

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 434 017**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2010** **E 10705113 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013** **EP 2401621**

54 Título: **Utilización del s-ErbB-3 como marcador de cáncer**

30 Prioridad:

24.02.2009 EP 09002586

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

13.12.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

RUTZ, SANDRA;
ECKERT, BERNHARD y
HEISS, PETER

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 434 017 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

Utilización del s-ErbB-3 como marcador de cáncer

- 5 La presente invención hace referencia a un método para facilitar la evaluación del cáncer. Este método describe la utilización del s-ErbB-3 como marcador universal de diferentes tipos de cáncer. La medición del s-ErbB-3 se puede utilizar, por ejemplo, en la detección o el diagnóstico precoz de cáncer, o en la vigilancia de los pacientes sometidos a cirugía.
- 10 El cáncer sigue siendo un gran problema principal de salud pública pese al progreso en su detección y terapéutica. Las células cancerosas se caracterizan por la producción de marcadores proteicos asociados al cáncer. Las proteínas asociadas al cáncer se encuentran tanto en los tejidos como en los fluidos corporales de un individuo que presenta células cancerosas. Habitualmente, sus niveles son bajos en estadios precoces del progreso carcinogénico y aumentan durante la progresión de la enfermedad, y sólo en los casos raros se observa un descenso del nivel de las proteínas con el curso de la progresión de la enfermedad. La detección sensible de estas proteínas es un enfoque ventajoso y prometedor para el diagnóstico del cáncer, en particular en el diagnóstico del cáncer en estadio precoz. Los tipos más prevalentes de cáncer son el cáncer de mama (BC), el cáncer de pulmón (LC) y el cáncer colorrectal (CRC).
- 15 Los enfoques terapéuticos más importantes para los tumores sólidos son:
- a) la resección quirúrgica del tumor,
 - b) la quimioterapia,
 - c) la radioterapia,
 - 25 d) el tratamiento con fármacos biológicos, como anticuerpos antitumorales o anticuerpos antiangiogénicos y
 - e) una combinación de los métodos anteriores.

Globalmente, se acepta la resección quirúrgica de los tumores como tratamiento de primera línea en los tumores sólidos en estadio precoz. Sin embargo, la mayoría de los cánceres sólo se detectan cuando se vuelven sintomáticos, es decir cuando los pacientes se presentan en un estadio bastante avanzado de la progresión de la enfermedad.

La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión y gravedad. Ésta agrupa a los pacientes con cáncer para que se puedan hacer generalizaciones sobre su pronóstico y la elección de terapia.

Los diferentes estadios del BC o CRC solían clasificarse según los estadios de Dukes, que van de A a D. Hoy en día, el sistema TNM es la clasificación más ampliamente utilizada de la extensión anatómica del cáncer. Ésta representa un sistema de estadificación uniforme y aceptado a nivel internacional. Incluye tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estado de los ganglios linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis a distancia). Los criterios del TNM se publican en la UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (editores): TNM Classification of Malignant Tumors, sexta edición, 2002). Una vez se determina el estadio, los pacientes se agrupan en estadios de enfermedad denominados con números romanos que van del I al IV, y IV es el estadio de enfermedad más avanzado. La estadificación TNM y los estadios de enfermedad de la UICC se corresponden entre sí tal y como se muestra en la siguiente tabla tomada de Sobin L.H. y Wittekind (editores) supra.

Interrelación de la estadificación TNM con los estadios de enfermedad de la UICC

Estadio de enfermedad de la UICC	Estadificación T	Estadificación N	Estadificación M
Estadio 0	T _{is}	N0	M0
Estadio I	T1, T2	N0	M0
Estadio IIA	T3	N0	M0
Estadio IIB	T4	N0	M0
Estadio IIIA	T1, T2	N1	M0
Estadio IIIB	T3, T4	N1	M0
Estadio IIIC	Cualquier T	N2	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Lo que es especialmente importante es que el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del BC o CRC se traduce en un pronóstico mucho mejor. Los tumores malignos del CRC se producen sobre un tumor benigno, es decir un adenoma. Por consiguiente, los pacientes diagnosticados en el estadio de adenoma tienen un mejor pronóstico. Los pacientes diagnosticados en estadios tan precoces como T_{is}, N0, M0 o T1-3; N0; M0, si se tratan de manera adecuada, tienen más de un 90% de posibilidades de supervivencia a los 5 años del diagnóstico, en comparación a

la tasa de supervivencia a los 5 años de tan sólo el 10% que presentan los pacientes diagnosticados cuando ya se presentan metástasis a distancia.

En teoría, los métodos de detección actuales que incluyen métodos por imagen, tales como las imágenes de rayos X o de resonancia magnética, pueden ser apropiados, al menos parcialmente, como herramienta de cribado general. No obstante, sus costes son elevados y los sistemas de salud no pueden permitirse una utilización general y extendida de estos en el cribado en masa de grandes cantidades de sujetos, particularmente en sujetos que no presentan síntomas tumorales.

Por consiguiente, uno de los objetivos de la presente invención es la proporción de un procedimiento simple y eficiente en cuanto a los costes para la evaluación de tumores, por ejemplo para identificar individuos que sean sospechosos de padecer cáncer. Para este fin, sería deseable un marcador tumoral general que fuese detectable en los fluidos corporales, por ejemplo la sangre, el suero o el plasma, o un panel de tales marcadores.

Varios marcadores tumorales séricos ya se utilizan en la clínica. Por ejemplo, el fragmento soluble de 30 kDa de la citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembrionario (CEA), la enolasa neuroespecífica (NSE), y el antígeno de carcinoma de célula escamosa (SCC) son los marcadores de LC más prominentes. No obstante, ninguno de ellos cumple los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para una herramienta de cribado (Thomas, L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/ Main, Alemania (2000)).

Para que tenga utilidad clínica, un nuevo marcador diagnóstico como marcador único debería poder compararse o ser mejor que otros marcadores conocidos en la materia. Por otro lado, un nuevo marcador debería conducir a un progreso en la sensibilidad y/o especificidad diagnósticas, ya sea utilizándose sólo o en combinación con uno o más marcadores diferentes, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnósticas de un ensayo se evalúan de manera óptima mediante sus características operativas de receptor, que se describirán con más detalles posteriormente.

La sangre total, el suero o el plasma son las fuentes de muestra de utilización más amplia en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral precoz sería de ayuda en la detección fiable del cáncer, y la proporción de información pronóstica precoz podría conducir a un método que fuera de gran ayuda en el diagnóstico y en el manejo de esta enfermedad. Por consiguiente, existe una necesidad clínica urgente de mejorar la evaluación *in vitro* del cáncer, y en particular del BC. Es especialmente importante la mejora del diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del BC, dado que los pacientes diagnosticados precozmente presentan unas probabilidades de supervivencia mucho mayores en comparación a los que se diagnostican en un estadio avanzado de la enfermedad.

En relación al BC como problema de salud pública, es esencial que se desarrollen medidas de cribado y prevención para el BC más efectivas.

Actualmente, los procedimientos de detección más precoces disponibles para el cáncer de mama incluyen la utilización de exámenes mamarios clínicos y de mamografías. Sin embargo, debe presentarse un tamaño tumoral significativo antes de que un tumor se pueda palpar o detectar mediante una mamografía. La densidad del tejido mamario y la edad son predictores importantes de la precisión de la mamografía de cribado. La sensibilidad abarca del 63% en mujeres con mamas extremadamente densas al 87% en mujeres con mamas casi completamente compuestas por tejido graso. La sensibilidad aumenta con la edad desde el 69% en mujeres de aproximadamente 40 años hasta el 83% en mujeres de 80 años o más (Carney, P.A. et al., Ann. Intern. Med. 138 (2003) 168-175). Solamente el 20 - 25% de las anomalías detectadas mediante mamografía que se biopsian presentan malignidad. La visualización de lesiones precancerosas y cancerosas representa el mejor enfoque para la detección precoz, pero la mamografía es una prueba cara que requiere meticulosidad y experiencia tanto en su realización como en la interpretación de sus resultados (WHO, Screening for Breast Cancer, 10 de mayo del 2002; Esserman, L. et al., J. Natl. Cancer Inst. 94 (2002) 369-375).

En los últimos años, se han descrito una inmensa cantidad de los llamados genes específicos de la mama o específicos de BC. La gran mayoría de los artículos de investigación correspondientes o de las solicitudes de patente se basan en datos obtenidos mediante el análisis de los patrones de expresión de RNA en el tejido canceroso en comparación a diferentes tejidos o al tejido adyacente normal, respectivamente. Tales enfoques pueden resumirse como técnicas de presentación diferencial de mRNA.

