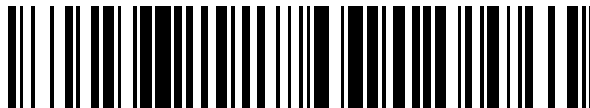


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 411 921**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/48** (2006.01)

**G01N 33/487** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2008 E 08727225 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2126577**

54 Título: **Uso de HE4 para la evaluación de cánceres de mama**

30 Prioridad:

**29.03.2007 US 908845 P**

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

**09.07.2013**

73 Titular/es:

**FUJIREBIO DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)  
201 GREAT VALLEY PARKWAY  
MALVERN, PA 19355-1307, US**

72 Inventor/es:

**ALLARD, JEFFREY, W.;  
VERCH, THORSTEN y  
GLOVER, CURTIS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 411 921 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

Uso de HE4 para la evaluación de cánceres de mama

**Antecedentes de la descripción**

5 La descripción se refiere en general al campo del diagnóstico, la clasificación, la estadificación y el pronóstico del cáncer. Más particularmente, esta descripción se refiere al campo de los cánceres de mama. Esta descripción se refiere además al campo del diagnóstico, la clasificación, la estadificación y el pronóstico usando la expresión de proteínas.

10 El cáncer incluye una amplia variedad de enfermedades, que afectan aproximadamente a uno de cada cuatro individuos en todo el mundo. La gravedad del efecto adverso del cáncer es profunda, afectando a la política y el procedimiento médicos, así como a la sociedad en general. Puesto que un distintivo de muchos tipos de cáncer es la proliferación rápida y no regulada de células malignas, un problema general en la mejora de los enfoques para el cáncer es la necesidad de detección y diagnóstico precoces. La detección precoz se considera como el mejor medio para reducir la mortalidad por cáncer. En respuesta, se han realizado numerosos intentos por desarrollar criterios precisos y fiables para diagnosticar la presencia de un estado maligno. En particular, se han dirigido investigaciones al uso de marcadores antigénicos definidos serológicamente conocidos como antígenos asociados a tumores, que o bien se expresan de forma única por células cancerosas o bien están presentes en niveles marcadamente superiores en sujetos que tienen un estado maligno.

20 Sin embargo, debido a la alta heterogeneidad de la expresión de antígenos asociados a tumores, por ejemplo la extrema diversidad de antígenos de carcinoma, existe una necesidad de marcadores tumorales adicionales que sean útiles en el diagnóstico del cáncer. Se conocen muchos anticuerpos monoclonales reactivos con antígenos asociados a carcinoma. Tales anticuerpos monoclonales se unen a una variedad de diferentes antígenos asociados a carcinoma incluyendo glicoproteínas, glicolípidos y mucinas. Muchos de tales anticuerpos monoclonales reconocen antígenos asociados a tumores que muestran expresión limitada en algunos tumores, pero no en otros, que se originan en un linaje celular o tipo tisular dados.

25 Hay relativamente pocos ejemplos de antígenos asociados a tumores que parecen ser útiles para identificar un tipo particular de tumores malignos. El anticuerpo monoclonal B72.3, por ejemplo, se une específicamente a un antígeno mucina asociado a tumor de alta masa molecular (>106 Da) que se expresa selectivamente en varios carcinomas diferentes, incluyendo la mayoría, si no todos, los carcinomas de ovario y una inmensa mayoría de carcinomas de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de colon y carcinomas de mama. No obstante, la detección de marcadores tumorales asociados a células tales como el antígeno mucina reconocido por B72.3 tras la resección quirúrgica de un tumor puede ser de utilidad limitada para el examen de diagnóstico, prefiriéndose la detección precoz de un estado maligno antes de la acumulación de una masa tumoral sustancial.

35 Una alternativa al diagnóstico de un tipo particular de cáncer mediante el examen de muestras resecadas quirúrgicamente para antígenos asociados a tumores, donde la cirugía invasiva habitualmente está indicada sólo tras la detección de una masa tumoral acumulada, sería proporcionar composiciones y métodos para detectar tales antígenos en muestras obtenidas de sujetos mediante procedimientos no invasivos o mínimamente invasivos. En el carcinoma de ovario, endometrio y otros, por ejemplo, hay actualmente varios antígenos solubles asociados a tumores que pueden detectarse en muestras de fluidos biológicos obtenidos fácilmente tales como suero o secreciones mucosas. Uno de tales marcadores es CA125, un antígeno asociado a carcinoma que también se transfiere al torrente sanguíneo, donde puede detectarse en suero (por ejemplo, Bast *et al.*, 1983 N. Eng. J. Med. 309:883; Lloyd *et al.*, 1997 Int. J. Canc. 71:842). Se han medido los niveles de CA125 en suero y otros fluidos biológicos junto con los niveles de otros marcadores, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC), antígeno específico polipeptídico tisular (TPS), sialil-TN mucina (STN) y fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), en un esfuerzo por proporcionar perfiles de diagnóstico y/o pronóstico de carcinomas de ovario, endometrio y otros (por ejemplo, Sarandakou *et al.*, 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou *et al.*, 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier *et al.*, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2945; Kudoh *et al.*, 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind *et al.*, 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell *et al.* 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi *et al.*, 1997 Tumori 83:594; Meier *et al.* 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2949; Meier *et al.*, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):3019).

50 Sin embargo, niveles elevados de CA125 en suero solo o en combinación con otros indicadores conocidos, no proporcionan un diagnóstico definitivo de tumores malignos, o de un tumor maligno particular tal como carcinoma de mama. Por ejemplo, CA125, CEA y SCC elevados en fluido vaginal y suero se correlacionan de la manera más estrecha con inflamación en enfermedades ginecológicas benignas, en relación con cáncer de cuello uterino y cánceres del aparato genital (por ejemplo, Moore *et al.*, 1998 Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 6: 182; Sarandakou *et al.*, 1997 Acta Oncol. 36:755). CA125 elevado en suero también puede acompañar a neuroblastoma, y niveles elevados de CEA y SCC pueden acompañar al cáncer colorrectal. Otro marcador, el antígeno de diferenciación mesotelina, se expresa en las superficies de células mesoteliales normales y también en determinadas células cancerosas, incluyendo tumores de ovario epiteliales y mesoteliomas. Se conocen en la técnica composiciones y métodos relacionados con mesotelina (Chang *et al.*, 1992 Canc. Res. 52: 181; Chang *et al.*, 1992 Int. J. Canc. 50:373; Chang

5 *et al.*, 1992 Int. J. Canc. 51:548; Chang *et al.*, 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:136; Chowdhury *et al.*, 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:669; Yamaguchi *et al.*, 1994 J. Biol. Chem. 269: 805; Kojima *et al.*, 1995 J. Biol. Chem. 270:21984) y el antígeno relacionado con mesotelina estructuralmente relacionado (MRA; véase, por ejemplo, Scholler *et al.*, 1999 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:11531), incluyendo sus usos en la detección y terapias de cáncer tal como se describe en el documento WO 00/50900 y en la solicitud estadounidense con n.º de serie 09/513.597. Existe una necesidad apremiante de marcadores adicionales útiles en el examen de diagnóstico con múltiples marcadores.

### Sumario de la descripción

10 El contenido de esta invención incluye un método de evaluación de si un paciente está aquejado de un cáncer de mama tal como se expone mediante la reivindicación 1. La expresión elevada de HE4 es una indicación de que el paciente está aquejado de un cáncer de mama. Si se desea, puede compararse el nivel de expresión de HE4 con un valor de referencia, tal como un valor de referencia que corresponde a la expresión de HE4 en pacientes que no están aquejados de un cáncer de mama. Alternativamente, puede compararse la expresión de HE4 en la muestra con la expresión de HE4 en una muestra anterior obtenida del paciente en un momento anterior. También pueden evaluarse uno o más marcadores adicionales correspondientes a la aparición de un cáncer de mama.

### Breve resumen de las diversas figuras

La figura 1 es un resumen del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la curva de ROC (característica operativa del receptor) obtenidos en los experimentos descritos en el presente documento en el ejemplo 1.

20 La figura 2 es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de la proteína HE4a, tal como se da a conocer (como cada una de las SEQ ID NO: 11 y 13) en la patente estadounidense 7.270.960, que también da a conocer dos secuencias de ADNc que se producen de manera natural que corresponden a esta proteína.

La figura 3 es la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de la proteína HE4, tal como dedujeron Kirchhoff *et al.*, 1991, Biol. Reprod. 45:350-357.

### Descripción detallada

25 La invención se refiere al descubrimiento de que el antígeno HE4 es un indicador de la existencia de cánceres de mama.

30 El contenido de esta descripción se refiere en general a la evaluación del cáncer de mama en mujeres usando el marcador HE4 o una combinación de HE4 y otros marcadores biológicos. La evaluación de HE4 con uno o más marcadores adicionales de cánceres de mama puede usarse para diagnosticar la aparición de tales cánceres en un paciente humano y para evaluar la respuesta de tales cánceres a tratamientos de diversos tipos. Además, la evaluación de estos marcadores puede usarse para monitorizar la recidiva de tales cánceres en un paciente o para evaluar la posibilidad de que un paciente desarrolle tales cánceres. Puede usarse cualquier marcador conocido de cáncer de mama como marcador secundario.

### Definiciones

35 Tal como se usa en el presente documento, mediante el término una "muestra" se quiere decir material que puede relacionarse específicamente con un paciente y a partir del cual puede determinarse, calcularse o deducirse información específica sobre el paciente. Una muestra puede estar compuesta en su totalidad o en parte por material biológico del paciente (por ejemplo, una muestra de tejido sólido obtenida de una biopsia de mama de una mujer). Una muestra también puede ser material que ha entrado en contacto con el paciente de forma que permite que se realicen pruebas en la muestra que proporcionan información sobre el paciente (por ejemplo, un fluido de lavado ductal). Una muestra también puede ser un primer material que ha entrado en contacto con un segundo material que no es del paciente pero que permite que el primer material se someta a prueba entonces para determinar información sobre el paciente (por ejemplo, la primera muestra puede ser un lavado de una sonda, bisturí o aguja de biopsia que ha entrado en contacto con un tejido de una mujer). Una muestra puede entrar en contacto con fuentes de material biológico distintas a las del paciente siempre que un experto en la técnica pueda determinar no obstante información sobre el paciente a partir de la muestra. También se entiende que puede utilizarse información o material extraño que no es la muestra para asociar de manera concluyente el paciente a la muestra. Para un ejemplo no limitativo, una prueba doble ciego requiere un diagrama o base de datos para hacer corresponder una muestra con un paciente.

50 Tal como se usa en el presente documento, mediante el término "paciente" se quiere decir un organismo que es el sujeto de un ensayo para determinar información sobre el organismo. Aunque en la mayoría de las realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, el paciente es un ser humano y una mujer, los métodos no se limitan a su uso con un ser humano individual, hombre o mujer. La muestra usada en el presente documento puede obtenerse de un grupo de seres humanos (es decir, sin identificar a un ser humano individual). La muestra también puede corresponder a una parte de un ser humano, tal como un tejido de mama. Para ejemplos no limitativos de esta realización, la muestra puede ser una muestra de tejido no asociada a un cuerpo humano o una

línea celular transformada.

Tal como se usa en el presente documento, el término “valor de referencia” quiere decir un valor que se correlaciona estadísticamente con un desenlace particular cuando se compara con un resultado de ensayo. En algunas realizaciones, el valor de referencia se determina a partir de la revisión estadística de estudios que comparan la expresión de HE4a con desenlaces clínicos conocidos. Algunos de tales estudios se presentan en la sección de Ejemplos en el presente documento. Sin embargo, también pueden usarse estudios de la bibliografía y la experiencia de los usuarios de los métodos dados a conocer en el presente documento para producir o ajustar un valor de referencia. Los valores de referencia también pueden determinarse a partir de la consideración de casos y resultados que son particularmente relevantes para la historia clínica, la genética, la edad y otros factores del paciente.

Tal como se usa en el presente documento, mediante el término “fluido corporal” se quiere decir un material obtenido de un ser humano que es sustancialmente de consistencia fluida, pero que puede tener materia sólida o particulada asociada con él. Un fluido corporal también puede contener material y partes que no son del paciente. Por ejemplo, un fluido corporal puede estar diluido con agua o puede contener un conservante, tal como EDTA. Los ejemplos no limitativos de fluidos corporales incluyen sangre y suero. Asimismo, pueden usarse secreciones de mama, leche materna, fluido de lavado ductal y fluido aspirado de pezón como la muestra en los métodos dados a conocer en el presente documento. En vista del hecho de que los cánceres de mama pueden metastatizar o diseminarse de otro modo a otras regiones del cuerpo, pueden usarse como muestras fluidos corporales adicionales tales como orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, fluidos serosos, plasma, linfa, secreciones mucosas de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, lágrimas y fluidos ascíticos tales como los asociados a tumores no sólidos. Los ejemplos adicionales incluyen fluidos de las cavidades pleural, pericárdica, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales, y similares. Los fluidos biológicos pueden incluir además disoluciones líquidas que han entrado en contacto con un sujeto o una fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo de células y órganos incluyendo medio condicionado de células u órganos, fluidos de lavado y similares.

Una muestra se obtiene de un paciente “durante el tratamiento” si la muestra se obtiene antes de la administración, en el momento de la administración o tras la administración de una composición o método terapéutico o durante el periodo de seguimiento que se produce después. El uso de este término engloba explícitamente situaciones en las que se obtienen muestras antes y tras la administración del tratamiento (es decir, para evaluar la eficacia del tratamiento o la recidiva), así como situaciones en las que se toman múltiples muestras de manera intermitente durante un transcurso prolongado de tratamiento.

#### Descripción detallada

Los métodos dados a conocer en el presente documento están relacionados con HE4, un miembro de la familia de proteínas con “núcleo de cuatro enlaces disulfuro” tal como se describe en el presente documento. La familia de proteínas con “núcleo de cuatro enlaces disulfuro” comprende un grupo heterogéneo de moléculas pequeñas termoestables y estables en medio ácido de función divergente y que incluyen la proteína epididimaria humana con cuatro enlaces disulfuro, o “HE4” (Kirchhoff *et al.*, 1991 Biol. Reprod. 45:350-357; Wang *et al.*, 1999 Gene 229:101; Schummer *et al.*, 1999 Gene 238:375).

El ADNc de HE4 se aisló por primera vez de epidídimo humano (Kirchhoff *et al.*, 1991 Biol. Reprod. 45:350-357) y el ADNc de HE4 se detectó posteriormente con alta frecuencia en bibliotecas de ADNc construidas a partir de carcinomas de ovario (Wang *et al.*, 1999 Gene 229:101; Schummer *et al.*, 1999 Gene 238:375). La secuencia corregida de HE4a se dio a conocer en Hellstrom *et al.*, 2003, Canc. Res. 63:3695-3700 y en la patente estadounidense 7.270.960, que se incorporan al presente documento como referencia. HE4a muestra una secuencia de aminoácidos que es altamente similar a, pero distinta de, la secuencia deducida de la molécula que se denominó HE4 en publicaciones anteriores.

Para los fines de esta descripción, la detección de o bien HE4 o bien HE4a se consideran sinónimos y se denominan de manera sinónima en el presente documento “HE4”. Las secuencias de aminoácidos de HE4 (SEQ ID NO: 2; tal como dedujeron Kirchhoff *et al.*, 1991, Biol. Reprod. 45:350-357) y la secuencia corregida de HE4a (SEQ ID NO: 1; tal como se da a conocer en la patente estadounidense n.º 7.270.960) se muestran en las figuras 3 y 2, respectivamente.

Los métodos dados a conocer en el presente documento también están relacionados con composiciones y métodos para la detección de formas de superficie celular y/o solubles de HE4 que se producen de manera natural en sujetos, incluyendo niveles elevados de tales polipéptidos en sujetos que tienen determinados cánceres, tales como cánceres de mama. Esta descripción proporciona por tanto composiciones y métodos útiles para la detección y el diagnóstico de un estado maligno en un sujeto mediante la detección específica de tales polipéptidos HE4 de superficie celular y/o solubles.

Según los métodos dados a conocer en el presente documento, puede detectarse un polipéptido antigénico HE4 humano soluble (o polipéptido HE4) en una muestra biológica de un sujeto o una fuente biológica. Las muestras biológicas pueden proporcionarse mediante la obtención de una muestra de sangre, muestra de biopsia, explante

5 tisular, cultivo de órgano, fluido biológico o cualquier otra preparación tisular o celular de un sujeto o una fuente biológica. El sujeto o la fuente biológica puede ser un ser humano o un animal no humano, un cultivo celular primario o línea celular adaptada a cultivo incluyendo, pero sin limitarse a, líneas celulares modificadas por ingeniería genética que pueden contener secuencias de ácidos nucleicos recombinantes episómicos o integrados cromosómicamente, líneas celulares inmortalizadas o que pueden inmortalizarse, líneas celulares híbridas de células somáticas, líneas celulares diferenciadas o que pueden diferenciarse, líneas celulares transformadas y similares. En determinadas realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, puede sospecharse que el sujeto o la fuente biológica tiene o está en riesgo de tener un estado maligno, que puede ser un cáncer de mama tal como un carcinoma de mama, o puede saberse que el sujeto o la fuente biológica está libre de riesgo o presencia de tales enfermedades.

10 En algunas realizaciones, la muestra biológica incluye al menos una célula de un sujeto o una fuente biológica, y en otras realizaciones la muestra biológica es un fluido biológico que contiene otro marcador tumoral, tal como CA-125. Los fluidos biológicos normalmente son líquidos a las temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos que se producen de manera natural presentes en, retirados de, expresados o extraídos de otro modo del sujeto o la fuente biológica. Determinados fluidos biológicos se derivan de tejidos, órganos o regiones localizadas particulares y otros fluidos biológicos determinados pueden estar situados de manera más global o sistémica en un sujeto o una fuente biológica. Los ejemplos de fluidos corporales incluyen sangre y suero. Asimismo, las secreciones de mama, leche materna, fluido de lavado ductal y fluido aspirado de pezón son particularmente muy adecuados para los métodos dados a conocer en el presente documento. En determinadas circunstancias, también son adecuados fluidos corporales tales como orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, fluidos serosos, plasma, linfa, secreciones mucosas de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, lágrimas y fluidos ascíticos tales como los asociados a tumores no sólidos. Los ejemplos adicionales incluyen fluidos de las cavidades pleural, pericárdica, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales, y similares. Los fluidos biológicos pueden incluir además disoluciones líquidas que han entrado en contacto con un sujeto o una fuente biológica, por ejemplo, medio de cultivo de células y órganos incluyendo medio condicionado de células u órganos, fluidos de lavado y similares. En otras realizaciones, la muestra biológica es una disolución líquida libre de células, tal como suero y plasma sanguíneos o el sobrenadante de orina centrifugada.

15 En otras realizaciones, la muestra biológica comprende una célula intacta, y en otras realizaciones, la muestra biológica incluye un extracto celular que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para un polipéptido antigénico HE4 que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 1 ó 2 (la patente estadounidense 7.270.960 da a conocer las secuencias de ADNc correspondientes a estas secuencias polipeptídicas) o un fragmento de las mismas. Todavía en otras realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, se desea que las células se rompan o lisen física o químicamente antes de someterse a ensayo para proporcionar contenidos celulares para análisis.

20 Una "molécula que se produce de manera natural en forma soluble" en una muestra puede ser una proteína, polipéptido, péptido, aminoácido o de los mismos, soluble; un lípido, ácido graso o similares, o derivado de los mismos; un hidrato de carbono, sacárido o similares o derivado de los mismos, un ácido nucleico, nucleótido, nucleósido, purina, pirimidina o molécula relacionada o derivado de los mismos o similares; o cualquier combinación de los mismos tal como, por ejemplo, una glicoproteína, un glicolípido, una lipoproteína, un proteolípido o cualquier otra molécula biológica que sea un constituyente soluble o libre de células de una muestra biológica tal como se proporciona en el presente documento. Una "molécula que se produce de manera natural en forma soluble" se refiere adicionalmente a una molécula que está en disolución o presente en una muestra biológica, incluyendo un fluido biológico tal como se proporciona en el presente documento, y que no está unida a la superficie de una célula intacta. Por ejemplo, una molécula que se produce de manera natural en forma soluble puede incluir, pero no es necesario que se limite a, un soluto; un componente de un complejo macromolecular; un material que se transfiere, secreta o exporta desde una célula; un coloide; una micropartícula o nanopartícula u otra partícula en suspensión fina; o similares.

25 La presencia de un estado maligno en un sujeto se refiere a la presencia de células displásicas, cancerosas y/o transformadas en el sujeto, incluyendo, por ejemplo células neoplásicas, tumorales, no inhibidas por contacto o transformadas oncogénicamente, o similares. A modo de ilustración y no de limitación, en el contexto de los métodos dados a conocer en el presente documento, un estado maligno puede referirse adicionalmente a la presencia en un sujeto de células cancerosas que pueden secretar, transferir, exportar o liberar un polipéptido antigénico HE4 (o un polipéptido HE4) de tal manera que pueden detectarse niveles elevados de un polipéptido de este tipo en una muestra biológica del sujeto. En algunas realizaciones, tales células cancerosas son células epiteliales malignas tales como células de carcinoma, y en algunas realizaciones tales células cancerosas son células de mesotelioma maligno que son variantes transformadas de células mesoteliales o epiteliales de células escamosas que se encuentran, por ejemplo, revistiendo las cavidades pleural, pericárdica, peritoneal, abdominal y otras cavidades corporales.

30 Las células tumorales, cuya presencia significa la presencia de un estado maligno, pueden ser células de cáncer de mama, incluyendo células de cáncer de mama primario y metastásico. Los criterios para clasificar un tumor maligno como un cáncer de mama se conocen bien en la técnica y constituyen el establecimiento y la caracterización de líneas celulares de cáncer de mama humano a partir de tumores primarios y metastásicos.

En los ejemplos contenidos en el presente documento se proporcionan valores de referencia. Tales valores son adecuados para poner en práctica los métodos dados a conocer en el presente documento. Sin embargo, debe observarse que el uso de los métodos dados a conocer en el presente documento no se limita a esos valores de referencia o a esos datos. Los expertos en la técnica pueden obtener un valor de referencia para sus necesidades particulares. Un valor de referencia de este tipo puede obtenerse analizando la expresión de HE4 en pacientes cuando se someten a procedimientos de biopsia para obtener muestras de tejido de mama (por ejemplo, "bultos" o masas radiológicamente inusuales) que se sospecha que es maligno. Los métodos de obtención de tales valores de referencia están contenidos en el presente documento y se proporcionan en los ejemplos. Los usuarios de los métodos dados a conocer en el presente documento pueden desear obtener un valor de referencia diferente al proporcionado en el presente documento para centrarse en categorías específicas de pacientes. Se prevé que tales categorías podrían incluir la edad, los antecedentes genéticos, el riesgo de cáncer, la historia clínica, el tipo de sangre, las características físicas tales como la masa corporal y otras categorías.

Tal como se proporciona en el presente documento, el método de examen para determinar la presencia de un estado maligno en un sujeto puede emplear un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 o un anticuerpo específico para un polipéptido HE4.

Los anticuerpos que son específicos para un polipéptido antigénico HE4 (o un polipéptido HE4) se generan fácilmente como anticuerpos monoclonales o como antisueros policlonales, o pueden producirse como inmunoglobulinas (Ig) modificadas por ingeniería genética que se diseñan para que tengan propiedades deseables usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos pueden incluir IgG recombinantes, proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias derivadas de inmunoglobulinas o anticuerpos "humanizados" (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.693.762; 5.585.089; 4.816.567; 5.225.539; 5.530.101; y las referencias citadas en las mismas) que pueden usarse todos ellos para la detección de un polipéptido HE4 humano según los métodos dados a conocer en el presente documento. Tales anticuerpos pueden prepararse tal como se proporciona en el presente documento, incluyendo mediante inmunización con polipéptidos HE4 tal como se describe más adelante. Por ejemplo, tal como se proporciona en el presente documento, se dan a conocer secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos HE4, de manera que los expertos en la técnica pueden preparar esos polipéptidos de manera rutinaria para su uso como inmunógenos. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos monoclonales tales como 2H5, 3D8 y 4H4, que se describen en mayor detalle más adelante, para poner en práctica determinados métodos según los métodos dados a conocer en el presente documento.

El término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos tales como  $F(ab')_2$  y fragmentos Fab, así como cualquier pareja de unión que se produce de manera natural o producida de manera recombinante, que son moléculas que se unen específicamente al polipéptido HE4. Los anticuerpos se definen como "inmunospecíficos" o de unión específica si se unen al polipéptido HE4 con una  $K_a$  mayor que o igual a aproximadamente  $10^4 M^{-1}$ , preferiblemente mayor que o igual a aproximadamente  $10^5 M^{-1}$ , más preferiblemente mayor que o igual a aproximadamente  $10^6 M^{-1}$  y todavía más preferiblemente mayor que o igual a aproximadamente  $10^7 M^{-1}$ . Las afinidades de las parejas de unión o los anticuerpos pueden determinarse fácilmente usando técnicas convencionales, por ejemplo las descritas por Scatchard *et al.*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1949). Puede realizarse la determinación de otras proteínas como parejas de unión de un polipéptido HE4 usando cualquiera de varios métodos conocidos para identificar y obtener proteínas que interactúan específicamente con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, un sistema de examen de dos híbridos de levadura, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.283.173 y la patente estadounidense n.º 5.468.614, o equivalente. Los métodos dados a conocer en el presente documento también incluyen el uso de un polipéptido HE4 y péptidos basados en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido HE4, para preparar parejas de unión y anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido HE4.

Pueden prepararse anticuerpos en general mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En una de tales técnicas, se inyecta inicialmente un inmunógeno que comprende un polipéptido HE4, por ejemplo una célula que tiene un polipéptido HE4 en su superficie o un polipéptido HE4 aislado, en un animal adecuado (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras), preferiblemente según un esquema predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y se extrae sangre de los animales periódicamente. Entonces pueden purificarse anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido HE4 a partir de tales antisueros, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad usando el polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos HE4 o variantes de los mismos, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein (1976 Eur. J. Immunol. 6:511-519), y mejoras a la misma. Brevemente, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales que pueden producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de mesotelina de interés). Tales líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células del bazo obtenidas de un animal inmunizado tal como se describió anteriormente. Las células del bazo se immortalizan entonces mediante, por ejemplo, fusión con una pareja de fusión de célula de mieloma, tal como una que sea sinérgica con el animal inmunizado. Por ejemplo, pueden combinarse células del bazo y células de mieloma con un agente de potenciación de fusión de membrana tal

como polietilenglicol o un detergente no iónico durante algunos minutos, y luego sembrarse en placa a baja densidad sobre un medio selectivo que soporte el crecimiento de células híbridas, pero no de células de mieloma. Un ejemplo de una técnica de selección usa selección con HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Tras un tiempo suficiente, habitualmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Se seleccionan colonias individuales y se someten a prueba para determinar la actividad de unión frente al polipéptido. Son preferibles los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad. Los métodos dados a conocer en el presente documento contemplan hibridomas que generan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a polipéptidos HE4.

Pueden aislarse anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de colonias de hibridomas en crecimiento. Además, pueden emplearse diversas técnicas para potenciar el rendimiento, tales como inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón u otro huésped adecuado. Entonces pueden recogerse anticuerpos monoclonales del fluido ascítico o de la sangre. Pueden eliminarse contaminantes de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación y extracción. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse mediante cromatografía en proteína G o proteína A inmovilizada usando técnicas convencionales.

Dentro de determinadas realizaciones, pueden usarse fragmentos de unión a antígenos de anticuerpos. Tales fragmentos incluyen fragmentos Fab, que pueden prepararse usando técnicas convencionales (por ejemplo, mediante digestión con papaína produciendo fragmentos Fab y Fc). Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse mediante cromatografía de afinidad (por ejemplo, en columnas con proteína A inmovilizada) usando técnicas convencionales. Tales técnicas se conocen bien en la técnica, véase, por ejemplo, Weir, D. M., *Handbook of Experimental Immunology*, 1986, Blackwell Scientific, Boston.

Se conocen en la técnica proteínas de fusión multifuncionales que tienen afinidades de unión específicas para antígenos preseleccionados en virtud de dominios de la región V de inmunoglobulinas codificados por secuencias de ADN unidas en marco a secuencias que codifican para diversas proteínas efectoras, por ejemplo, tal como se da a conocer en el documento EP-B1-0318554, la patente estadounidense n.º 5.132.405, la patente estadounidense n.º 5.091.513 y la patente estadounidense n.º 5.476.786. Tales proteínas efectoras incluyen dominios de polipéptido que pueden usarse para detectar la unión de la proteína de fusión mediante cualquiera de una variedad de técnicas con las que estarán familiarizados los expertos en la técnica, incluyendo pero sin limitarse a, secuencia mimética de biotina (véanse, por ejemplo, Luo *et al.*, 1998 *J. Biotechnol.* 65:225 y las referencias citadas en el mismo), modificación covalente directa con un resto de marcaje detectable, unión no covalente a una molécula indicadora marcada específica, modificación enzimática de un sustrato detectable o inmovilización (covalente o no covalente) sobre un soporte en fase sólida.

También pueden generarse anticuerpos de cadena sencilla para su uso en los métodos dados a conocer en el presente documento y seleccionarse mediante un método tal como presentación en fagos (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.223.409; Schlebusch *et al.*, 1997 *Hybridoma* 16:47; y las referencias citadas en los mismos). Brevemente, en este método, se insertan secuencias de ADN en el gen III o el gen VIII de un fago filamentoso, tal como M13. Se han desarrollado varios vectores con sitios de clonación múltiple para inserción (McLafferty *et al.*, *Gene* 128:29-36, 1993; Scott y Smith, *Science* 249:386-390, 1990; Smith y Scott, *Methods Enzymol.* 217: 228-257, 1993). Las secuencias de ADN insertadas pueden generarse aleatoriamente o pueden ser variantes de un dominio de unión conocido para su unión a un polipéptido HE4. Pueden generarse fácilmente anticuerpos de cadena sencilla usando este método. En general, los insertos codifican para desde 6 hasta 20 aminoácidos. El péptido codificado por la secuencia insertada se presenta en la superficie del bacteriófago. Se seleccionan bacteriófagos que expresan un dominio de unión para un polipéptido HE4 mediante la unión a un polipéptido HE4 inmovilizado, por ejemplo un polipéptido recombinante, preparado usando métodos bien conocidos en la técnica y en el presente documento se dan a conocer secuencias codificantes de ácido nucleico. Se eliminan los fagos no unidos mediante un lavado, que normalmente contiene Tris 10 mM, EDTA 1 mM y sin sal (por ejemplo, NaCl) o con una baja concentración de sal. Se eluyen los fagos unidos con un tampón que contiene sal, por ejemplo. Se aumenta la concentración de NaCl de forma gradual hasta que se eluyen los fagos. Normalmente, los fagos que se unen con afinidad superior se liberarán mediante concentraciones de sal superiores. Los fagos eluidos se propagan en el huésped bacteriano. Pueden realizarse tandas de selección adicionales para seleccionar algunos fagos que se unen con alta afinidad. Entonces se determina la secuencia de ADN del inserto en los fagos de unión. Una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos predicha del péptido de unión, puede obtenerse péptido suficiente para su uso en el presente documento como un anticuerpo específico para un polipéptido HE4 o bien mediante medios recombinantes o bien de manera sintética. Se usan medios recombinantes cuando el anticuerpo se produce como una proteína de fusión. También puede generarse el péptido como un alineamiento en tándem de dos o más péptidos similares o diferentes, con el fin de maximizar la afinidad o la unión.

Para detectar un determinante antigénico reactivo con un anticuerpo específico para un polipéptido HE4, el reactivo de detección normalmente es un anticuerpo, que puede prepararse tal como se describe en el presente documento o mediante cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Hay una variedad de formatos de ensayo conocidos por los expertos habituales en la técnica para usar un anticuerpo para detectar un polipéptido en una muestra, incluyendo pero sin limitarse a ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión y otras técnicas, Véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory,

1988; Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston. Por ejemplo, el ensayo puede realizarse en un formato de inmunotransferencia tipo Western, en el que una preparación de proteínas a partir de la muestra biológica se somete a electroforesis en gel, se transfiere a una membrana adecuada y se permite que reaccione con el anticuerpo. Entonces puede detectarse la presencia del anticuerpo en la membrana usando un reactivo de detección adecuado, tal como se conoce bien en la técnica y se describe más adelante.

En otra realización, el ensayo implica el uso de un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido para unirse al polipéptido HE4 diana y eliminarlo del resto de la muestra. Entonces puede detectarse el polipéptido HE4 unido usando un segundo anticuerpo reactivo con un determinante antigénico de polipéptido HE4 distinto, por ejemplo, un reactivo que contiene un resto indicador detectable. Como ejemplo no limitativo, según esta realización, el anticuerpo inmovilizado y el segundo anticuerpo que reconoce determinantes antigénicos distintos pueden ser dos cualesquiera de los anticuerpos monoclonales designados como 2H5, 3D8 y 4H4 (Fujirebio Diagnostics, Inc.). Alternativamente, puede utilizarse un ensayo competitivo, en el que se marca un polipéptido HE4 con un resto indicador detectable y se permite que se una al anticuerpo específico para el polipéptido HE4 inmovilizado tras la incubación del anticuerpo inmovilizado con la muestra. El grado en que los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al anticuerpo es indicativo de la reactividad de la muestra con el anticuerpo inmovilizado, y como resultado, indicativo del nivel de HE4 en la muestra.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos habituales en la técnica al que puede unirse el anticuerpo, tal como un pocillo de prueba en una placa de microtitulación, un filtro de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una perla o un disco, tal como de vidrio, fibra de vidrio, látex o un plástico tal como poliestireno o poli(cloruro de vinilo). El anticuerpo puede inmovilizarse sobre el soporte sólido usando una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, que se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes.

En determinadas realizaciones, el ensayo para la detección del polipéptido antigénico HE4 en una muestra es un ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse poniendo en contacto en primer lugar un anticuerpo específico para el polipéptido HE4 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 2H5, 3D8 o 4H4) que se ha inmovilizado sobre un soporte sólido, normalmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra biológica, de manera que se permite que una molécula soluble que se produce de manera natural en la muestra y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con el anticuerpo, se una al anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, generalmente es suficiente un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente) para formar un complejo antígeno-anticuerpo o un complejo inmunitario. Los constituyentes no unidos de la muestra se eliminan entonces de los complejos inmunitarios inmovilizados. A continuación, se añade un segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4, en el que el sitio de combinación con antígeno del segundo anticuerpo no inhibe competitivamente la unión del sitio de combinación con antígeno del primer anticuerpo inmovilizado a un polipéptido HE4 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 2H5, 3D8 o 4H4 que no es el mismo que el anticuerpo monoclonal inmovilizado sobre el soporte sólido). El segundo anticuerpo puede marcarse de manera detectable tal como se proporciona en el presente documento, de manera que pueda detectarse directamente. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede detectarse indirectamente a través del uso de un anti-anticuerpo secundario marcado de manera detectable (o "segunda fase"), o mediante el uso de un reactivo de detección específico tal como se proporciona en el presente documento. Los métodos dados a conocer en el presente documento no se limitan a ningún procedimiento de detección particular, ya que los familiarizados con inmunoensayos apreciarán que existen numerosos reactivos y configuraciones para detectar de manera inmunológica un antígeno particular (por ejemplo, un polipéptido de mesotelina) en un inmunoensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos.

En determinadas realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento usando en ensayo de tipo sándwich de dos anticuerpos descrito anteriormente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal. Podría usarse cualquier combinación de anticuerpos no competitivos frente a HE4 con los métodos dados a conocer en el presente documento, incluyendo anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y combinaciones de los mismos. En otras realizaciones determinadas de los métodos dados a conocer en el presente documento, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal. En otras realizaciones determinadas de los métodos dados a conocer en el presente documento, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, en estas realizaciones debe observarse que los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4 tal como se proporcionan en el presente documento reconocen determinantes antigénicos distintos y no competitivos (por ejemplo, epítopos) en los polipéptidos HE4, de manera que puede emplearse cualquier combinación por parejas de estos anticuerpos monoclonales. En otras realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 y/o el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 pueden ser cualquiera de los tipos de anticuerpos conocidos en la técnica y a los que se hace referencia en el presente



documento, por ejemplo a modo de ilustración y no de limitación, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, proteínas de fusión con la región V de inmunoglobulinas o anticuerpos de cadena sencilla. Los familiarizados con la técnica apreciarán que los métodos dados a conocer en el presente documento engloban el uso de otras formas de anticuerpo, fragmentos, derivados y similares en los métodos dados a conocer y reivindicados en el presente documento.

En determinadas realizaciones, el segundo anticuerpo puede contener un marcador o resto indicador detectable tal como una enzima, colorante, radionúclido, grupo luminiscente, grupo fluorescente o biotina, o similares. Podría usarse cualquier marcador o resto indicador con los métodos dados a conocer en el presente documento siempre que la señal del mismo esté directamente relacionada o sea proporcional a la cantidad de anticuerpo que permanece sobre el soporte tras el lavado. La cantidad del segundo anticuerpo que permanece unido al soporte sólido se determina entonces usando un método apropiado para el marcador o resto indicador detectable específico. Para grupos radiactivos, en general son apropiados métodos de recuento por centelleo o autorradiográficos. Pueden prepararse conjugados anticuerpo-enzima usando una variedad de técnicas de acoplamiento (para revisión véase, por ejemplo, Scouten, W. H., *Methods in Enzymology* 135: 30-65, 1987). Pueden usarse métodos espectroscópicos para detectar colorantes (incluyendo, por ejemplo, productos colorimétricos de reacciones enzimáticas), grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. Puede detectarse biotina usando avidina o estreptavidina, acoplada a un grupo indicador diferente (normalmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores enzimáticos pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido por análisis espectroscópico, espectrofotométrico u otro de los productos de reacción. Pueden usarse patrones y adiciones de patrón para determinar el nivel de antígeno en una muestra, usando técnicas bien conocidas.

En otra realización, los métodos dados a conocer en el presente documento contemplan el uso de un polipéptido antigénico HE4 tal como se proporciona en el presente documento para examinar la presencia de un estado maligno mediante la detección de anticuerpos reactivos inmunoespecíficamente en una muestra biológica de una fuente biológica o un sujeto. Según esta realización, se marca de manera detectable un polipéptido antigénico HE4 (o un fragmento o variante del mismo que incluye un polipéptido antigénico HE4 truncado tal como se proporciona en el presente documento) y se pone en contacto con una muestra biológica para detectar la unión al polipéptido antigénico HE4 de un anticuerpo que se produce de manera natural en forma soluble en la muestra. Por ejemplo, el polipéptido antigénico HE4 puede marcarse de manera biosintética mediante el uso de las secuencias dadas a conocer en el presente documento conjuntamente con métodos bien conocidos tales como la incorporación durante la traducción *in vitro* de un aminoácido fácilmente detectable (por ejemplo marcado radiactivamente), o mediante el uso de otros restos indicadores detectables tales como los descritos anteriormente. Sin querer restringirse a la teoría, esta realización de los métodos dados a conocer en el presente documento contempla que determinados polipéptidos HE4 tales como los polipéptidos de fusión de HE4 dados a conocer en el presente documento, pueden proporcionar péptidos que son particularmente inmunogénicos y por tanto dan lugar a anticuerpos específicos y detectables. Por ejemplo, según esta teoría, determinados polipéptidos de fusión de HE4 pueden representar antígenos "no autoantígenos" que provocan una respuesta inmunitaria intensa, mientras que el sistema inmunitario puede considerar a los polipéptidos HE4 que carecen de dominios de fusión como más parecidos a "autoantígenos" que no provocan fácilmente inmunidad humoral o mediada por células.

Tal como se observó anteriormente, los métodos dados a conocer en el presente documento están relacionados en parte con el hallazgo sorprendente de que se producen formas solubles de los polipéptidos antigénicos HE4 de manera natural en los sujetos, incluyendo niveles elevados de tales polipéptidos HE4 solubles en pacientes aquejados de cáncer de mama.

Un método de examen para determinar la presencia de un cáncer de mama según los métodos dados a conocer en el presente documento puede potenciarse adicionalmente mediante la detección de más de un marcador asociado a tumor en una muestra biológica de un sujeto. Por consiguiente, determinadas realizaciones de los métodos dados a conocer en el presente documento proporcionan un método de examen que, además de detectar la reactividad de un componente de muestra soluble que se produce de manera natural con un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4, también incluye la detección de al menos un marcador soluble adicional de un estado maligno usando métodos establecidos tal como se conoce en la técnica y proporcionados en el presente documento. Estos antígenos asociados a tumores solubles adicionales pueden incluir, pero sin limitarse a, mesotelina y antígeno relacionado con mesotelina, CEA, CA125, sialil-TN, SCC, TPS y PLAP, (véanse por ejemplo, Bast *et al.*, 1983 N. Eng. J. Med. 309:883; Lloyd *et al.*, 1997 Int. J. Canc. 71:842; Sarandakou *et al.*, 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou *et al.*, 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier *et al.*, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2945; Kudoh *et al.*, 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind *et al.*, 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell *et al.* 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi *et al.*, 1997 Tumori 83:594; Meier *et al.* 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2949; Meier *et al.*, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):3019) y pueden incluir adicionalmente cualquier marcador conocido cuya presencia en una muestra biológica puede correlacionarse con la presencia de un tumor de mama, tal como se proporciona en el presente documento.

Alternativamente, pueden detectarse secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos HE4, usando técnicas convencionales de hibridación y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los expertos habituales en la técnica pueden diseñar sondas y cebadores adecuados basándose en secuencias de ADNc de HE4

proporcionadas en el presente documento. En general pueden realizarse ensayos usando cualquiera de una variedad de muestras obtenidas de una fuente biológica, tal como células eucariotas, bacterias, virus, extractos preparados a partir de tales organismos y fluidos que se encuentran dentro de organismos vivos.

**Ejemplos**

5 Métodos generales

Las técnicas convencionales de ADN recombinante y clonación molecular usadas en los ejemplos se conocen bien en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989) (Maniatis) y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan y L. W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) y por Ausubel, F. M. *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

10

El significado de las abreviaturas es el siguiente: “h” significa hora(s), “min.” significa minuto(s), “s” significa segundo(s), “d” significa día(s), “ml” significa mililitros, “L” significa litros, “U” significa unidades, “pM” significa picomolar, “ROC” significa característica operativa del receptor, “AUC” significa área bajo la curva, “StDev” significa desviación estándar, “Mín” significa mínimo “Máx” significa máximo y “p” significa valor de p.

15

El contenido de esta descripción se describe ahora con referencia los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan únicamente con el fin de ilustración y el contenido no se limita a estos ejemplos, sino que más bien engloba todas las variaciones que son evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en el presente documento.

20 Ejemplo 1

Utilidad del marcador tumoral sérico HE4 en pacientes con cáncer de mama.

Se compararon las concentraciones de HE4 en suero de pacientes con cáncer de mama con los de pacientes control sanos. Los resultados se muestran en la figura 1. La siguiente tabla representa un análisis de curva de ROC de los datos de HE4 mostrados en la figura 1, que compara pacientes sanos con pacientes con cáncer de mama.

Curva	Área	EE	p	IC del 95 del área	Estado = cáncer de mama
HE4 (pM)	0,750	0,0251	<0,0001	De 0,701 a 0,800	Tiene valores superiores

25

El análisis de los datos demuestra que la expresión de HE4 en suero está elevada en aproximadamente el 32% de los cánceres de mama (especificidad del 95%). Un análisis de curva de ROC dio como resultado un área bajo la curva AUC = 0,75, lo que demuestra que puede usarse la medición de las concentraciones de HE4 en suero y otros fluidos para diferenciar pacientes sanos de pacientes aquejados de cáncer de mama.

30

**REIVINDICACIONES**

1. Método de evaluación de si un paciente está aquejado de un cáncer de mama, comprendiendo el método evaluar la expresión de HE4 en una muestra de sangre o suero obtenida del paciente, en el que la expresión elevada de HE4 es una indicación de que el paciente está aquejado de cáncer de mama.
- 5 2. Método según la reivindicación 1, en el que la expresión de HE4 en la muestra se compara con un valor de referencia.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el valor de referencia corresponde a la expresión de HE4 en pacientes que no están aquejados de cáncer de mama.
- 10 4. Método según la reivindicación 1, en el que la expresión de HE4 en la muestra se compara con la expresión de HE4 en una muestra de sangre o suero obtenida del paciente en un momento anterior.
5. Método según la reivindicación 1, que comprende además evaluar la expresión de un segundo marcador de cáncer de mama en la muestra, en el que la expresión elevada del segundo marcador de cáncer de mama es una indicación adicional de que el paciente está aquejado de cáncer de mama.
- 15 6. Método según la reivindicación 5, en el que el segundo marcador de cáncer de mama es mesotelina, antígeno relacionado con mesotelina, CEA, CA125, sialil-TN, SCC, TPS o PLAP.
7. Método según la reivindicación 1, en el que la expresión de HE4 en la muestra se compara con un valor de referencia obtenido de una categoría específica de pacientes, en el que la categoría es edad, antecedentes genéticos, riesgo de cáncer, historia clínica o tipo de sangre.

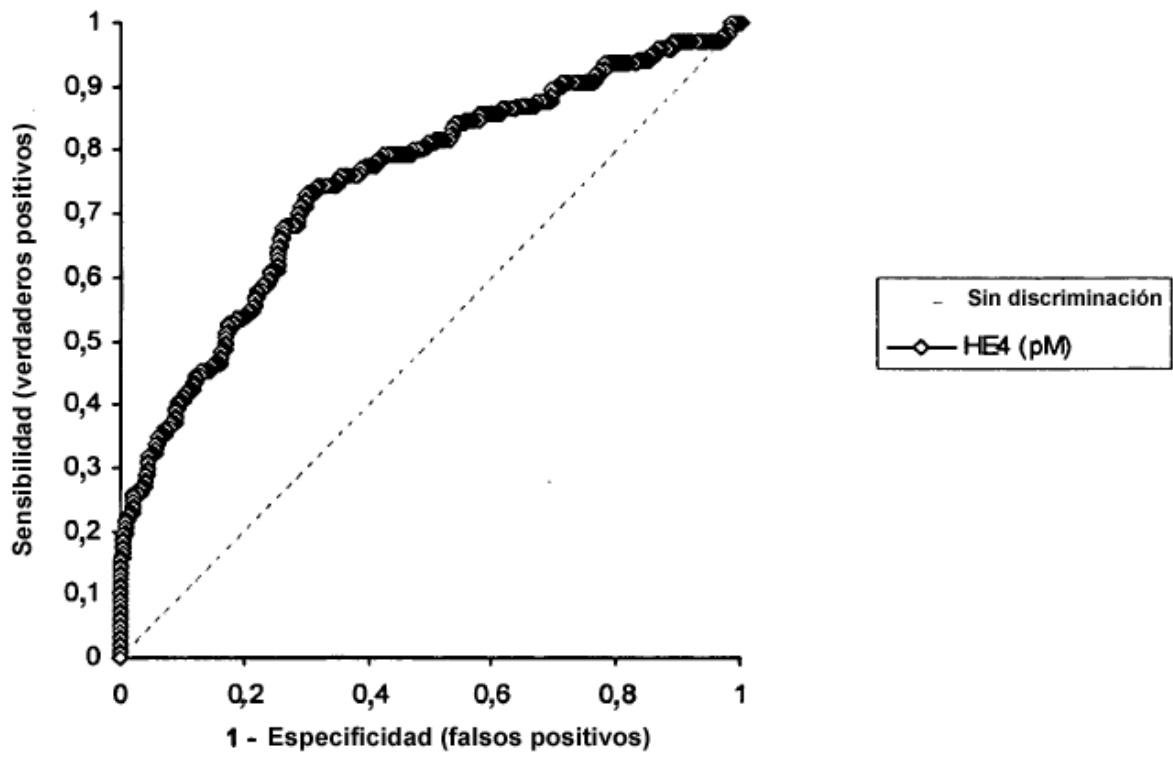


Figura 1

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys  
 20 25 30  
 Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu  
 35 40 45  
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala  
 50 55 60  
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln  
 85 90 95  
 Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn  
 100 105 110  
 Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe  
 115 120

Figura 2

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys  
 20 25 30  
 Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu  
 35 40 45  
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala  
 50 55 60  
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Leu Leu Cys Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser  
 65 70 75 80  
 Cys Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp  
 85 90 95  
 Gln Cys Gln Val Asp Thr Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg  
 100 105 110  
 Asn Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe  
 115 120 125

Figura 3