (1996)).

- 40 Preferentemente, la seprasa es detectada en un formato de ensayo de tipo sándwich. En este ensayo, un primer agente de unión específico es utilizado para captar seprasa por una parte y un segundo agente de unión específico que es etiquetado para ser detectable de manera directa o indirecta, es utilizado por otra parte. Los agentes de unión específicos utilizados en el formato de ensayo de tipo sándwich pueden ser anticuerpos específicamente dirigidos contra seprasa. Por otra parte, la detección puede ser llevada a cabo utilizando diferentes anticuerpos de captación y etiquetado, es decir, anticuerpos que reconocen diferentes epítopos en el polipéptido de seprasa. Por otra parte, un ensayo de tipo sándwich puede ser llevado a cabo también con un anticuerpo de captación y etiquetado dirigido contra el mismo epítipo de seprasa. En esta realización, sólo se pueden detectar formas di y multiméricas de seprasa.

- 50 De acuerdo con otra realización de la invención, el marcador seprasa es específicamente medido a partir de una muestra por utilización de un régimen de prueba adecuado para detectar la actividad enzimática de la seprasa. La actividad enzimática puede ser, por ejemplo, una actividad de gelatinasa o actividad de peptinasa. La actividad de gelatinasa puede ser determinada, por ejemplo, por zimografía, utilizando zimogramas de gelatina. La actividad de peptinasa puede ser determinada, por ejemplo, por ensayos fluorescentes utilizando sustratos péptidos. Se describen ensayos para la medición de la actividad de seprasa, por ejemplo, por Lee y otros (2006), ver anterior.

- 55 En el sentido de la presente invención, un "marcador de cáncer" y en particular un "marcador de cáncer de pulmón" y "marcador de cáncer de colon" es cualquier marcador que si se combina con el marcador seprasa añade información relevante en la evaluación del cáncer, por ejemplo, en la evaluación de cáncer en general o en la evaluación de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, en la evaluación de LC o CRC. La información se considera relevante o que añade valor si a una especificidad determinada la sensibilidad o si para una sensibilidad determinada la especificidad, respectivamente, para la evaluación del cáncer, se pueden mejorar incluyendo dicho marcador en una combinación de marcadores que comprende ya el marcador seprasa. En la realización preferente de la evaluación de cáncer, la mejora en la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significancia de $p = .05$, $.02$, $.01$ o inferior. Preferentemente, el marcador o marcadores de tumores se seleccionan del grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.

65

El término “muestra” utilizado en esta descripción se refiere a una muestra biológica obtenida con el objetivo de evaluación in vitro. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestra de paciente preferentemente puede comprender cualquier fluido corporal. Son muestras preferentes la sangre completa, suero, plasma, lavajes bronquiales o esputos, siendo los más preferentes plasma o suero.

5 El término “evaluación de cáncer” y en particular “evaluación de cáncer de pulmón” o evaluación de cáncer de colon” se utiliza para indicar que el método, según la presente invención (solo o conjuntamente con los otros marcadores o variables, por ejemplo el criterio indicado por UICC (ver anterior)), ayudará al médico a establecer o confirmar la ausencia o presencia de cáncer, en particular LC o CRC, o ayudará al médico en la prognosis, detección de la
10 recurrencia (seguimiento del paciente después de cirugía) y/o el control del tratamiento especialmente quimioterapia.

Tal como apreciarán los técnicos en la materia, estas evaluaciones se realizarán in vitro. La muestra del paciente es eliminada posteriormente. La muestra del paciente es utilizada únicamente para el método de diagnóstico in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no es transferido nuevamente al cuerpo del paciente. De
15 manera típica, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo, sangre completa, suero o plasma.

En una realización preferente la presente invención se refiere a un método para la evaluación de cáncer, por ejemplo, LC o CRC in Vitro por marcadores bioquímicos comprendiendo la medición en una muestra de la concentración de seprasa y utilizando la concentración y/o actividad determinada en la evaluación de cáncer, por
20 ejemplo, LC o CRC.

Los inventores de la presente invención de manera sorprendente han sido capaces de detectar una concentración y/o actividad disminuida del marcador seprasa en un porcentaje significativo de muestras obtenidas de pacientes con cáncer, en particular con cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago, de
25 conducto biliar, de páncreas, de riñón, de cervix, de ovario, de seno, de vejiga, de endometrio o de próstata. Incluso, de manera más sorprendente, han sido capaces de demostrar que la concentración y/o actividad disminuida de seprasa en esta muestra obtenida de un individuo se puede utilizar para la evaluación de cáncer, en particular para las enfermedades de cáncer antes mencionadas.

30 La situación ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un solo evento o proceso provocaría la correspondiente enfermedad, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no está comprendida por completo, tal como es en el caso de muchos tipos de cáncer, por ejemplo, LC. Tal como el experto en la materia apreciará, ningún marcador bioquímico es diagnosticado con 100% de especificidad, y al mismo tiempo 100% de
35 sensibilidad para una determinada enfermedad multifactorial, por ejemplo, LC: por el contrario, los marcadores bioquímicos, por ejemplo, CYFRA 21-1, CEA, NSE o tal como se ha mostrado seprasa, se pueden utilizar para evaluar, con una cierta probabilidad o valor de predicción, por ejemplo, la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad. Por lo tanto, en diagnósticos clínicos de rutina. Se considerarán conjuntamente de manera general varios síntomas clínicos y marcadores biológicos de manera conjunta en el diagnóstico, tratamiento y gestión de la
40 enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos pueden ser determinados individualmente o en una realización preferente de la invención se pueden medir simultáneamente utilizando un chip o un gránulo basado en tecnología “array”. Las concentraciones de los biomarcadores son interpretadas a continuación de manera independiente, por ejemplo,
45 utilizando un valor límite o de corte para cada marcador o se pueden combinar a efectos de interpretación.

En otras realización preferente, la evaluación de cáncer, de acuerdo con la presente invención, se lleva a cabo en un método que comprende la medición en una muestra de la concentración y/o actividad de a) un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo y b) uno o varios otros marcadores de cáncer y c) utilizando los resultados de la
50 medición, por ejemplo, las concentraciones determinadas en la etapa s) y en la etapa b) respectivamente en la evaluación de cáncer.

En la evaluación de cáncer, el marcador seprasa será ventajoso según uno o varios de los siguientes aspectos: rastreo, ayuda al diagnóstico, prognosis, control de la terapia tal como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.
55

Rastreo:

El rastreo se define como la aplicación sistemática de una prueba para identificar individuos, por ejemplo, individuos de riesgo, en cuanto a indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de cáncer. Preferentemente, la
60 población a rastrear se compone de individuos que se sabe que tiene un riesgo de cáncer superior al promedio. Por ejemplo, una población de rastreo para cáncer de pulmón está compuesta por individuos que se sabe que tienen un riesgo superior promedio de cáncer de pulmón, tal como fumadores, exfumadores y trabajadores expuesto a uranio, cuarzo o amianto.

65 En la realización preferente, un fluido corporal tal como suero o esputos se utiliza como muestra en el rastreo de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón o colorrectal.

Para muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico individual en la circulación cumplirá en ningún caso los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para los objetivos del rastreo. Esto parece ser también cierto para cáncer y en particular para cáncer de pulmón. Se tiene que esperar que un panel marcador que comprende una serie de marcadores tendrá que ser utilizado en el rastreo de cáncer. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador seprasa formará una parte integral de un panel marcador apropiado para objetivos de rastreo. La presente invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de seprasa como otro marcador de un panel de marcadores de cáncer, es decir, un panel marcador que comprende seprasa y uno o varios otros marcadores adicionales con el objetivo de rastreo de cáncer. En particular, la presente invención se refiere a la utilización de seprasa como marcador de un panel de marcadores general para cáncer. Este panel marcador comprende el marcador seprasa y uno o varios marcadores adicionales, por ejemplo, marcadores generales de cáncer y/o marcadores para el tipo antes mencionado de cáncer.

La seprasa es posible que contribuya también a paneles marcadores para ciertos tipos específicos de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago, de conducto biliar, de páncreas, de riñón, de cérvix, de ovarios, de seno, de vejiga, de endometrio o de próstata.

Otros tipos de cáncer a evaluar con un panel marcador que comprende seprasa son cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago, de conducto biliar, de páncreas o de riñón.

Otros tipos preferentes de cáncer a evaluar con un panel marcador que comprende seprasa son cáncer de pulmón, de colon, de esófago, de cabeza y cuello, de estómago o de conducto biliar.

Otros tipos preferentes de cáncer a evaluar con un panel marcador que comprende seprasa son cáncer de pulmón o cáncer de colon.

Un tipo preferente de cáncer a evaluar con un panel marcador que comprende seprasa es cáncer de pulmón (LC).

Los presentes datos indican además que ciertas combinaciones de marcadores serán ventajosas en el rastreo de cáncer. Por ejemplo, con referencia a las realizaciones preferentes de rastreo de LC o CRC, la presente invención se refiere también a la utilización de un panel marcador que comprende seprasa y CYFRA 21-1 o un panel marcador que comprende seprasa y CEA, o un panel marcador que comprende seprasa y NSE, o un panel marcador que comprende seprasa y CA 19-9, o un panel marcador que comprende seprasa y CA 125, o un panel marcador que comprende seprasa y PSA, o un panel marcador que comprende seprasa y ASC, o un panel marcador que comprende seprasa y S100A12, o un panel marcador que comprende seprasa y NNMT, o un panel marcador que comprende seprasa y dos o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.

Ayuda al diagnóstico:

Los marcadores pueden o bien ayudar al diagnóstico diferencial de enfermedades benignas con respecto a las malignas en órganos específicos, o pueden ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o establecer valores de marcador de línea base antes de la cirugía.

En la actualidad, importantes métodos utilizados en la detección de cáncer son exploración radiológica y/o la tomografía computarizada (CT). Pequeños nódulos, es decir, pequeñas regiones de tejidos sospechosos se pueden visualizar por estos métodos. No obstante, muchos de estos nódulos, más del 90% con CT representan cambios de tejidos benignos y solamente una minoría de nódulos representa tejidos cancerosos. La utilización del marcador seprasa puede ayudar en la diferenciación de enfermedades benignas con respecto a las malignas.

Dado que la seprasa como marcador individual puede ser superior a otros marcadores, por ejemplo, en el caso de LC a otros marcadores, tales como CEA o NSE, se tiene que esperar que la seprasa se utilice como ayuda de diagnóstico, especialmente estableciendo un valor de línea base antes de la cirugía. La presente invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de seprasa para establecer un valor de línea base antes de la cirugía para cáncer.

Prognosis:

Se pueden definir los indicadores pronósticos como características clínicas, patológicas o bioquímicas de pacientes de cáncer y sus tumores que predicen con una cierta probabilidad el resultado de la enfermedad. Su utilización principal consiste en ayudar a planificar racionalmente la gestión del paciente, es decir, evitar sub-tratamiento de enfermedades agresivas y sobre-tratamiento de enfermedades indolentes, respectivamente. Molina, R., y otros, Tumor Biol. 24 (2003) 209-218 evaluaron el valor pronóstico de CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SSC y NSE, en NSCLC. En su estudio, los niveles anormales en suero de los marcadores NSE, CEA, y LDH (lactato dehidrogenasa) parecen indicar una supervivencia más corta.

Dado que la seprasa sola significativamente contribuye a la diferenciación de pacientes de cáncer, por ejemplo, pacientes LC o CRC con respecto a controles sanos, se puede esperar que ayudará en la evaluación de la prognosis de pacientes que sufren de cáncer, preferentemente LC o CRC. El nivel de seprasa pre-operativa se combinará muy probablemente con uno o varios otros marcadores de cáncer y/o el sistema de evaluación TNM. En una realización preferente, se utiliza seprasa en la prognosis de pacientes con LC o CRC.

Control de quimioterapia:

Merle, P., y otros, *Int. J. of Biological Markers* 19 (2004) 310-315 evaluaron las variaciones de nivel en suero de CYFRA 21-1 en pacientes con NSCLC localmente avanzado tratado con quimioterapia de inducción. Llegaron a una conclusión que el control temprano de niveles en suero de CYFRA 21-1 puede ser una herramienta de pronóstico útil para la respuesta del tumor y supervivencia en pacientes de NSCLC en etapa III. Además, se ha descrito en informes la utilización de CEA en el control del tratamiento de pacientes con LC (Fukasawa, T., y otros, *Cancer & Chemotherapy* 13 (1986) 1862-1867). La mayor parte de estos estudios eran retrospectivos, no aleatorios y contenían un pequeño número de paciente. Igual que en el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios de CEA sugirieron: a) que los pacientes con una disminución en niveles de CEA mientras recibían quimioterapia tenían en general un mejor resultado que los pacientes cuyos niveles de CEA no disminuían y b) para la mayor parte de pacientes, los aumentos en niveles de CEA estaban asociados con el avance de la enfermedad.

Se espera que la seprasa sea, como mínimo, un marcador tan bueno para el control de quimioterapia como CYFRA 21-1 o CEA, respectivamente. La presente invención se refiere, por lo tanto, a la utilización de seprasa en el control de pacientes de cáncer y preferentemente de cáncer de pulmón (LC) o cáncer de colon (CRC) sometidos a quimioterapia. En el control de la terapia en una realización preferente, las mediciones para seprasa y para, como mínimo, un marcador seleccionado del grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA y/o NSE se combinará y se utilizará en la evaluación de cáncer de pulmón (LC).

Seguimiento:

Una parte importante de pacientes con LC sometidos a resección quirúrgica destinada a la eliminación completa de tejidos cancerosos desarrollan posteriormente recurrencia o enfermedad de metástasis ((Wagner, H., *Chest* 117 (2000) 110-118; Buccheri, G., y otros., *Ann. Thorac. Surg.* 75 (2003) 973-980). La mayor parte de estos relapsos tienen lugar dentro de los primeros 2-3 años después de la cirugía. Dado que la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente mortal si se detecta demasiado tarde, se han enfocado considerables investigaciones en el relapso de cáncer en una etapa previa y, por lo tanto, potencialmente tratable.

Como consecuencia, muchos pacientes de cáncer, por ejemplo, pacientes de LC, son sometidos a un programa de control post-operatorio que incluye frecuentemente control regular con CEA. Se ha demostrado que el control seriado con CEA un año después de la resección quirúrgica detecta una enfermedad post-operatoria recurrente/metastásica con una sensibilidad de aproximadamente 29% con una especificidad de aproximadamente 97%, incluso en ausencia de síntomas sospechosos ((Buccheri, G., y otros., *Ann. Thorac. Surg.* 75 (2003) 973-980). De este modo, el seguimiento de pacientes con LC después de cirugía es uno de los campos más importantes de utilización para un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad de seprasa en pacientes con LC investigados, es probable que la seprasa sola o en combinación con uno o varios marcadores sea de gran ayuda en el seguimiento de pacientes de LC, especialmente pacientes de LC después de cirugía. La utilización de un panel marcador que comprende seprasa y uno o varios otros marcadores de LC en el seguimiento de pacientes de LC representa una realización adicional preferente de la presente invención.

La presente invención en una realización preferente se refiere a la utilización de seprasa en el campo diagnóstico de cáncer. Preferentemente, se utiliza seprasa en la evaluación de cáncer de pulmón (LC), colon (CRC), esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cérvix, ovario, seno, vejiga, endometrio o próstata, respectivamente.

En otra realización adicional preferente, la presente invención se refiere a la utilización de seprasa como molécula marcadora para cáncer, por ejemplo, cáncer en general o tipos específicos de cáncer, tal como cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cérvix, ovario, seno, vejiga, endometrio, o próstata en combinación con una u otras varias moléculas marcadoras para cáncer. Las otras moléculas marcadoras pueden ser moléculas marcadoras de tipo general no específicas para tipo de cáncer y/o moléculas marcadoras específicas para tipo de cáncer, por ejemplo, moléculas marcadoras para cáncer de pulmón o cáncer de colon. La seprasa y, como mínimo, otro marcador adicional, se utilizan para la evaluación de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón o de colon en una muestra líquida obtenida de un individuo. Otros marcadores de cáncer seleccionados preferentemente con los que se puede combinar la medición de seprasa son: Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA125, CA19-9, PSA, ASC, S100A12 y NNMT. En particular, los otros marcadores LC seleccionados preferentes con los que se puede combinar seprasa son CYFRA 21-1, CEA y/o NSE. Un panel marcador adicionalmente preferente en la evaluación de cáncer, por ejemplo, LC comprende seprasa y, como mínimo, otra molécula marcadora seleccionada del grupo que consiste en CYFRA 21-1 y CEA.

Tal como apreciará el técnico en la materia, hay muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores a efectos de mejorar la cuestión de diagnóstico que se investiga. En una forma muy simple, pero, no obstante, frecuentemente efectiva, se supone un resultado positivo si una muestra es positiva para un mínimo de uno de los marcadores investigados. Éste puede ser por ejemplo el caso cuando se efectúa diagnóstico de enfermedad infecciosa, tal como SIDA.

No obstante, frecuentemente la combinación de marcadores es evaluada. Preferentemente, los valores medidos para marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo, para seprasa y CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado es correlacionado con la cuestión de diagnóstico subyacente. Los valores de marcadores pueden ser combinados por cualquier método matemático del estado de la técnica. Los métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad utilizan métodos tales como el análisis discriminante (DA) (es decir, DA lineal, cuadrático, regularizado), métodos de Kernel (por ejemplo, SVM), métodos no paramétricos (por ejemplo, clasificadores de k-Nearest-Neighbor), PLS (Mínimos Cuadrados parciales), métodos de tres bases (es decir, regresión lógica, CART, métodos Forest al azar, métodos Boosting/Bagging), modelos lineales generalizados (por ejemplo, regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica difusa y métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Los técnicos en la materia no tendrán problema alguno en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores, según la presente invención. Preferentemente, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo, la ausencia o presencia de LC se selecciona a partir de DA (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), métodos Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores k-Nearest-Neighbor), PLS (cuadrados mínimos parciales), métodos de tres bases (es decir, regresión lógica, CART, métodos Forest al azar, métodos Boosting), o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Se encuentran detalles relativos a estos métodos estadísticos en las siguientes referencias: Ruczinski, I., y otros, J. of Computational and Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics (2001); Breiman, L., Friedman, J.H., Olshen, R.A., Stone, C. J. (1984) Classification and regression trees, California: Wadsworth; Breiman, L., Random Forests, Machine Learning, 45 (2001) 5-32; Pepe, M.S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series 28 (2003); y Duda, R.O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2ª edición (2001).

Una realización preferente de la invención consiste en utilizar un límite de corte multivariable optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y discriminar el estado A con respecto al estado B, por ejemplo, enfermo con respecto a sano. En este tipo de análisis, los marcadores no son independientes, sino que forman un panel marcador.

La exactitud del método de diagnóstico se describe mejor por sus características operativas en el receptor (ROC) (ver especialmente Zweig, M.H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es una representación de todos los pares de sensibilidad/especificidad que resultan de la variación continuada del umbral de decisión en todo el rango de datos observado.

El comportamiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su exactitud de diagnóstico, de la capacidad de clasificar correctamente sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud de diagnóstico mide la capacidad de la prueba para distinguir correctamente dos condiciones distintas de los sujetos investigados. Estas condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad benigna contra enfermedad maligna.

En cada caso, el gráfico ROC muestra el solape entre las dos distribuciones al representar la sensibilidad con respecto a 1-especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. Sobre el eje Y se encuentra la sensibilidad o la fracción positiva real [definida como (número de resultados de pruebas positivos reales)/(número de resultados positivos reales + número de resultados de prueba negativos falsos)]. Se ha hecho referencia a ello también como positividad en presencia de una enfermedad o de un determinado estado. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje X, se encuentra la fracción falsa positiva o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos-positivos)/(número de resultados verdaderos-negativos + número de resultados falsos-positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Dado que las fracciones verdadera y falsa-positiva son calculadas completamente de forma separada, utilizando los resultados de la prueba de diferentes subgrupos, el gráfico ROC es independiente de la prevalencia de enfermedad en la muestra. Cada uno de los puntos del gráfico ROC representa un par sensibilidad/1-especificidad que corresponde a un umbral de decisión específico. Una prueba con discriminación perfecta (sin solape en las dos distribuciones de resultados) tiene un gráfico ROC que pasa por la esquina superior izquierda, en la que la fracción verdadero-positivo es 1,0, o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción falsa-positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayor parte de gráficos se encuentran entre estos dos extremos (si el gráfico ROC se encuentra completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio para "positividad" desde "mayor que" a "menor

que", o viceversa). Cualitativamente, cuánto más cerca se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor es la exactitud global de la prueba.

5 Una forma preferente de cuantificar la exactitud de diagnóstico de una prueba de laboratorio consiste en expresar su rendimiento con un solo número. Este parámetro global es, por ejemplo, el llamado "error total" o alternativamente el "área por debajo de la curva = AUC". La medición global más común es el área por debajo del gráfico ROC. De manera convencional, este área es siempre $>0,5$ (si no lo es se puede invertir la norma de decisión para hacerlo). Los valores están comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente entre los dos grupos de valores de prueba). El área no depende solamente de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a 90% de especificidad, sino en el gráfico en conjunto. Esta es una expresión cuantitativa, descriptiva de la proximidad del gráfico ROC al gráfico perfecto (área=1,0).

15 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para mejorar la exactitud de diagnóstico para cáncer, por ejemplo, LC o CRC con respecto a controles sanos por medición en una muestra de la concentración de, como mínimo, seprasa y CYFRA 21-1. y opcionalmente CEA, y/o NSE, respectivamente y correlacionando las concentraciones determinadas a la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo LC o CRC, resultando la mejora en que un mayor número de pacientes es clasificado correctamente como afectados de cáncer, por ejemplo, LC o CRC con respecto a controles sanos en comparación con una clasificación basada en cualquier marcador individual investigado en solitario.

25 En un método preferente, según la presente invención, como mínimo la concentración de los biomarcadores seprasa, y CYFRA 21-1, respectivamente, se determina y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación de cáncer, por ejemplo LC o CRC.

En otro método adicionalmente preferente según la presente invención, como mínimo, la concentración de los biomarcadores seprasa y CEA, respectivamente, es determinada y la combinación de marcadores es utilizada en la evaluación de cáncer, por ejemplo, LC o CRC.

30 En otro método preferente, según la presente invención, como mínimo, la concentración de los biomarcadores seprasa, CYFRA 21-1 y CEA, respectivamente, es determinada y la combinación de marcadores es utilizada en la evaluación de cáncer, por ejemplo, LC o CRC.

35 En otro método preferente, según la presente invención, como mínimo, la concentración de los biomarcadores seprasa, CYFRA 21-1 y CEA, respectivamente, es determinada y la combinación de marcadores es utilizada en la evaluación de cáncer, por ejemplo, LC o CRC.

40 Todavía en otro método preferente, de acuerdo con la presente invención, como mínimo, la concentración de los biomarcadores seprasa, CYFRA 21-1 y NSE, respectivamente, es determinada y la combinación de marcadores es utilizada en la evaluación de cáncer, por ejemplo, LC o CRC.

45 Los siguientes ejemplos, referencias, secuencias, listas y figuras se facilitan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo ámbito real se define en las reivindicaciones adjuntas. Se comprenderá que se pueden introducir modificaciones en los procedimientos que se han indicado sin salir del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1 La figura 1 muestra la distribución de valores de concentración de seprasa en suero en pacientes con cáncer colorrectal (CRC) y pacientes de control sanos y controles sanos.

Figura 2 La figura 2 muestra la distribución de valores de concentración de seprasa en suero en pacientes de cáncer de pulmón (LC) y controles sanos.

Figura 3 La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos de seprasa humana (SEC ID NO: 1).

Ejemplo 1

Como moléculas de unión específicas de seprasa se utilizaron anticuerpos monoclonales de rata anti-seprasa (clones D8, D28 y D43) (Pineiro-Sanchez, M.-L., y otros., J. Biol. Chem., 272 (1997) 7595-7601).

Biotinilación de IgG de rata monoclonal

IgG de rata monoclonal (clones D28 ó D43) fue llevado a 10 mg/ml en 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,5, 30 mM NaCl. Por ml de solución IgG se añadieron 50 μl de Biotina-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue cromatografiada sobre Superdex 200 (10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,5, 30 mM NaCl). La fracción que contenía IgG biotinilada fue recogida.

Digoxigenilación de IgG de rata monoclonal.

IgG de rata monoclonal (clones D8 ó D43) fue llevado a 10 mg/ml en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, 30 mM NaCl, pH 7,5. Por ml de solución IgG se añadieron 50 µl ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-aminocapróico-N-hidroxisuccinimida ester (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, Cat. No. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue cromatografiada sobre Superdex® 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl). Las fracciones conteniendo IgG digoxigenilada fueron recogidas.

10 **Ejemplo 2****Ensayo de ELISA para la medición de seprasa en muestras de suero y plasma humano**

Para la detección de seprasa en suero o plasma humano, se desarrolló un análisis ELISA sándwich. En un primer formato de ensayo, partes alícuotas de los anticuerpos D28 monoclonales anti-seprasa conjugados con biotina y D8 conjugado con digoxigenina (ver ejemplo 1) fueron utilizados para captar y detectar el antígeno (formato D28 x D8). En un segundo formato de ensayo, partes alícuotas del anticuerpo monoclonal anti-seprasa D43 (ver ejemplo 1) conjugado con biotina y digoxigenina, respectivamente, se utilizaron para captar y detectar al antígeno (formato D43 x D43).

Se mezclaron muestras (75 µl) con 150 µl de reactivo anticuerpo conteniendo 0,375 µg de cada uno de los anticuerpos D28-biotina y D8-digoxigenina o alternativamente de los anticuerpos D43-biotina y D43-digoxigenina en tampón de incubación (40 mM fosfato, 200 mM tartrato sódico, 10 mM EDTA, 0,05% fenol, 0,1% polietilenglicol 40000, 0,1% Tween 20, 0,2% BSA, 0,1% IgG bovino, y 0,02% de 5-Bromo- 5-Nitro-1,3-Dioxano y se ajustó a pH 7,4).

Después de incubación durante dos horas, se transfirieron 2x100 µl de la mezcla a pocillos separados de una placa de microtitulación con recubrimiento de estreptavidina y se incubó durante otra hora. Las placas fueron lavadas tres veces con tampón de lavado (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20).

En una etapa siguiente, se incubaron pocillos con 30 mU/ml conjugado de anti-digoxigenina-HRP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo # 1633716) en tampón universal conjugado (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo # 11684825) durante 60 minutos y se lavó igual que antes.

Los pocillos fueron incubados a continuación durante 1 hora con 100 µl de solución de sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo # 12034425). La adición de ácido sulfúrico 2N (50 µl) detuvo el desarrollo de color y cambió el color azul en amarillo.

Se midió OD a 450 nm con un lector ELISA.

Todas las incubaciones tuvieron lugar a temperatura ambiente. Las muestras de suero o plasma humano fueron pre-diluidas con tampón de incubación a 0,15 %. Para calibración, se utilizó un conjunto de suero como estándar. Se diluyó con tampón de incubación a 0,09/0,18/0,27/0,36/0,45% para hacer calibradores con valores arbitrariamente asignados de 0,03/0,06/0,09/0,12/0,15 Unidades/ml, respectivamente.

La ecuación de la curva de calibrado fue calculada por análisis de regresión lineal y utilizada para convertir la lectura de observancia de un pocillo en el valor de concentración correspondiente. El resultado fue multiplicado por el factor de pre-dilución para conseguir la concentración de la propia muestra respectiva.

50 **Ejemplo 3****Población estudio CRC**

En un primer estudio, se han utilizado muestras procedentes de 49 pacientes bien caracterizados con cáncer colorrectal (clasificación UICC indicada en la tabla 1).

Tabla 1

Estudio CRC: distribución de muestras según etapas UICC	
Etapas según UICC	Número de muestras
UICC I	8
UICC II	8
UICC III	15
UICC IV	4
Sin clasificar	14
Número total de muestras CRC	49

Las muestras de la tabla 1 han sido evaluadas en comparación con muestras de control obtenidas de 50 individuos evidentemente sanos sin ninguna enfermedad maligna conocida (= grupo de control).

5 **Ejemplo 4**

Población estudio LC

10 Un segundo estudio totalmente independiente del primer y enfocado a cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). De manera más específica, se investigaron pacientes afectados de tipos principales de NSCL, adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas. La tabla 2a describe el tipo y distribución de etapas del equipo de cáncer.

Tabla 2a

Estudio LC: tipo y clasificación de muestras LC		
Tipo de cáncer	Número de muestras	
	UICC I ó II	UICC III ó IV
Adenocarcinoma	12	18
Carcinoma de células escamosas	12	18
Número total de muestras NSCLC	60	

15 El grupo de control en este estudio fue definido especialmente para comprender muestras de fumadores y no fumadores, tal como se describe en la tabla 2b. Se llevó a cabo una prueba de función espirométrica de pulmón (Miller, M.R. y otros, Eur. Respir. J. 26 (2005) 319-338) con cada individuo. Las muestras fueron incluidas en el grupo de control solamente si el resultado del donante se encontraba dentro del rango normal.

20

Tabla 2b

Estudio LC: composición del grupo de control	
Clasificación según UICC	Número de muestras
Fumadores	30
Ex-fumadores	6
No fumadores	24

Ejemplo 5

25 La seprasa discrimina pacientes de cáncer con respecto a controles sanos

La concentración en suero de seprasa difiere notablemente entre pacientes de cáncer y controles sanos, tal como se encontró en ambos estudios. En las figuras 1 y 2 se muestran los resultados de un ensayo utilizando una combinación de anticuerpos D28 y D8.

30

La concentración media de los grupos de pacientes de cáncer es significativamente menor que la de los grupos de control: 22,6 y 20,9 U/ml en pacientes con respecto a 33,6 y 35,6 U/ml en controles se encontró en los estudios CRC y LC respectivamente. Con un valor límite o de corte que proporciona 95% de especificidad del grupo de control respectivo, la sensibilidad para cáncer colorrectal es de 67%. Para el cáncer de pulmón es del 62%.

35

La sensibilidad es similar para todas las etapas de cáncer tal como se puede apreciar de ambos juegos de datos CRC y LC (tablas 3 y 4). Por lo tanto, solo se puede utilizar seprasa como indicador temprano de la enfermedad. Con respecto al cáncer de pulmón, la sensibilidad para carcinomas de células escamosas es más alta que para adenocarcinoma.

40

Tabla 3

Estudio CRC: sensibilidad dependiendo de clasificación UICC			
Clasificación según UICC	Número de muestras	Número positivo	% positivo
UICC I	8	6	75
UICC II	8	4	50
UICC III	15	11	73
UICC IV	4	3	75
Sin clasificación	14	9	64
Número total de muestras CRC	49	33	67

Tabla 4

Estudio LC: sensibilidad dependiendo del tipo y clasificación			
Etapa y tipo de LC	Número de muestras	Número positivo	% positivo
UICC I y II	24	15	63
UICC III y IV	36	22	61
Adenocarcinoma	30	15	50
Carcinoma de células escamosas	30	22	73
Número total de muestras LC	60	37	62

Los resultados de ensayos utilizando dos anticuerpos D43 que detectan solamente formas dímeras o multímeras de seprasa se correlacionaron íntimamente (datos no mostrados).

5

Ejemplo 6**Sensibilidad de otros marcadores para CRC y LC**

10 Además de seprasa, los inventores determinaron otros diez marcadores de tumores bien conocidos en las muestras de estudio CRC y LC. Se utilizaron kits de prueba disponibles comercialmente en este caso. Para hacer una comparación razonable entre ellos, el valor de corte de cada marcador investigado se ajustó para proporcionar 95% de especificidad en el grupo de control del estudio respectivo.

15 La tabla 5 representa la sensibilidad de cada marcador para la detección de ambos tipos de cáncer.

Tabla 5

Sensibilidad de varios marcadores de cáncer para CRC y LC			
Marcador	Sensibilidad (%) para cáncer colorrectal	Sensibilidad (%) para cáncer de pulmón	Media
Seprasa	67	62	64,5
CEA	33	32	32,5
NSE	15	35	25
CA 15-3	10	20	15
CA 72-4	21	7	14
CYFRA21-1	57	72	64,5
S100	16	22	19
AFP	10	7	8,5
hCG-β	9	8	8,5
CA 19-9	31	18	24,5
CA 125	16	32	24

20 La seprasa demuestra sensibilidad similar para CRC y LC. En conjunto, tiene un promedio de 64,5%, el valor más elevado observado entre todos los marcadores evaluados. Solamente Cyfra 21-1 tiene la misma sensibilidad media. Cyfra es significativamente menos efectivo en la detección de CRC que seprasa. El comportamiento mostrado por todos los demás marcadores medidos es más bien pobre en comparación con los dos mencionados.

Ejemplo 7

25

Combinaciones de marcadores

30 Se clasificó que un individuo tenía cáncer si, como mínimo, uno de los marcadores de la combinación correspondiente supera un cierto umbral. En general, estos valores límite eran distintos a los utilizados para el marcador individual, pero facilitaron de manera análoga 95% de especificidad con la combinación respectiva.

La combinación de los dos marcadores más prominentes seprasa y Cyfra 21-1 mejoró notablemente la detección de cáncer y proporción 80% de sensibilidad en es estudio LC.

Ejemplo 8

35

Discriminación de diferentes cánceres de controles sanos con correspondencia de edad, utilizando seprasa como marcador de tumor

- 5 En este estudio, se midieron muestras de pacientes bien caracterizados con diferentes enfermedades de cáncer (números de muestras y clasificación UICC en la tabla 6). Las muestras de la tabla 6 fueron evaluadas en comparación con 264 pacientes de control con correspondencia de edad que eran individuos evidentemente sanos sin ninguna enfermedad maligna conocida. En este grupo de control, el valor límite o de corte fue determinado para obtener una especificidad de 95%.

Tabla 6

Sensibilidad de seprasa en diferentes entidades de cáncer								
Entidad de cáncer	Número de muestra	Número UICC 0	UICC I	UICC II	UICC III	UICC IV	UICC desconocido	Sensibilidad (%)
Conducto biliar	10	-	-	3	1	6	-	50
Vejiga	8	-	-	2	5	1	-	13
Seno	44	-	19	18	6	1	-	18
Cérvix	16	-	6	1	7	2	-	25
Endometrio	15	1	9	2	2	1	-	13
Esófago	30	-	5	3	12	4	6	70
Cabeza/cuello	30	-	2	2	3	21	2	60
Riñón	23	-	4	-	2	5	12	39
Ovario	23	-	3	1	9	8	2	22
Páncreas	64	-	2	26	5	22	9	45
Próstata	33	-	-	25	4	3	1	6
Estómago	37	-	8	8	6	13	2	54

- 10 Se obtuvieron elevadas sensibilidades para seprasa en cáncer de esófago, de cabeza/cuello, estómago y conducto biliar igual que para LC y CRC (datos mostrados en la tabla 5). También se encontró una buena sensibilidad para seprasa para cáncer de páncreas y de riñón. Se ha encontrado menor sensibilidad para seprasa en la evaluación de cáncer de cérvix, ovario y seno. A pesar de una sensibilidad comparativamente baja en el cáncer de seno (18%) en un rastreo (especificidad 95%) la seprasa puede ser considerada también como un marcador interesante para control de recurrencia de cáncer de seno. Los marcadores CA 15-3 y CEA, que se utilizan rutinariamente para esta
- 15 utilización prevista mostraron solamente una sensibilidad de 6% y 11%, respectivamente, en este colectivo de cáncer de seno, que es menor en comparación con el marcador seprasa.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Seprasa como marcador para cáncer
- 25 <130> 24551 WO
- <150> EP 07023897.7
<151> 2007-12-10
- 30 <150> EP 08015310.9
<151> 2008-08-29
- <160> 1
- 35 <170> Versión PatentIn 3.2
- <210> 1
<211> 766
<212> PRT
- 40 <213> Homo sapiens
- <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(766)
- 45 <223> Secuencia según figura 3, (FAP)/Seprasa (base de datos Uni Prot KB nº de acceso P27487)
- <400> 1

ES 2 372 442 T3

Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr
 20 25 30

Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
 35 40 45

Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser
 50 55 60

Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn
 65 70 75 80

Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp
 85 90 95

ES 2 372 442 T3

Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln
 100 105 110

Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr
 115 120 125

Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr
 130 135 140

Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val
 145 150 155 160

Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile
 165 170 175

Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp
 180 185 190

Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu Glu Val Phe
 195 200 205

Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala
 210 215 220

Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe
 225 230 235 240

Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr
 245 250 255

Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn
 260 265 270

Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr
 275 280 285

Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr
 290 295 300

Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln
 305 310 315 320

ES 2 372 442 T3

Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg
 325 330 335

Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly
 340 345 350

Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly
 355 360 365

Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile
 370 375 380

Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly
 385 390 395 400

Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr
 405 410 415

Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr
 420 425 430

Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu
 435 440 445

Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu
 450 455 460

Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr
 465 470 475 480

Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp
 485 490 495

Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln Met Pro Ser Lys
 500 505 510

Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe Trp Tyr Gln Met
 515 520 525

Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
 530 535 540

ES 2 372 442 T3

Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Thr Val Phe Arg
 545 550 555 560

Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val Ala
 565 570 575

Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met His
 580 585 590

Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu Asp Gln Ile Glu
 595 600 605

Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp Asn Lys Arg Ile
 610 615 620

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu
 625 630 635 640

Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 645 650 655

Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly
 660 665 670

Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val
 675 680 685

Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His
 690 695 700

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser
 705 710 715 720

Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr
 725 730 735

Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr
 740 745 750

Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro
 755 760 765

REIVINDICACIONES

1. Método para la evaluación de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar in vitro que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración y/o actividad de
- 5 a) polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo,
 b) opcionalmente uno o varios otros marcadores de cáncer, y
 c) utilización del resultado de medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación de cáncer en el que, en comparación con un grupo de control, una concentración y/o actividad disminuida de un
- 10 polipéptido de seprasa y/o fragmento del mismo indican cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que dicho marcador o marcadores de la etapa (b) son seleccionados del grupo que consiste en CYFRA 21- 1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.
- 15 3. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho uno o varios otros marcadores son CYFRA 21-1.
4. Método, según la reivindicación 2, en el que dicho uno o varios otros marcadores son CEA.
5. Método, según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 4, en el que se efectúa la medición de la concentración de un
- 20 polipéptido seprasa y/o fragmentos del mismo.
6. Método, según la reivindicación 5, en el que la concentración se mide por un método inmunológico.
7. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se mide una forma dímera o multímera de un
- 25 polipéptido de seprasa.
8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que se mide una forma monómera de un polipéptido de seprasa.
- 30 9. Utilización de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo en la evaluación de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar, en el que, en comparación con un grupo de control, una concentración y/o actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma es indicativa de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar.
- 35 10. Utilización de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo en la evaluación de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago y conducto biliar, en el que, en comparación con un grupo de control, una concentración y/o actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma es indicativa de cáncer de colon, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar.
- 40 11. Utilización de un reactivo para medir la actividad enzimática de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo en la evaluación de cáncer de pulmón colón, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar, en el que, en comparación con un grupo de control, una actividad disminuida de seprasa y/o fragmentos de la misma es una muestra de suero o plasma es indicativa de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o
- 45 conducto biliar.
12. Utilización de un panel marcador que comprende un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo y uno o varios otros marcadores para cáncer en la evaluación de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar, en el que en comparación con un grupo de control, una concentración y/o actividad
- 50 disminuida de un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo, en una muestra de suero o plasma es indicativa de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago o conducto biliar.
13. Utilización, según la reivindicación 12, en la que el uno o varios otros marcadores se seleccionan del grupo que consiste en CYFRA 21- 1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.
- 55 14. Utilización, según la reivindicación 12 ó 13, en la que el panel marcador comprende, como mínimo, seprasa y/o fragmentos de la misma y CYFRA 21-1.
15. Kit para llevar a cabo el método, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende los reactivos requeridos para medir de manera específica un polipéptido de seprasa y/o fragmentos del mismo y los reactivos
- 60 requeridos para medir específicamente uno o varios otros marcadores de polipéptidos de cáncer seleccionados entre el grupo de CYFRA 21- 1, CEA, NSE, CA19-9, CA125, PSA, ASC, S100A12 y NNMT.

Fig. 1

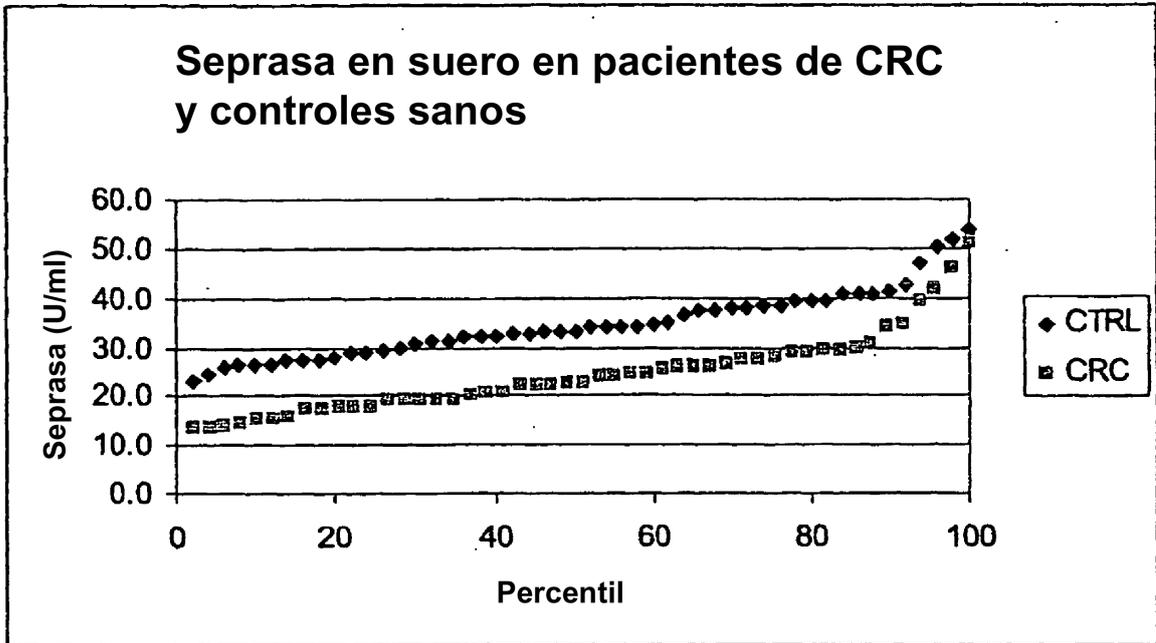


Fig. 2

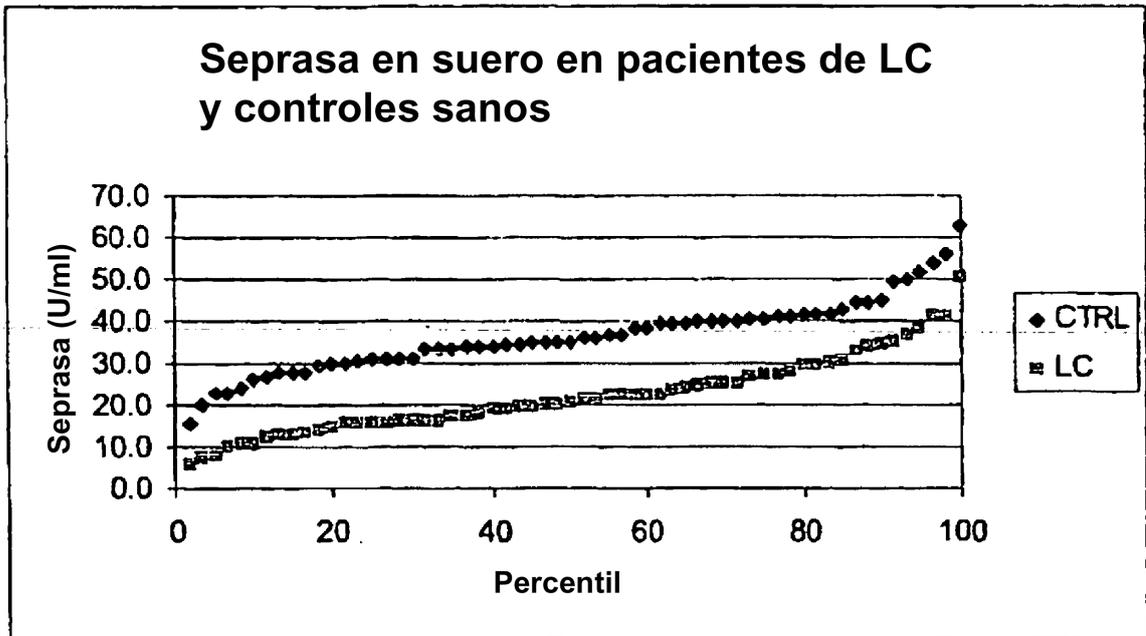


Fig. 3

SEQ ID NO: 1

MKTPWKVLLG LLGAAALVTI ITVPVLLNK GTDDATADSR KTYTLTDYLK
NTYRLKLYSL RWISDHEYLY KQENNILVFN AEYGNSSVFL ENSTFDEFHG
SINDYSISPD GQFILLEINY VKQWRHSYTA SYDIYDLNKR QLITEERIPN
NTQWVTWSPV GHKLAYVWNN DIYVKIEPNL PSYRITWTGK EDIIYNGITD
WVYEEEVFSA YSALWVSPNG TFLAYAQFND TEVPLIEYSF YSDESLQYPK
TVRVYPYKAG AVNPTVKFFV VNTDSLSSVT NATSIQITAP ASMLIGDHYL
CDVTWATQER ISLQWLRIQ NYSVMDICDY DESSGRWNCL VARQHIEMST
TGWVGRFRPS EPHFTLDGNS FYKIISNEEG YRHICYFQID KKDCTFITKG
TWEVIGIEAL TSDYLYYISN EYKMPGGRN LYKIQLSDYT KVTCLSCELN
PERCQYYSVS FSKEAKYYQL RCGPGLPLY TLHSSVNDKG LRVLEDNSAL
DKMLQNVQMP SKKLDFIILN ETKFWYQMIL PPHFDKSKKY PLLLDVYAGP
CSQKADTVFR LNWATYLAST ENIIVASFDG RSGYQGDKI MHAINRRRLGT
FEVEDQIEAA RQFSKMGFVD NKRIAIWGS YGGYVTSMVL GSGSGVFKCG
IAVAPVSRWE YYDSVYTERY MGLPTPEDNL DHYRNSTVMS RAENFKQVEY
LLIHGTADDN VHFQSAQIS KALVDVGVDF QAMWYDDEDH GIASSTAHQH
IYTHMSHFIC QCFSLP