Debe hacerse mención a la patente WO 00/60076 como ejemplo de datos disponibles a partir de las técnicas de presentación de mRNA. Esta solicitud describe y reivindica más de dos cientos polinucleóticos aislados y sus polipéptidos correspondientes, así como su utilización en la detección del BC. No obstante, es de conocimiento general que las diferencias en el nivel de mRNA no son especulares a las del nivel de las proteínas correspondientes. Una proteína codificada por un mRNA poco común puede estar en cantidades muy grandes mientras que una proteína codificada por un mRNA abundante puede ser difícil o incluso imposible de detectar (Chen, G. et al., Molecular and Cellular Proteomics 1 (2002) 304-313). Esta falta de correlación entre el nivel de mRNA y el nivel de proteína se debe a razones tales como la estabilidad del mRNA, la eficiencia de la traducción, la estabilidad de la proteína, etc.

También hay enfoques recientes que investigan las diferencias en los patrones proteicos entre diferentes tejidos o entre tejidos sanos y enfermos para identificar marcadores moleculares candidatos que puedan utilizarse en el diagnóstico del BC. Wulfkühle, J.D. et al., Cancer Research 62 (2002) 6740-6749 han identificado cincuenta y siete proteínas que se expresaron de modo diferente en el tejido con BC respecto al tejido normal adyacente. No se describen datos a partir de muestras líquidas obtenidas de un individuo.

La patente WO 02/23200 describe unos doce puntos asociados con el cáncer de mama, tal y como se observa mediante la desorción superficial reforzada por ionización láser (SELDI). Estos puntos se observan más frecuentemente en los sueros obtenidos a partir de pacientes con BC, en comparación con sueros obtenidos a partir de controles sanos. No obstante, no se conoce la identidad de la(s) molécula(s) incluida(s) en tal punto, por ejemplo sus secuencias.

El fluido aspirado del pezón (NAF) se ha utilizado durante muchos años como método no invasivo potencial para identificar marcadores específicos de cáncer de mama. Kuerer et al. compararon los fluidos aspirados de pezón de pares bilaterales apareados en mujeres con carcinoma mamario invasivo unilateral mediante electroforesis en gel 2D (Kuerer, H.M. et al., Cancer 95 (2002) 2276-2282). Se detectaron entre 30 y 202 puntos de proteínas diferentes en el NAF de las mamas que presentaban carcinoma mamario y no se detectaron en los NAF apareados de las mamas sanas. Estos puntos se detectaron mediante un análisis de imagen en gel. Pero la identidad de los puntos proteicos no se conoce.

Pese a la gran y creciente lista de proteínas marcadoras candidatas en el campo del BC, hasta la fecha no se conoce la utilidad clínica/diagnóstica de estas moléculas. Para que un nuevo marcador diagnóstico sea de utilidad clínica como marcador único, éste debería ser tan bueno como el mejor marcador único conocido en la materia. O un nuevo marcador debería conducir a un progreso en la sensibilidad y/o especificidad diagnósticas tanto si se utiliza sólo como en combinación con uno o más marcadores, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnósticas de un ensayo se evalúa mejor mediante sus características operativas de receptor, como veremos más adelante con más detalle.

Hoy en día, sólo están disponibles los ensayos diagnósticos sanguíneos basados en la detección del antígeno de cáncer 15-3 (CA 15-3), una mucina asociada a tumores, y el antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína asociada a tumores, para ayudar al diagnóstico en el campo del BC. Habitualmente, el CA 15-3 está aumentado en los pacientes con cáncer de mama avanzado. Los niveles del CA 15-3 rara vez están elevados en mujeres con estadios precoces de cáncer de mama (Duffy, M.J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262). Los cánceres de ovario, pulmón y próstata también pueden elevar los niveles del CA 15-3. Los niveles aumentados del CA 15-3 pueden asociarse a condiciones no cancerosas, tales como enfermedades mamarias u ováricas benignas, la endometriosis, la enfermedad inflamatoria pélvica y la hepatitis. El embarazo y la lactancia también pueden aumentar los niveles del CA 15-3 (National Cancer Institute, Cancer Facts, Fact Sheet 5.18 (1998) 1-5). La utilización principal del CEA es la monitorización del cáncer colorrectal, especialmente cuando la enfermedad ya ha metastatizado. No obstante, muchos cánceres pueden elevar los niveles de CEA, incluyendo el cáncer de mama.

Debido a la falta de especificidad de órgano y tumor, no se recomienda ni la medición del CA 15-3 ni la medición del CEA en el cribado del BC. Estos marcadores tumorales son herramientas diagnósticas útiles en el seguimiento de los pacientes con BC (Untch, M. et al., J. Lab. Med. 25 (2001) 343-352).

Se piensa que CYFRA 21-1 es el mejor de los marcadores tumorales que actualmente se conocen para el cáncer de pulmón. Pese a que no es específico del órgano, se encuentra predominantemente en el tejido pulmonar. Se describe que la sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón es de entre el 46 y el 61% con una especificidad del 95% frente a otras enfermedades pulmonares benignas. Los niveles séricos aumentados de CYFRA 21-1 también se asocian con enfermedades hepáticas benignas, la insuficiencia renal y el cáncer de vejiga invasivo. La evaluación de CYFRA 21-1 se recomienda en la vigilancia terapéutica postoperatoria.

El CEA pertenece al grupo de antígenos carcinofoetales que habitualmente se producen durante la embriogénesis. El CEA no es específico de órgano y se utiliza predominantemente en monitorización del cáncer colorrectal. Además de las enfermedades malignas, varias enfermedades benignas, tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis y las enfermedades autoinmunes se asocian a unos niveles séricos de CEA elevados. Con una especificidad del 95% frente a enfermedades pulmonares benignas, su sensibilidad para el cáncer de pulmón se describe entre el 29 y el 44%. La utilización principal del CEA es la monitorización del cáncer colorrectal, especialmente cuando la enfermedad ha metastatizado. No obstante, varios cánceres pueden producir niveles elevados de CEA, incluyendo el cáncer de mama. Una utilización preferible del CEA es la vigilancia terapéutica del cáncer de pulmón.

El CA 15-3 (antígeno de cáncer 15-3), una mucina asociada a tumores, está disponible como ayuda al diagnóstico en el campo del BC. Habitualmente el CA 15-3 aumenta en los pacientes con cáncer de mama avanzado. Los niveles del CA 15-3 rara vez se elevan en mujeres en estadios precoces del cáncer de mama (Duffy, M.J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262). Los cánceres de ovario, pulmón y próstata también pueden elevar los niveles del CA 15-3. Los niveles elevados del CA 15-3 se pueden asociar a condiciones no cancerosas, tales como las

enfermedades mamarias u ováricas benignas, la endometriosis, la enfermedad inflamatoria pélvica y la hepatitis. El embarazo y la lactancia también pueden elevar los niveles del CA 15-3 (National Cancer Institute, Cancer Facts, Fact Sheet 5.18 (1998) 1-5).

El CA 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9), un antígeno de Lewis (a) sialilado sobre un glucolípido es un marcador tumoral de cánceres gastrointestinales. Aparece en epitelios fetales gástricos, intestinales y pancreáticos, y también puede encontrarse a concentraciones bajas en el tejido adulto hepático, pulmonar y pancreático. No hay correlación entre la masa tumoral y los valores del ensayo del CA 19-9. Por consiguiente, la determinación del CA 19-9 no puede utilizarse en la detección precoz del carcinoma pancreático. Dado que la mucina se excreta exclusivamente a través del hígado, en algunos casos una colestasis ligera puede llevar al incremento de los niveles séricos del CA 19-9. El marcador se utiliza principalmente en la monitorización del estado de la enfermedad en aquellos pacientes con un cáncer pancreático confirmado (sensibilidad de entre 70-87%). El 3-7% de la población tiene una configuración de grupo sanguíneo Lewis a-negativo/b-negativo y no puede expresar la mucina con el determinante reactivo CA 19-9. Esto debe tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados.

ErbB-2 (HER-2) hace referencia al "receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2" y una sobreexpresión funcional del gen c-erbB-2 humano se relaciona con una agresividad mayor de los cánceres de mama. Es un miembro de la familia de proteínas ErbB, también conocida como familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (Peles, E. et al., