

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 552**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **09738132 .1**  
96 Fecha de presentación: **28.04.2009**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2281195**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.02.2011**

54 Título: **Nivel de expresion de pro-EPIL en una muestra biológica como biomarcador del cáncer de testículo, particularmente en combinación con los biomarcadores HCGbeta y AFP**

30 Prioridad:  
**28.04.2008 US 48412 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.05.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.05.2012**

73 Titular/es:  
**Université Paris Descartes  
12, Rue de l'Ecole de Médecine  
75006 Paris , FR;  
Institut Curie;  
Institut Gustave Roussy;  
Universita Degli Studi di Siena y  
Centre National De La Recherche Scientifique  
CNRS**

72 Inventor/es:  
**BELLET, Dominique;  
PECKING, Alain;  
RICHON, Sophie y  
PETRAGLIA, Felice**

74 Agente/Representante:  
**Curell Aguilá, Mireia**

ES 2 380 552 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

Nivel de expresión de pro-EPIL en una muestra biológica como biomarcador del cáncer de testículo, particularmente en combinación con los biomarcadores HCGBeta y AFP.

5 La presente invención se refiere a la utilización del nivel de expresión del gen de pro-EPIL como biomarcador para el diagnóstico del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales. La presente invención también se refiere a un método *in vitro* para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo en un individuo, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica, particularmente en combinación con la determinación de la subunidad beta $\beta$  -HCG y la alfa-fetoproteína AFP humana. La invención también se refiere a un kit o soporte sólido que comprende ácidos nucleicos o anticuerpos que pueden determinar la presencia o el nivel de expresión de estos tres marcadores biológicos.

15 El tratamiento de pacientes que padecen cáncer de testículo es un éxito de la oncología moderna, pues más del 90 por ciento de los pacientes con diagnóstico reciente de tumores de células germinales se curan y la tasa de mortalidad por cáncer de testículo ha disminuido aproximadamente 70% en los Estados Unidos y Europa Occidental desde la década de los setenta<sup>1-3</sup>. Este éxito se debe a dos importantes avances en el tratamiento de estas neoplasias: la introducción de quimioterapia combinada con cisplatino, que mejoró espectacularmente la tasa de curación, y la introducción simultánea de marcadores tumorales séricos, concretamente la gonadotropina coriónica humana (HCG), su subunidad beta libre ( $\beta$ -HCG) y la alfa-fetoproteína (AFP). Estos marcadores tumorales facilitan el diagnóstico y tienen un papel importante en la evaluación de la respuesta al tratamiento y en el seguimiento de la remisión<sup>4</sup>. La lactato-deshidrogenasa (LDH) también es un producto de los tumores de células germinales, pero constituye un marcador tumoral menos específico.

25 Un factor que afecta al pronóstico es el retraso en el diagnóstico de los tumores testiculares, hecho que afecta al estadio de la enfermedad y, por lo tanto, a su pronóstico. En los últimos veinte años, se ha acentuado la tendencia hacia la reducción de este retraso diagnóstico<sup>5</sup>. Sin embargo, los recientes resultados de un amplio estudio poblacional ponen de manifiesto que un retraso diagnóstico prolongado está asociado a una menor supervivencia de los pacientes que padecen tumores no seminomatosos<sup>6</sup>. Por otro lado, la incidencia mundial del cáncer de testículo ha aumentado más del doble en los últimos 40 años<sup>6</sup>. Recientemente, su incidencia ha aumentado prácticamente en todos los países industrializados<sup>7</sup>. A pesar de los avances alcanzados hace 30 años, en los últimos años la disminución de la tasa de mortalidad se ha empezado a frenar en Europa, Estados Unidos y Japón, lo que indica el posible acercamiento a una asíntota en la mortalidad por cáncer de testículo<sup>3</sup>. Los pacientes que padecen un estadio avanzado de la enfermedad tienen que ser tratados con pautas quimioterapéuticas que presentan una toxicidad importante y algunos de ellos no responden al tratamiento.

35 En este contexto, valdría la pena reducir aún más el retraso diagnóstico y seguir mejorando las modalidades terapéuticas para los tumores testiculares con el fin de reducir la aplicación de este tipo de tratamientos y las molestias derivadas de su toxicidad. El desarrollo de nuevos biomarcadores puede contribuir a alcanzar este objetivo.

Este es el objeto de la presente invención.

40 Se ha demostrado que se puede utilizar el péptido pro-EPIL, o fragmentos específicos del mismo, como biomarcador tumoral para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo en un individuo, particularmente una clase de tumor testicular de células germinales.

45 El péptido EPIL está codificado por el gen insulinoide 4 (INSL4). Dicho gen se ha identificado mediante el cribado de una biblioteca de ADNc de placenta humana de primer trimestre. El gen INSL4 está muy expresado en la placenta temprana y, salvo una débil expresión en los tejidos uterinos normales, no se ha detectado expresión de transcripciones de INSL4 en ningún otro tejido normal examinado hasta el momento<sup>8</sup>. El péptido insulinoide de placenta temprana (EPIL) codificado por el gen insulinoide 4 es un miembro de la familia génica de los insulinoideos, que comprende la insulina, la relaxina (RLX), los factores de crecimiento insulinoideos I y II (IGF I e IGF II), el péptido insulinoide de Leydig (LEY I-L) codificado por el gen INSL3 y los péptidos codificados por los genes INSL5 e INSL6.

50 El EPIL es un polipéptido de 139 aminoácidos que se sintetiza como preprohormona y está caracterizado por un péptido señal, una cadena B, un péptido C de conexión y una cadena A terminal (figura 1). Se ha puesto de manifiesto en la placenta que las células del trofoblasto traducen los ARNm del INSL4 en péptidos pro-EPIL inmunorreactivos que comprenden las cadenas B, C y A<sup>9</sup>. En un principio, el péptido pro-EPIL se detectó en el líquido amniótico y el suero materno durante el embarazo normal, y el patrón de excreción del mismo era parecido al de la  $\beta$ -HCG, lo que sugirió vías de regulación comunes<sup>10</sup>.

55 se ha demostrado que el péptido pro-EPIL (PEP) está expresado y secretado por los tumores testiculares de células germinales (TCGT). Se ha investigado la expresión sérica y celular de PEP en pacientes con cáncer de testículo, lo que ha puesto de manifiesto que el PEP es un nuevo biomarcador que proporciona información adicional con respecto a la obtenida gracias a la  $\beta$ -HCG y la AFP.

De este modo, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo en un individuo, que comprende una etapa de determinación del nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo, en el que la sobreexpresión de dicho gen que codifica el péptido pro-EPIL indica la presencia de un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales.

En una forma de realización preferida, el procedimiento según la presente invención comprende además una etapa de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen seleccionado entre el grupo formado por los genes que codifican la gonadotropina humana HCG, su subunidad beta  $\beta$ -HCG y la y alfa-fetoproteína humana AFP en una muestra biológica aislada de dicho individuo, en el que la sobreexpresión de por lo menos uno de dichos genes que codifican la HCG, su subunidad beta  $\beta$ -HCG o la AFP humana indica la presencia de un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales.

En una forma de realización más preferida, dicho cáncer de testículo y/o clase de tumor testicular de células germinales es seminomatoso o no seminomatoso.

Los métodos de determinación del nivel de expresión de los genes que codifican el pro-EPIL humano, la HCG humana o su subunidad  $\beta$ -HCG y la AFP humana en una muestra biológica aislada de dicho individuo son bien conocidos por el experto en la materia.

En una forma de realización más preferida, en el procedimiento según la presente invención, la presencia de una sobreexpresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL, una sobreexpresión del gen que codifica la  $\beta$ -HCG y una sobreexpresión del gen que codifica la alfa-fetoproteína AFP en una muestra biológica aislada de dicho individuo indica la presencia de un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales no seminomatoso.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de un compuesto candidato para un agente farmacológico útil en el tratamiento del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales, que comprende las etapas siguientes:

- a) poner en contacto un individuo mamífero no humano que presenta cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, con un agente farmacológico candidato;
- b) determinar el nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
- c) opcionalmente, determinar además el nivel de expresión de por lo menos un gen seleccionado entre el grupo formado por los genes que codifican la HCG, su subunidad  $\beta$ -HCG y la AFP humana en una muestra biológica aislada de dicho individuo,

en el que una disminución de la cantidad determinada de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL y, opcionalmente, una disminución de la expresión del gen determinada en la etapa c) indica que el agente farmacológico candidato es un compuesto potencial para un agente farmacológico útil en el tratamiento del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de evaluación del efecto sobre un individuo de un tratamiento del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales, que comprende las etapas siguientes:

- a) determinación del nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
- b) determinación de un segundo nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
- c) comparación de la primera y la segunda cantidades de nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;

en el que una disminución del nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en la segunda muestra biológica aislada de dicho individuo indica la regresión de dicho cáncer de testículo, particularmente del tumor testicular de células germinales.

En los procedimientos según la presente invención, tal como se han definido anteriormente, resulta preferente que el nivel de expresión se determine mediante la detección de la presencia, ausencia o el nivel de ARNm transcrito a partir de dicho gen INSL4 o del péptido pro-EPIL codificado por dicho gen, o un fragmento peptídico específico del mismo. Resulta más preferida la detección de la presencia, ausencia o el nivel de péptido pro-EPIL codificado por dicho gen o un fragmento peptídico específico del mismo.

La secuencia de aminoácidos y del ARNm de la proteína insulinoide humana de placenta temprana (INSL4 o EPIL, véase número de entrada NP-002186 de GenPep) es la siguiente:

Secuencia de aminoácidos completa de pro-EPIL (SEC ID nº: 1)

1 MASLFRSYLP AIWLLLSQLL RESLAAELRG CGPRFGKHLL SYCPMPEKTF  
 51 TTTPGGWLLE SGRPKEMVST SNNKDGQALG TTSEFIPNLS PELKKPLSEG  
 101 QPSLKKIILS RKKRSGRHRF DPFCEVICD DGTSVKLCT

5 aa1-22: péptido señal (SEC ID nº: 2)

aa23-52: "cadena B" (SEC ID nº: 3)

aa59-108: "cadena C" (SEC ID nº: 4)

aa115-139: "cadena A" (SEC ID nº: 5).

Insulinoide 4 (placenta) (INSL4), ARNm (véase número de entrada NM002195 de GenBank, SEC ID nº: 6

1 agtctggagc ccagaagga cacaccagca cagtctgga ggctacagca gcaagtctct  
 61 aaagaaaggc tgagaacacc cagaacagga gagttcaggt ccaggatggc cagcctgttc  
 121 cggtcctatc tgccagcaat ctggctgctg ctgagccaac tccttagaga aagcctagca  
 181 gcagagctga ggggatgtgg tccccgattt ggaaaacact tgctgtcata ttgccccatg  
 241 cctgagaaga cattcaccac caccccagga ggggtggctgc tggaatctgg acgtcccaaa  
 301 gaaatgggtg caacctcaa caacaagat ggacaagcct taggtacgac atcagaattc  
 361 attcctaatt tgtcaccaga gctgaagaaa ccactgtctg aagggcagcc atcattgaag  
 421 aaaataatac tttcccga aaagagaagt ggacgtcaca gatttgatcc attctgtgtg  
 481 gaagtaattt gtgacgatgg aacttcagtt aaattatgta catagtagag taatcatgga  
 541 ctggacatct catccattct catatgtatt ctcaatgaca aattcactga tgccaatta  
 601 aatgattgct gtttaaa

10

nt106-522: secuencia de codificación de pro-EPIL (SEC ID nº: 7)

nt106-171: péptido señal (SEC ID nº: 8)

nt172-261: "cadena B" (SEC ID nº: 9)

nt280-429: "cadena C" (SEC ID nº: 10)

15 nt448-522: "cadena A" (SEC ID nº: 11).

El gen INSL4 codifica un precursor que sufre segmentación postraduccional y da lugar a 3 cadenas polipeptídicas A-C que forman estructuras terciarias compuestas por las tres cadenas o únicamente por las cadenas A y B (Chassin, D., Laurent, A., Janneau, J.L., Berger, R. y Bellet, D., Genomics 29 (2), 465-470 (1995)).

20 Debe apreciarse que el término "fragmento peptídico específico" designa particularmente un fragmento de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene por lo menos una de las características funcionales o propiedades del polipéptido completo, concretamente es que puede ser reconocido por un anticuerpo específico y/o el nivel de expresión de dicho fragmento peptídico específico está correlacionado con el nivel de expresión del pro-EPIL completo o parcial expresado.

25 Debe apreciarse que el término "fragmento peptídico específico" designa particularmente un polipéptido que incluye un mínimo de 9 aminoácidos, preferentemente 10, 11 o 12 aminoácidos, y más preferidamente 15, 20 o 25 aminoácidos con la secuencia SEC ID nº: 1. Preferentemente, dicho fragmento contiene un fragmento de por lo menos la cadena A, B o C del pro-EPIL humano.

30 El experto en la materia dispone de anticuerpos monoclonales o policlonales específicos anti-pro-EPIL. Se puede utilizar un pro-EPIL aislado, o un fragmento específico del mismo, como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen a dicha proteína utilizando técnicas estándares para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. También se puede utilizar cualquier fragmento de dicha proteína que contenga por lo menos un determinante antigénico para generar estos anticuerpos específicos.

Habitualmente, se utilizan inmunógenos proteínicos para preparar anticuerpos mediante la inmunización de un individuo adecuado (por ejemplo, un conejo, una cabra, un ratón u otro mamífero) con el inmunógeno en cuestión. Una preparación inmunógena adecuada puede contener dicho polipéptido pro-EPIL o un fragmento del mismo, e incluir además un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, o un agente inmunoestimulante de este tipo.

Así, los anticuerpos adecuados para su utilización en la presente invención incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales quiméricos o humanizados que pueden capturar selectivamente o unirse selectivamente a un epítipo que contiene un polipéptido pro-EPIL que comprende un tramo contiguo de como mínimo 9 a 10 aminoácidos de un fragmento de pro-EPIL, particularmente de un fragmento que comprende por lo menos la cadena A, B o C del pro-EPIL humano.

Un agente preferido para la detección y cuantificación del ARNm o el ADNc que codifican el pro-EPIL humano es una sonda de ácido nucleico marcada o cebadores que pueden hibridarse con dicho ARNm o ADNc. La sonda de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido con una longitud de por lo menos 10, 15, 30, 50 o 100 nucleótidos y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones estrictas con el ARNm o ADNc. El cebador de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido con una longitud de por lo menos 10, 15 o 20 nucleótidos y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones estrictas con el ARNm o ADNc, o una secuencia complementaria del mismo.

Un agente preferido para la detección y cuantificación del pro-EPIL humano es un anticuerpo que puede unirse específicamente a dicha proteína, preferentemente un anticuerpo con un marcaje detectable. Dichos anticuerpos pueden ser policlonales o, más preferidamente, monoclonales. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término comprende no sólo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv), fragmentos monocatenarios (ScFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una región de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno con la especificidad necesaria. El término anticuerpo incluye anticuerpos de cualquier clase, tales como IgG, IgA o IgM (o una subclase de los mismos), y no debe ser de ninguna clase en particular.

El término "marcado", referido a la sonda o el anticuerpo, pretende comprender el marcaje directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (es decir, por unión física) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario mediante un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y el marcaje final de una sonda de ADN con biotina de tal modo que la misma se puede detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia.

Por ejemplo, entre las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm se incluyen hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Entre las técnicas *in vitro* para la detección de la proteína candidata se incluyen enzimoanálisis de adsorción (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Entre las técnicas *in vitro* para la detección del ADNc candidato se incluyen las hibridaciones de tipo Southern.

Si la presente invención comprende kits para la cuantificación de la concentración del polipéptido pro-EPIL humano o un fragmento específico del mismo, el kit en cuestión puede comprender un compuesto o agente marcado que puede cuantificar dicho polipéptido. Dichos agentes se pueden envasar en un recipiente adecuado. El kit puede comprender además instrucciones para su utilización a fin de cuantificar la concentración de pro-EPIL humano o de transcripción de pro-EPIL humano.

En algunas formas de realización del procedimiento según la presente invención, la determinación de las transcripciones de pro-EPIL humano comprende la utilización de una sonda/cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR de anclaje o RACE-PCR, o, alternativamente, en una reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran *et al*, 1988, Science 241:23-1080; y Nakazawa *et al*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:360-364), o, alternativamente, RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Este método puede incluir las etapas de recogida de una muestra de células de un paciente, aislamiento del ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) a partir de las células de la muestra, opcionalmente transformación del ARNm en el correspondiente ADNc, puesta en contacto de la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente con el ARNm del pro-EPIL o con su ADNc correspondiente en condiciones en las que tiene lugar la hibridación y amplificación del ARNm o el ADNc del pro-EPIL, y cuantificación de la presencia de los productos de amplificación. Se prevé que puede resultar deseable utilizar PCR y/o LCR como etapa de amplificación junto con cualquiera de las técnicas utilizadas para la cuantificación y detección de ácidos nucleicos.

Los procedimientos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de kits de diagnóstico preembalados que comprenden por lo menos una sonda de ácido nucleico o un conjunto de cebador o reactivo de anticuerpo descritos anteriormente en el presente documento, que pueden ser utilizados convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos para el seguimiento o el diagnóstico de los pacientes.

En otra forma de realización preferida, el péptido pro-EPIL o fragmento peptídico específico del mismo se detecta o se cuantifica por análisis de transferencia Western, cromatografía, inmunoensayo o ensayo inmunohistoquímico.

En una forma de realización más preferida, dicho péptido pro-EPIL se detecta o cuantifica mediante inmunoensayo ELISA o por radioinmunoensayo.

- 5 En el procedimiento según la presente invención, resulta preferido seleccionar la muestra biológica obtenida del individuo entre el grupo formado por sangre completa, suero o plasma sanguíneo, biopsia del tumor o combinaciones de los mismos, siendo más preferida el suero o plasma sanguíneo.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende:

- a) un anticuerpo dirigido específicamente contra el péptido pro-EPIL; y
- 10 b) un anticuerpo dirigido específicamente, como mínimo, contra un polipéptido seleccionado entre el grupo formado por los polipéptidos HCG, su subunidad  $\beta$ -HCG y el ARN o ADNc de AFP humana, preferentemente:
- a) un anticuerpo dirigido específicamente contra el péptido pro-EPIL;
- b) un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipéptido HCG o su subunidad  $\beta$ -HCG; y
- c) un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipéptido AFP humano.

- 15 La presente descripción da a conocer además un kit que comprende:

- a) un conjunto de cebadores que pueden amplificar específicamente el ARN o ADNc del pro-EPIL; y
- b) un conjunto de cebadores que pueden amplificar específicamente el ARN o el ADNc del grupo formado por la HCG humana, su subunidad  $\beta$ -HCG y la alfa-fetoproteína AFP humana.

La presente invención se refiere además a un kit que comprende:

- 20 a) un conjunto de cebadores que pueden amplificar específicamente el ARN o ADNc del pro-EPIL;
- b) un conjunto de cebadores que pueden amplificar específicamente el ARN o ADNc de la HCG o su subunidad  $\beta$ -HCG; y
- c) un conjunto de cebadores que pueden amplificar específicamente el ARN o ADNc de la AFP humana;

La presente descripción da a conocer un kit que comprende:

- 25 a) una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN del pro-EPIL; y
- b) una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente, como mínimo, con uno de los ARN seleccionados entre el grupo formado por el ARN de la gonadotropina HCG humana, su subunidad beta  $\beta$ -HCG y la alfa-fetoproteína AFP humana.

Preferentemente, la presente invención se refiere además a un kit que comprende:

- 30 a) una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN del pro-EPIL;
- b) una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN de la HCG o su subunidad beta  $\beta$ -HCG; y
- c) una sonda de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN de la AFP humana;

- 35 En los procedimientos o kits según la presente invención, los anticuerpos o la sonda se pueden marcar cuando sea necesario.

También están comprendidos en la presente invención los kits según la presente invención que resultan adecuados para llevar a cabo el procedimiento para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo en un individuo, para la identificación de un compuesto de interés o para el control de la eficacia de un tratamiento contra el cáncer según la invención reivindicada anteriormente.

- 40 Se pueden inmovilizar uno o más reactivos necesarios para la detección o la cuantificación del biomarcador sobre un soporte sólido, tal como un biochip, a fin de formar una matriz de dos dimensiones, por ejemplo, una matriz de 9 mm x 9 mm, una matriz de 12 mm x 12 mm o una matriz de 15 mm x 15 mm. Se pueden disponer una o más matrices en un biochip y se pueden analizar una o más muestras utilizando un solo biochip. En algunas formas de realización, el soporte sólido del biochip comprende una superficie seleccionada entre el grupo formado por cerámica, vidrio, sílice, cuarzo, nailon, plástico, poliestireno, nitrocelulosa y metal. Este tipo de soportes y de procedimientos por biochip
- 45

(biochip proteínico o de ácido nucleico) son bien conocidos por el experto en la materia para llevar a cabo pruebas de diagnóstico.

Así, también se describe una matriz de molécula de ácido nucleico en fase sólida o un soporte sólido que comprende:

- 5 a) una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN del pro-EPIL; y  
 b) una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente, como mínimo, con uno de los ARN seleccionados entre el grupo formado por el ARN de la gonadotropina HCG humana, de su subunidad beta  $\beta$ -HCG y de la alfa-fetoproteína AFP humana,

fijada sobre un sustrato sólido.

- 10 Preferentemente, se describe una matriz proteínica en fase sólida o soporte sólido que comprende:

- a) un anticuerpo dirigido específicamente contra el péptido pro-EPIL; y  
 b) un anticuerpo dirigido específicamente, como mínimo, contra un polipéptido seleccionado entre el grupo formado por los polipéptidos HCG, su subunidad  $\beta$ -HCG y la AFP humana,

fijada sobre un sustrato sólido.

- 15 La presente invención se refiere además a matrices en fase sólida tal como se reivindican en las reivindicaciones 13 y 14.

Finalmente, la presente invención se refiere a la utilización de la expresión del gen del pro-EPIL como biomarcador, preferentemente como biomarcador sérico (o plasmático) o celular, para el diagnóstico del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales.

- 20 Debe apreciarse que, aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a las formas de realización anteriores, la descripción anterior y los ejemplos siguientes pretenden ilustrar y no limitar el alcance de la misma. Otros aspectos, ventajas y modificaciones comprendidos en el alcance de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la materia a la que pertenece la invención.

### Leyendas de las figuras

- 25 Figura 1: Representación esquemática de la estructura primaria del péptido pro-EPIL y localización de los sitios de unión de anticuerpos reconocidos por los anticuerpos monoclonales EPIL15 y EPIL02. Los residuos aminoácidos se indican por su código de una letra.

Figura 2: Concentraciones séricas de PEP en varones sanos y en pacientes con tumores testiculares de células germinales seminomatosos y no seminomatosos. ○, 10 casos; ●, 1 caso.

- 30 Figuras 3A-3B: Ejemplos representativos de los concentraciones séricas de PEP y  $\beta$ -HCG en dos pacientes con tumores testiculares de células germinales no seminomatosos: paciente con un tumor mixto compuesto por carcinoma embrionario y seminoma. (A) Paciente con un tumor mixto compuesto por coriocarcinoma, tumor del saco vitelino, teratoma y seminoma.

- 35 Figuras 4A-4F: Tinción inmunohistoquímica de PEP (figuras 4A, 4C, 4E) y  $\beta$ -HCG (figuras 4B, 4D, 4F) en un tumor mixto compuesto por carcinoma embrionario, teratoma y coriocarcinoma (A, B), y en un tumor mixto compuesto por carcinoma embrionario, tumor del saco vitelino y seminoma con células sincitiotrofoblásticas (figuras 4C a 4F). Se tomaron fotografías con un aumento de 10x (figuras 4A a 4D) o de 20x (figuras 4E, 4F).

### Ejemplos

#### 1) PACIENTES Y PROCEDIMIENTOS

- 40 a) Población de estudio y recogida de muestras

Todas las muestras de suero se seleccionaron de entre las muestras de nuestro banco, aprobado por el comité ético de investigación clínica. Todas ellas se recogieron, se trataron y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  de un modo similar. Se estudiaron las muestras de suero de 52 pacientes con cáncer de testículo de células germinales a los que se había realizado un seguimiento durante 10 años y de 104 varones sanos, previa obtención de su consentimiento informado. Los datos demográficos e histológicos de los pacientes se recogen en la tabla 1.

- 45

Tabla 1: datos demográficos de los pacientes y datos histológicos de los tumores testiculares de células germinales

ES 2 380 552 T3

	Pacientes	Número de pacientes	
Datos demográficos	Edad en años	34,8 + 10,9	
	Intervalo	17- 69	
	Medición de concentraciones séricas	antes de la orquiectomía	9
		tras la orquiectomía	43
	Período transcurrido entre la orquiectomía y la medición del suero		
	Días	59 + 66,2	
Intervalo	1 – 303		
Tumores			
Datos histológicos	Seminomatosos	25	
	Seminoma	21	
	Seminoma con células sincitiotrofoblásticas	4	
	No seminomatosos	27	
	Formas puras	5	
	Carcinoma embrionario	4	
	Saco vitelino	1	
	Formas mixtas	22	
	Carcinoma embrionario + seminoma	5	
	Carcinoma embrionario + saco vitelino	2	
	Carcinoma embrionario + teratoma	1	
	Teratoma + seminoma	1	
	Coriocarcinoma + seminoma	1	
Otros (más de dos tipos histológicos)	12		

5 Se disponía de los datos clínicos de todos los pacientes cuyo suero se utilizó en el estudio, incluidos el estadio en el momento del diagnóstico, los datos histológicos, las modalidades terapéuticas y el desenlace. Además, se seleccionaron dos muestras de tejido de dos pacientes con cáncer de testículo de la biblioteca de tumores del Centro Integral del Cáncer, de acuerdo con los protocolos aprobados por el comité ético local. Las muestras de tejido se fijaron en formalina tamponada a pH neutro al 10% y se integraron en parafina mediante procedimientos convencionales. Se obtuvieron cortes seriados (5 µm) para el estudio histológico e inmunohistoquímico.

Enzimoimmunoanálisis de adsorción e inmunoensayos de PEP para la detección de β-HCG y AFP.

10 Se midieron las concentraciones séricas de PEP en los sueros mediante un ensayo ELISA basado en el anticuerpo monoclonal (mAb) EPIL15 (cedido amablemente por el profesor Bidart del Institut Gustave-Roussy, Villejuif, Francia) dirigido a la región 98-108 de la cadena C del EPIL, tal como se ha descrito anteriormente<sup>11</sup>. Este anticuerpo actúa como anticuerpo de captura sobre un soporte en fase sólida, mientras que el mAb EPIL02 biotinilado (cedido amablemente por el profesor Bidart del Institut Gustave-Roussy, Villejuif, Francia) dirigido a la región 125-137 de la cadena A del EPIL se utiliza como trazador. La curva estándar se construyó con un péptido que abarca la región 76-139 del pro-EPIL utilizado en concentraciones crecientes comprendidas entre 0,7 ng/ml y 100 ng/ml. Se puso de manifiesto una linealidad constante interanalítica e intraanalítica en el intervalo comprendido entre 0,7 ng/ml y 100 ng/ml. Los coeficientes de variación interanalítica (n = 10) e intraanalítica (n = 33) fueron del 12% y el 13,3%, respectivamente, a 6,6 ng/ml, y del 6% y el 7,5%, respectivamente, a 50 ng/ml. La sensibilidad de este ensayo ELISA es de 1 ng/ml.

20 Se utilizó un ensayo comercial IRMA (ELSA-FβHCG, CIS bio international, Gif-sur-Yvette, Francia) basado en el anticuerpo monoclonal altamente específico mAb FBT11 para medir la β-HCG. El inmunoensayo para la β-HCG

tiene una sensibilidad de 100 pg/ml<sup>12</sup>. Se midieron las concentraciones séricas de AFP mediante un inmunoensayo comercial (BRAHMS-AFP Kryptor, Hennigsdorf, Alemania) basado en el anticuerpo altamente específico mAb AF01<sup>13</sup>. Este ensayo tiene una sensibilidad de 0,23 ng/ml.

b) Datos histológicos e inmunohistoquímicos

5 Los datos histológicos de cada muestra se determinaron mediante el examen visual de los cortes tisulares teñidos con hematoxilina, eosina y azafrán. La inmunotinción se llevó a cabo mediante un dispositivo automático de inmunotinción (Dako Autostainer) y un método de estreptavidina-biotina-peroxidasa (Dako Real™ Detection System LSAB+, Dako SAS, Trappes, Francia) con el mAb EPIL15 dirigido a PEP, un anticuerpo policlonal dirigido a la HCG (Dako SAS, Trappes, Francia) y un anticuerpo policlonal dirigido a la AFP (Dako SAS, Trappes, Francia).

10 c) Análisis estadístico

Se llevaron a cabo análisis estadísticos mediante el programa GraphPad Prism versión 4.0. Las correlaciones se estudiaron con pruebas no paramétricas (Spearman).

2) RESULTADOS

a) Concentraciones séricas de PEP, β-HCG y AFP en la primera determinación

15 Se midieron las concentraciones séricas de PEP, β-HCG y AFP en 25 pacientes con tumores testiculares de células germinales seminomatosos y en 27 pacientes con tumores no seminomatosos (tabla 1). Se recogieron muestras de suero antes de la orquiectomía en 9 pacientes y tras la misma en 43 pacientes. Paralelamente, se midieron las concentraciones séricas de PEP en 104 varones sanos. Los valores séricos de PEP se muestran en la figura 2. En los individuos sanos, únicamente 2 de 104 (1,9%) presentaban valores séricos superiores a 1 ng/ml, mientras que 13 de 52 pacientes (25%) mostraron concentraciones séricas de PEP superiores a 1 ng/ml. En pacientes con tumores de células germinales seminomatosos y no seminomatosos, el PEP estaba presente en el 24% y el 25% de las muestras de suero en la primera determinación, respectivamente. En esta serie de 52 pacientes, se detectaron concentraciones séricas de β-HCG en 17 pacientes (32,6%) y la AFP fue elevada en el suero de 12 pacientes (23%). El análisis de los datos con pruebas no paramétricas (Spearman) puso de manifiesto que los valores séricos de PEP no correlacionaban con las concentraciones séricas de β-HCG (r = 0,0076) o de AFP (r = -0,0548). De hecho, uno y/o dos de estos biomarcadores estaban presentes en el 44,2% de los pacientes, mientras que el PEP, la β-HCG y/o la AFP se detectaron en el suero del 59,6% de los pacientes con cánceres testiculares seminomatosos o no seminomatosos (tabla 2).

30 Tabla 2: pacientes con concentraciones séricas elevadas de PEP (> 1 ng/ml), β-HCG (> 0,1 ng/ml) y/o AFP (> 10 ng/ml)

Datos histológicos	Número de pacientes	Biomarcador o biomarcadores en suero				
		PEP	β-HCG	AFP	β-HCG o AFP libres	PEP o β-HCG o AFP
Seminomatosos	25	6	9	0	10	13
No seminomatosos	27	7	8	12	13	17
Total	52	13 (25%)	17 (32,6%)	12 (23%)	23 (44,2%)	31 (59,6%)

b) Mediciones seriadas de concentraciones séricas de PEP y β-HCG

35 La determinación seriada de PEP y β-HCG se llevó a cabo en dos pacientes a los que se realizó un seguimiento durante un mínimo de cuatro años y que se tomaron como representativos (figuras 3A y 3B). Uno de los pacientes presentó valores séricos elevados de PEP durante 42 meses tras la orquiectomía, mientras que nunca se le detectó β-HCG ni AFP (figura 3). Sin embargo, en este paciente, la muestra de suero inicial disponible para el estudio se había extraído 3 meses después de la intervención. Cabe destacar que, tras un descenso inicial de los valores de

PEP tras la orquiectomía, este paciente, que presentaba una forma mixta de tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por carcinoma embrionario y seminoma, experimentó simultáneamente un aumento de las concentraciones séricas de PEP y recidiva ganglionar. El otro paciente representativo presentaba concentraciones medibles de PEP,  $\beta$ -HCG y AFP (116 UI/ml) en la muestra de suero inicial extraída antes de la orquiectomía. Tras la intervención, las concentraciones de AFP se mantuvieron por debajo del límite superior de los valores habituales que se encuentran en los individuos sanos ( $< 5 \text{ ng/ml}$ )<sup>13</sup>. Se siguió detectando una concentración baja de  $\beta$ -HCG (0,122 pg/ml) incluso 3 meses después de la intervención. En contraste con esto, se detectaron concentraciones elevadas de PEP hasta 3 años después de la intervención quirúrgica para este tumor, que consistía en un tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por coriocarcinoma, tumor del saco vitelino, teratoma y seminoma.

### c) Expresión de PEP en células

Con el fin de identificar las células productoras de PEP, se llevaron a cabo estudios inmunohistoquímicos en cortes histológicos de dos tumores testiculares que excretaban concentraciones séricas medibles de PEP. Un tumor era una forma mixta de tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por carcinoma embrionario, teratoma y coriocarcinoma (figuras 4A y 4B), y el otro consistía en una forma mixta de un tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por carcinoma embrionario, tumor del saco vitelino y seminoma con células sincitiotrofoblásticas (figuras 4C a 4F). En los cortes tisulares estudiados no estaban presentes células productoras de AFP. En cambio, las células productoras de  $\beta$ -HCG se tiñeron fuertemente con mAb dirigido a  $\beta$ -HCG. En estos tumores, se detectó tinción de PEP con mAb EPIL<sup>15</sup> en células multinucleadas (sincitiotrofoblásticas), mientras que, en un tumor, también se detectó tinción en las células mononucleadas (figuras 4E y 4F). En este tumor, la intensidad de la tinción fue más fuerte en las células mononucleadas que en las multinucleadas.

### 3) CONCLUSIÓN

El cáncer de testículo es el tumor sólido más común en hombres jóvenes con edades comprendidas entre los 15 y los 34 años, y el 95% de estos cánceres son tumores de células germinales, un término que indica su origen en las células germinales primordiales<sup>1</sup>. Los marcadores tumorales sensibles y las modalidades terapéuticas eficaces han transformado el pronóstico de estos cánceres, que actualmente son en gran medida curables. Sin embargo, permanecen abiertos varios aspectos de estos tumores testiculares de células germinales: La incidencia de este tipo de cáncer va en aumento y el retraso en el diagnóstico todavía puede ser demasiado prolongado para algunos pacientes, lo que afecta a su pronóstico. Aunque dicho pronóstico se considera bueno en una gran mayoría de los pacientes, sigue existiendo un grupo con mal pronóstico. Desde una perspectiva más amplia, la desaceleración observada recientemente en la disminución de la tasa de mortalidad genera preocupación. Otro problema es la necesidad de minimizar los efectos tóxicos del tratamiento a largo plazo sin mermar su eficacia. Aunque los tres biomarcadores HCG,  $\beta$ -HCG y AFP contribuyen eficazmente al tratamiento de los cánceres de testículo, dicho tratamiento se podría mejorar mediante nuevos biomarcadores. Entre estos tres biomarcadores, cabe destacar que, en términos de expresión, la HCG y la  $\beta$ -HCG comparten similitudes con un grupo particular de antígenos denominados antígenos cáncer/testículo (C/T). Para que una proteína se considere un antígeno C/T, ésta debe estar expresada en los tumores así como en los testículos y/o la placenta, pero no en más de dos tejidos normales no de línea germinal. Por lo general, si se detecta expresión en tejidos normales no de línea germinal, ésta representa únicamente una pequeña fracción de la detectada en los testículos<sup>14</sup>. Como la  $\beta$ -HCG, el antígeno tumoral MZ2-E, que fue el primer antígeno C/T que se describió, junto con un creciente número de antígenos C/T (más de 40) identificados hasta el momento, están muy expresados en la placenta y los tumores<sup>15</sup>. Análogamente, el PEP está expresado en la placenta y los tumores: se ha documentado que las células de cáncer de mama positivas para c-erbB-2 con un alto potencial invasivo expresan y secretan PEP<sup>16</sup>. Por otra parte, tal como se espera de un antígeno C/T, la expresión de PEP se detectó únicamente en un tejido normal no de línea germinal, siendo además una expresión débil. Así, la expresión de PEP presenta la mayor parte de características de los antígenos cáncer/testículo (C/T), y el presente estudio se diseñó con el fin de determinar si este antígeno constituye también un biomarcador de los cánceres de testículo.

El PEP se detecta en aproximadamente la mitad de los varones que presentan tumores testiculares seminomatosos (24%) o no seminomatosos (25,9%) (tabla 2). En cambio, se detectaron concentraciones séricas medibles únicamente en 2 de cada 104 (1,9%) varones sanos. No es infrecuente que los marcadores tumorales, incluidas la HCG y la  $\beta$ -HCG, estén presentes en un número limitado de varones sanos. De hecho, los sueros de los hombres y de las mujeres no embarazadas contienen concentraciones bajas de HCG y  $\beta$ -HCG que se pueden detectar mediante pruebas sensibles; es probable que la detección de PEP en menos del 2% de los varones sanos esté relacionada con la sensibilidad del inmunoensayo utilizado para la medición de PEP<sup>17, 18</sup>. Lo que es más importante, resulta sorprendente que 8 de cada 13 (61,5%) tumores productores de PEP no segregaron concentraciones detectables de  $\beta$ -HCG ni de AFP. De hecho, en esta serie de 52 pacientes con cáncer de testículo de células germinales, el 44,2% de los pacientes presentaban concentraciones séricas medibles de  $\beta$ -HCG y/o AFP, mientras que las concentraciones de  $\beta$ -HCG, AFP y/o PEP fueron elevadas en el suero del 59,6% de los pacientes. Es probable que estos porcentajes estuvieran subestimados, ya que la mayor parte de las muestras de suero se recogieron entre 1 y 303 días después de la orquiectomía: en esta serie, el 48,1% de los pacientes con tumores no seminomatosos presentaban concentraciones séricas elevadas de  $\beta$ -HCG y/o AFP, mientras que anteriormente se

había observado que uno de estos marcadores, o ambos, están expresados aproximadamente en las tres cuartas partes de los tumores no seminomatosos<sup>2</sup>.

Otra observación inesperada fue la persistencia de concentraciones séricas medibles de PEP en algunos pacientes incluso 42 meses después del final del tratamiento. Es probable que esta persistencia de concentraciones séricas medibles de PEP indique la presencia de células tumorales residuales. La intervención quirúrgica de las masas residuales tras la quimioterapia en pacientes con cáncer de testículo muestra que el 45% y el 10% de dichas masas residuales contienen teratomas o la enfermedad activa, respectivamente<sup>19</sup>. Además, se documentó que los pacientes que presentan variedad de tumores primarios de células germinales en los testículos y han sido tratados con radioterapia y/o quimioterapia además del tratamiento quirúrgico pueden desarrollar teratomas maduros en diferentes zonas anatómicas<sup>20</sup>. Curiosamente, un paciente con un tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por carcinoma embrionario y seminoma experimentó un aumento en las concentraciones séricas de PEP antes de la recidiva ganglionar, seguido por concentraciones séricas persistentes de PEP tras la finalización de la quimioterapia (figura 3A). Otro paciente con concentraciones persistentes de PEP no recibió radioterapia ni quimioterapia (figura 3B). Dicho paciente presentaba un tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por coriocarcinoma, tumor del saco vitelino, teratoma y seminoma. Por consiguiente, permanecen a la espera de determinar los tipos de células tumorales que continúan produciendo PEP. De hecho, el PEP es excretado en cánceres de testículo con una amplia variedad de tipos histológicos. En nuestra serie, el PEP fue excretado por 6 seminomas puros sin células sincitiotrofoblásticas, 1 carcinoma embrionario y 6 tumores mixtos que contenían dos o tres tipos histológicos diferentes; (1 carcinoma embrionario y seminoma, 1 coriocarcinoma y seminoma, 1 teratoma y seminoma, 1 carcinoma embrionario, teratoma y coriocarcinoma, 1 carcinoma embrionario, tumor del saco vitelino y seminoma con células sincitiotrofoblásticas y 1 coriocarcinoma, tumor del saco vitelino, teratoma y seminoma). A fin de caracterizar el tipo histológico de las células expresoras, se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica en dos tumores mixtos con anticuerpos dirigidos a  $\beta$ -HCG, AFP y PEP: un tumor de testículo contenía carcinoma embrionario, teratoma y coriocarcinoma (figuras 4A y 4B), y el otro era una forma mixta de tumor de células germinales no seminomatoso compuesto por carcinoma embrionario, tumor del saco vitelino y seminoma con células sincitiotrofoblásticas (figuras 4C a 4F). En estos cortes tisulares, las células multinucleadas parecían producir tanto  $\beta$ -HCG como PEP con intensidades de tinción idénticas (figuras 4A y 4B) o diferentes (figuras 4C y 4D). En las células mononucleadas, estas dos proteínas pueden ser producidas por células mononucleadas idénticas o distintas.

Consideradas en conjunto, las observaciones en suero y en células muestran que, al contrario que en la placenta normal, en la que la biosíntesis de  $\beta$ -HCG y PEP puede estar regulada por vías comunes, en los tumores testiculares de células germinales su producción puede estar regulada por vías diferentes<sup>10</sup>.

En conclusión, el PEP es un biomarcador sérico que proporciona información adicional sobre los cánceres de testículo de células germinales. El PEP puede ser el único biomarcador presente en el suero de los tumores testiculares seminomatosos y no seminomatosos que indica la presencia de células tumorales no detectadas con anterioridad mediante otros biomarcadores séricos en el diagnóstico clínico. El PEP también puede indicar la presencia de células tumorales residuales que continúan presentes varios años después de finalizar el tratamiento.

## Referencias

1. Bosl GJ, Motzer RJ: Testicular germ-cell cancer. *N Engl J. Med.* 337:242-53, 1997.
2. Horwich A, Huddart R, Dearnaley D: Markers and management of germ-cell tumors of the testes. *Lancet* 352: 1535-8, 1998.
3. Levi F, La Vecchia C, Boyle P, et al: Western and eastern European trends in testicular cancer mortality. *Lancet* 357:1853-4, 2001.
4. Horwich A, Shipley J, Huddart R: Testicular germ-cell cancer. *Lancet* 367:754-65, 2006.
5. Dieckmann KP: Diagnostic delay in testicular cancer: an analytic chimaera or a worthy goal. *Eur Urol* 52:1566-8, 2007.
6. Huyghe E, Muller A, Miousset R, et al: Impact of diagnostic delay in testis cancer: results of a large populationbased study. *Eur Urol* 52:1710-6, 2007.
7. Huyghe E, Matsuda T, Thonneau P: Increasing incidence of testicular cancer worldwide: a review. *J. Urol.* 170: 5-11, 2003.
8. Chassin D, Laurent A, Janneau JL, et al: Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics* 29:465-70, 1995.
9. Bellet D, Lavaissiere L, Mock P, et al: Identification of pro-EPIL and EPIL peptides translated from insulin-like 4 (INSL4) mRNA in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3169-72, 1997.

10. Mock P, Frydman R, Bellet D, et al: Pro-EPIL forms are present in amniotic fluid and maternal serum during normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 84:2253-6, 1999.
11. Bruni L, Luisi S, Ferretti C, et al: Changes in the maternal serum concentration of proearly placenta insulin-like growth factor peptides in normal vs abnormal pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 197:606 e1-4, 2007.
- 5 12. Marcillac I, Troalen F, Bidart JM, et al: Free human chorionic gonadotropin beta subunit in gonadal and nongonadal neoplasms. *Cancer Res* 52:3901-7, 1992.
13. Bellet DH, Wands JR, Isselbacher KJ, et al: Serum alpha-fetoprotein levels in human disease: perspective from a highly specific monoclonal radioimmunoassay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81:3869-73, 1984.
- 10 14. Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ: The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun.* 4:1, 2004.
15. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-7, 1991.
16. Brandt B, Roetger A, Bidart JM, et al: Early placenta insulin-like growth factor (pro-EPIL) is overexpressed and secreted by c-erbB-2-positive cells with high invasion potential. *Cancer Res* 62:1020-4, 2002.
- 15 17. Stenman UH, Tiitinen A, Alfthan H, et al: The classification, functions and clinical use of different isoforms of HCG. *Hum Reprod Update* 12:769-84, 2006.
18. Alfthan H, Haglund C, Dabek J, et al: Concentrations of human choriogonadotropin, its beta-subunit, and the core fragment of the beta-subunit in serum and urine of men and nonpregnant women. *Clin Chem* 38:1981-7, 1992.
- 20 19. Flechon A, Rivoire M, Berger N: [Surgery of residual masses after chemotherapy in patients with testicular cancer]. *Rev Prat* 57:389-98, 2007.
20. Hong WK, Wittes RE, Hajdu ST, et al: The evolution of mature teratoma from malignant testicular tumors. *Cancer* 40:2987-92, 1977.

**Listado de secuencias**

- <110> UNIVERSITE PARIS DESCARTES
- 25 BELLET, DOMINIQUE
- PECKING, ALAIN
- RICHON, SOPHIE
- PETRAGLIA, FELICE
- 30 <120> Nivel de expresión de pro-EPIL en una muestra biológica como biomarcador de cáncer de testículo, particularmente en combinación con los biomarcadores de HCGbeta y AFP
- <130> 354601 D26505
- <150> US 61/048,412
- <151> 2008-04-28
- <160> 11
- 35 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 139
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 40 <400> 1

ES 2 380 552 T3

Met Ala Ser Leu Phe Arg Ser Tyr Leu Pro Ala Ile Trp Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Ser Gln Leu Leu Arg Glu Ser Leu Ala Ala Glu Leu Arg Gly Cys Gly  
20 25 30

Pro Arg Phe Gly Lys His Leu Leu Ser Tyr Cys Pro Met Pro Glu Lys  
35 40 45

Thr Phe Thr Thr Thr Pro Gly Gly Trp Leu Leu Glu Ser Gly Arg Pro  
50 55 60

Lys Glu Met Val Ser Thr Ser Asn Asn Lys Asp Gly Gln Ala Leu Gly  
65 70 75 80

Thr Thr Ser Glu Phe Ile Pro Asn Leu Ser Pro Glu Leu Lys Lys Pro  
85 90 95

Leu Ser Glu Gly Gln Pro Ser Leu Lys Lys Ile Ile Leu Ser Arg Lys  
100 105 110

Lys Arg Ser Gly Arg His Arg Phe Asp Pro Phe Cys Cys Glu Val Ile  
115 120 125

Cys Asp Asp Gly Thr Ser Val Lys Leu Cys Thr  
130 135

<210> 2

5 <211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ser Leu Phe Arg Ser Tyr Leu Pro Ala Ile Trp Leu Leu Leu  
1 5 10 15

Ser Gln Leu Leu Arg Glu  
20

10 <210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Leu Ala Ala Glu Leu Arg Gly Cys Gly Pro Arg Phe Gly Lys His  
1 5 10 15

15 Leu Leu Ser Tyr Cys Pro Met Pro Glu Lys Thr Phe Thr Thr  
20 25 30

<210> 4

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 380 552 T3

<400> 4

Leu Glu Ser Gly Arg Pro Lys Glu Met Val Ser Thr Ser Asn Asn Lys  
1 5 10 15

Asp Gly Gln Ala Leu Gly Thr Thr Ser Glu Phe Ile Pro Asn Leu Ser  
20 25 30

Pro Glu Leu Lys Lys Pro Leu Ser Glu Gly Gln Pro Ser Leu Lys Lys  
35 40 45

Ile Ile  
50

<210> 5

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Gly Arg His Arg Phe Asp Pro Phe Cys Cys Glu Val Ile Cys Asp  
1 5 10 15

Asp Gly Thr Ser Val Lys Leu Cys Thr  
20 25

<210> 6

10 <211> 617

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

agtctggagc ccagaagga cacaccagca cagtctggta ggctacagca gcaagtctct 60
aaagaaaggc tgagaacacc cagaacagga gagttcaggt ccaggatggc cagcctgttc 120
cggctctatc tgccagcaat ctggctgctg ctgagccaac tccttagaga aagcctagca 180
gcagagctga ggggatgtgg tccccgattt ggaaaacact tgctgtcata ttgccccatg 240
cctgagaaga cattcaccac caccacagga ggggtgctgc tggaatctgg acgtcccaaa 300
gaaatggtgt caacctcaa caacaaagat ggacaagcct taggtacgac atcagaattc 360
attcctaatt tgtcaccaga gctgaagaaa ccactgtctg aagggcagcc atcattgaag 420
aaaataatac tttcccgcaa aaagagaagt ggacgtcaca gatttgatcc attctgttgt 480
gaagtaattt gtgacgatgg aacttcagtt aaattatgta catagtagag taatcatgga 540
ctggacatct catccattct catatgtatt ctcaatgaca aattcactga tgcccaatta 600
aatgattgct gtttaaa 617
    
```

15 <210> 7

<211> 417

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 380 552 T3

**atggccagcc tgttccggtc ctatctgcca gcaatctggc tgctgctgag ccaactcctt 60**  
**agagaaagcc tagcagcaga gctgagggga tgtgggtcccc gatttggaac acacttgctg 120**  
**tcatattgcc ccatgcctga gaagacattc accaccacc caggagggtg gctgctggaa 180**  
**tctggacgtc ccaaagaaat ggtgtcaacc tccaacaaca aagatggaca agccttaggt 240**  
**acgacatcag aattcattcc taattgtca ccagagctga agaaaccact gtctgaaggg 300**  
**cagccatcat tgaagaaaat aatactttcc cgcaaaaaga gaagtggacg tcacagattt 360**  
**gatccattct gttgtgaagt aatttgtgac gatggaactt cagttaaatt atgtaca 417**  
 <210> 8  
 <211> 66  
 <212> ADN  
 5 <213> Homo sapiens  
 <400> 8  
**atggccagcc tgttccggtc ctatctgcca gcaatctggc tgctgctgag ccaactcctt 60**  
**agagaa 66**  
 <210> 9  
 <211> 90  
 10 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
**agcctagcag cagagctgag gggatgtggt ccccgatttg gaaaacactt gctgtcatat 60**  
**tgcccatgc ctgagaagac attcaccacc 90**  
 <210> 10  
 15 <211> 150  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
**ctggaatctg gacgtcccaa agaaatgggtg tcaacctcca acaacaaga tggacaagcc 60**  
**ttaggtacga catcagaatt cattcctaatt ttgtcaccag agctgaagaa accactgtct 120**  
**gaagggcagc catcattgaa gaaaataata 150**  
 20 <210> 11  
 <211> 75  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 11  
**agtggacgtc acagatttga tccattctgt tgtgaagtaa tttgtgacga tggaaactta 60**  
 25 **gttaaattat gtaca 75**

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento *in vitro* para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo en un individuo, que comprende la etapa que consiste en determinar el nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo, en el que la sobreexpresión de dicho gen que codifica el péptido pro-EPIL indica la presencia de un cáncer de testículo y/o de una clase de tumor testicular de células germinales, preferentemente un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales seminomatosos o no seminomatosos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa de determinación del nivel de expresión de por lo menos un gen seleccionado entre el grupo constituido por los genes que codifican la gonadotropina humana HCG, su subunidad beta  $\beta$ -HCG y la alfa-fetoproteína AFP humana en una muestra biológica aislada de dicho individuo, en el que la sobreexpresión de por lo menos uno de dichos genes que codifican la HCG, su subunidad beta  $\beta$ -HCG o la AFP humana indica la presencia de un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa de determinación del nivel de expresión de los genes que codifican la HCG, o su subunidad  $\beta$ -HCG, y la AFP humana en una muestra biológica aislada de dicho individuo, en el que la sobreexpresión de por lo menos uno de dichos genes que codifican la HCG, o su subunidad beta  $\beta$ -HCG, o la AFP humana, indica la presencia de un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que la presencia de una sobreexpresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL, una sobreexpresión del gen que codifica la  $\beta$ -HCG y una sobreexpresión del gen que codifica la alfa-fetoproteína AFP en una muestra biológica aislada de dicho individuo indica la presencia de un cáncer de testículo y/o una clase de tumor testicular de células germinales no seminomatosos.
5. Procedimiento de identificación de un compuesto candidato para un agente farmacológico útil en el tratamiento del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales, que comprende las etapas siguientes:
- a) poner en contacto un individuo mamífero no humano que presenta cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, con un agente farmacológico candidato;
  - b) determinar el nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
  - c) opcionalmente, determinar además el nivel de expresión de por lo menos un gen seleccionado entre el grupo constituido por los genes que codifican la HCG, su subunidad  $\beta$ -HCG y la AFP humana en una muestra biológica aislada de dicho individuo,
- en el que una disminución de la cantidad de prueba de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL y, opcionalmente, una disminución de la expresión del gen determinada en la etapa c) indica que el agente farmacológico candidato es un compuesto potencial para un agente farmacológico útil en el tratamiento del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales.
6. Procedimiento para evaluar el efecto en un individuo de un tratamiento del cáncer de testículo, particularmente de un tumor testicular de células germinales, que comprende las etapas siguientes:
- a) determinar el nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
  - b) determinar un segundo nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
  - c) comparar las primera y segunda cantidades de nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en una muestra biológica aislada de dicho individuo;
- en el que una disminución del nivel de expresión del gen que codifica el péptido pro-EPIL en la segunda muestra biológica aislada de dicho individuo indica la regresión de dicho cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de expresión se determina mediante la detección de la presencia, la ausencia o el nivel de ARNm transcrito de dicho gen o de polipéptido codificado por dicho gen, o un fragmento específico del mismo.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho polipéptido se detecta o cuantifica por análisis de transferencia Western, cromatografía, inmunoensayo o ensayo inmunohistoquímico.

9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica obtenida del individuo se selecciona entre el grupo que comprende sangre completa, suero o plasma sanguíneos, biopsia del tumor o combinaciones de los mismos.
- 5 10. Kit para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, que comprende:
- a) un anticuerpo dirigido específicamente contra el péptido pro-EPIL;
  - b) un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipéptido HCG o su subunidad  $\beta$ -HCG; y
  - c) un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipéptido AFP humano.
- 10 11. Kit para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, que comprende:
- a) un conjunto de cebadores que pueden ampliar específicamente el ARN o ADNc del pro-EPIL; y
  - b) un conjunto de cebadores que pueden ampliar específicamente el ARN o el ADNc del grupo constituido por la HCG, su subunidad  $\beta$ -HCG; y
  - c) un conjunto de cebadores que pueden amplificar el ARN o ADNc de la alfa-fetoproteína AFP humana.
- 15 12. Kit para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, constituido por:
- a) una sonda nucleica que puede hibridarse específicamente con el ARN del pro-EPIL;
  - b) una sonda nucleica que puede hibridarse específicamente con el ARN de la gonadotropina HCG humana o su subunidad beta  $\beta$ -HCG; y
  - c) una sonda nucleica que puede hibridarse específicamente con el ARN de la alfa-fetoproteína AFP humana.
- 20 13. Matriz de moléculas de ácido nucleico en fase sólida para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, que comprende:
- a) una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN del pro-EPIL;
  - b) una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN de la gonadotropina HCG humana o su subunidad beta  $\beta$ -HCG; y
  - c) una molécula de ácido nucleico que puede hibridarse específicamente con el ARN de la alfa-fetoproteína AFP humana.
- 25 14. Micromatriz proteínica en fase sólida para la detección y/o clasificación de un cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales, que comprende:
- a) un anticuerpo dirigido específicamente contra el péptido pro-EPIL;
  - b) un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipéptido HCG o su subunidad  $\beta$ -HCG; y
  - c) un anticuerpo dirigido específicamente contra el polipéptido AFP humano.
- 30 fijada sobre un sustrato sólido.
- 35 15. Utilización de la expresión del gen del pro-EPIL como biomarcador para el diagnóstico del cáncer de testículo, particularmente un tumor testicular de células germinales.



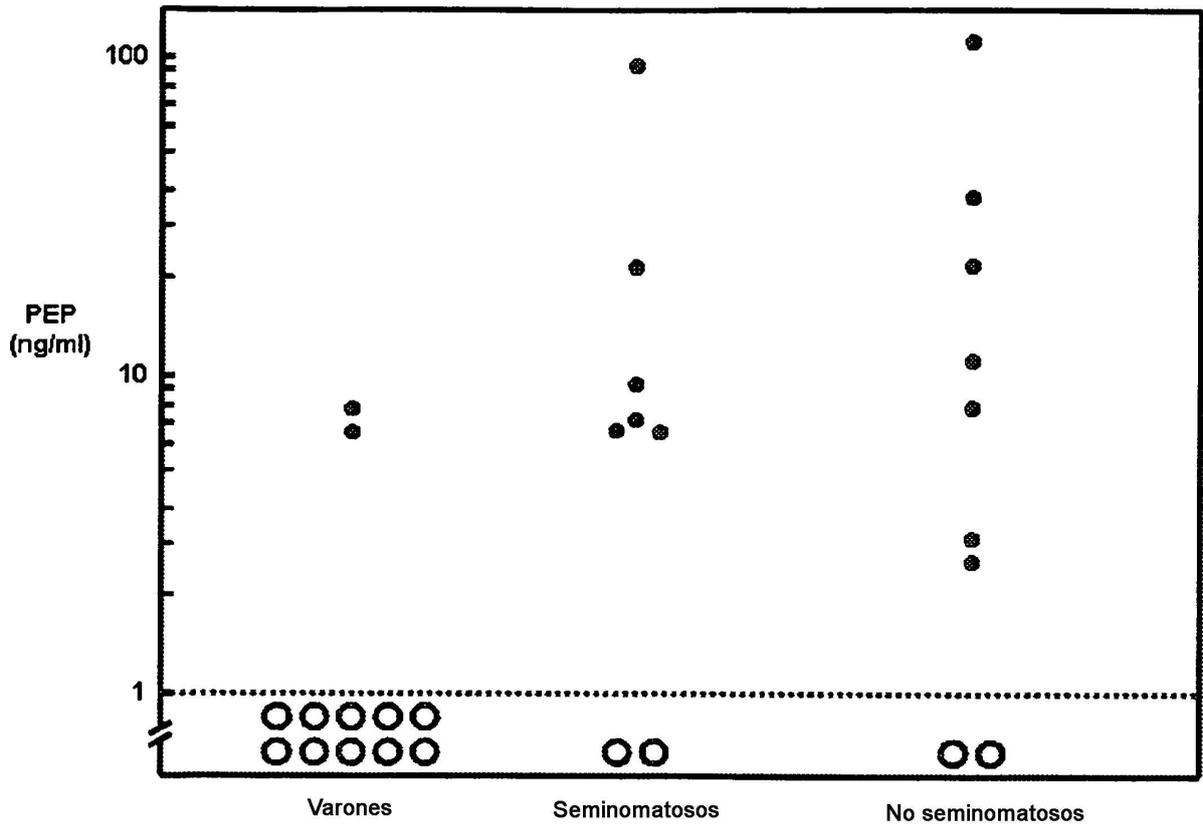


Figura 2

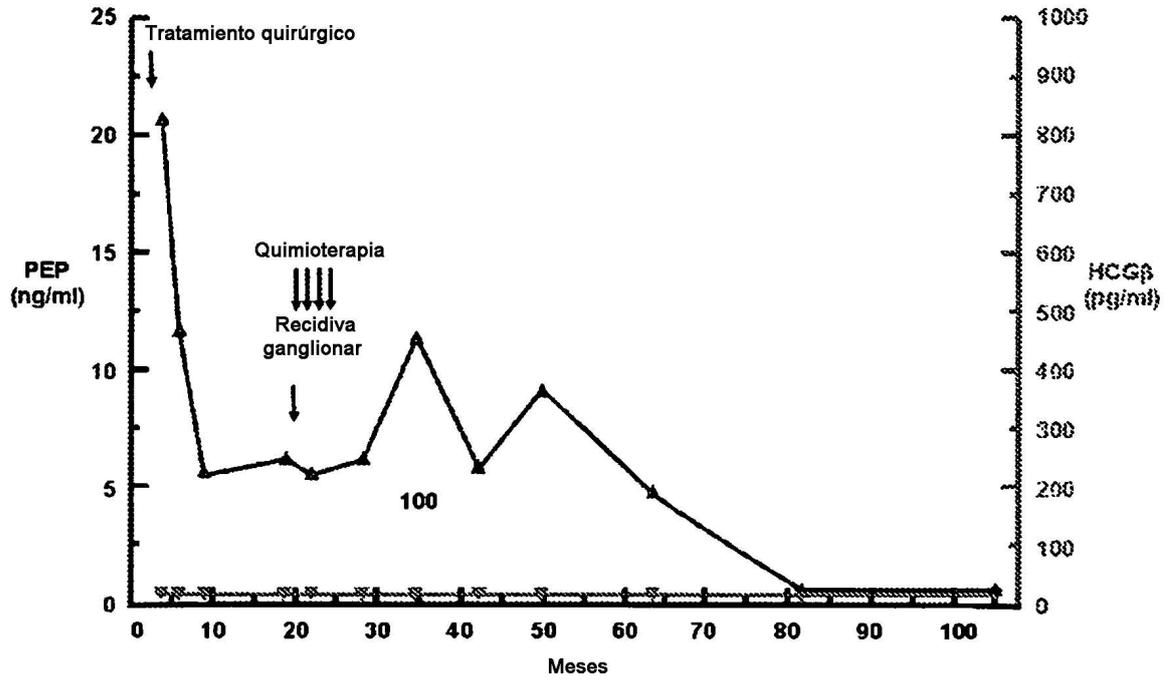


Figura 3A

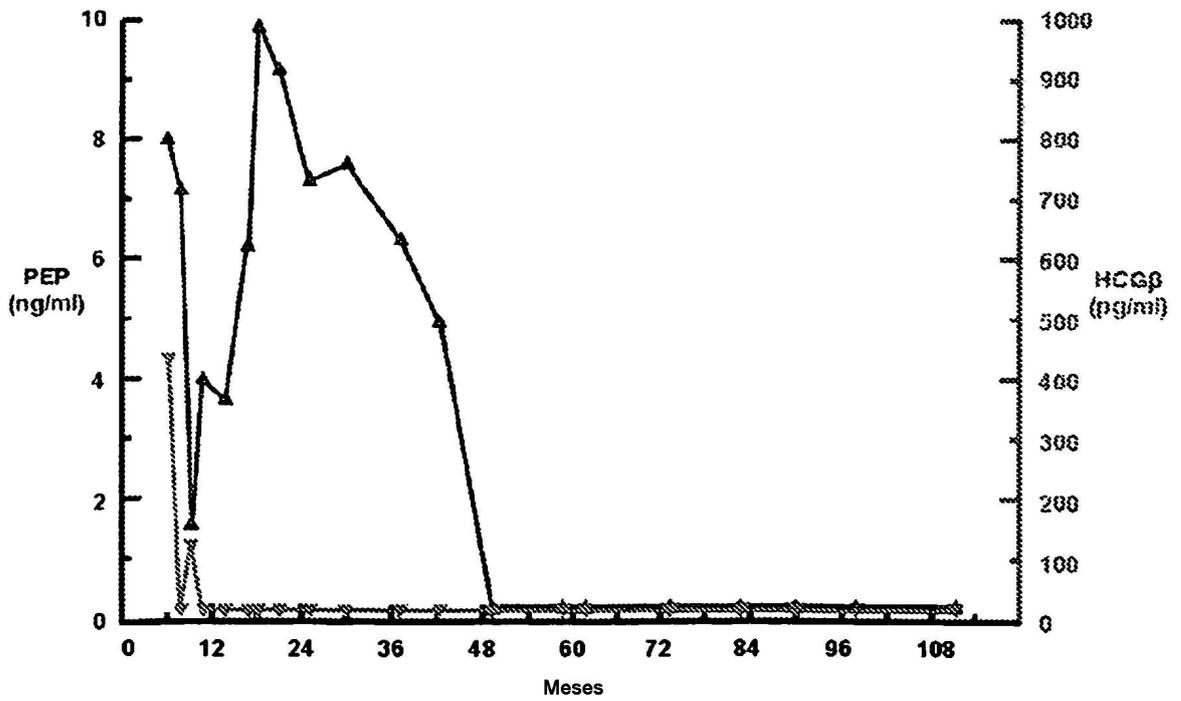
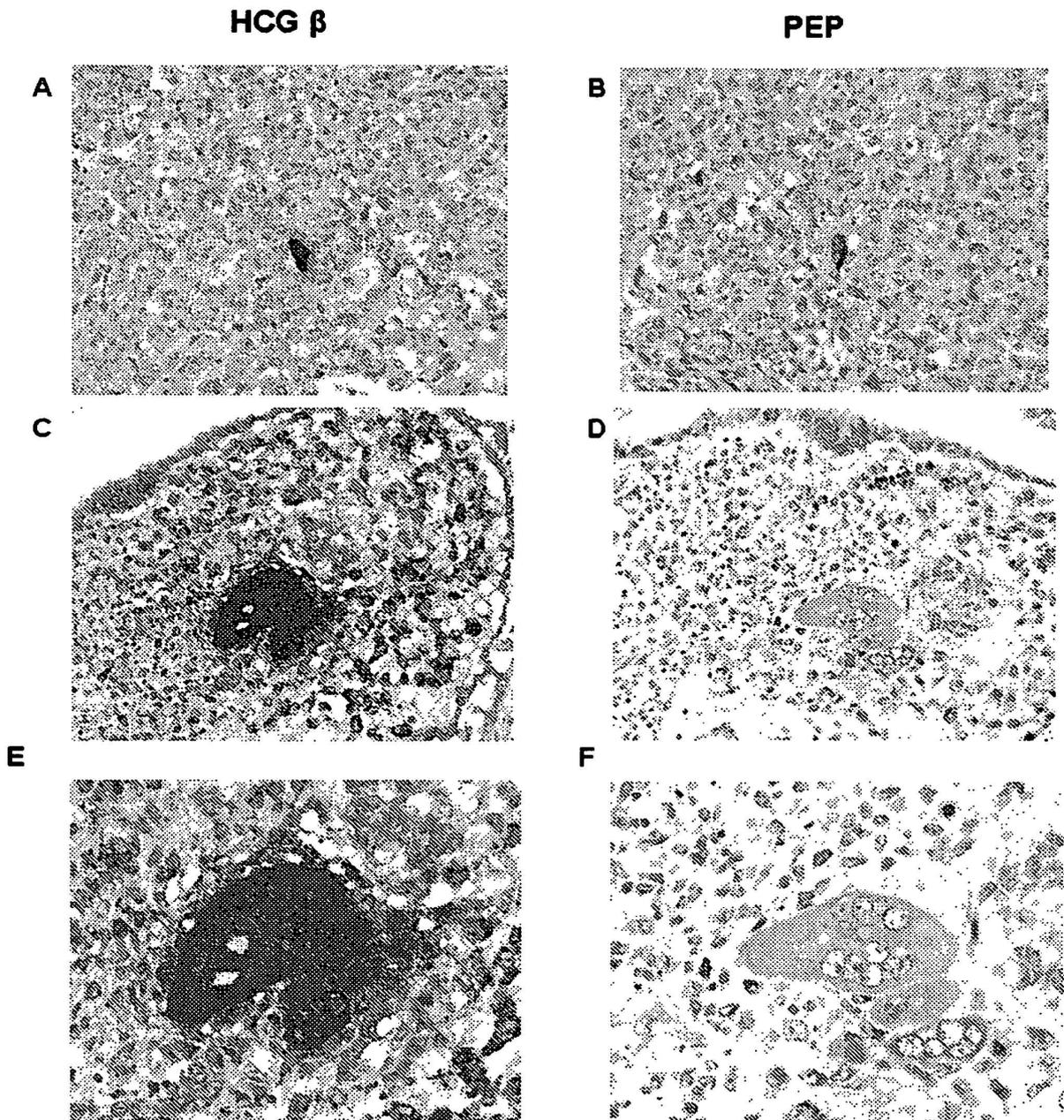


Figura 3B



**Figuras 4A-4B-4C-4D-4E-4F**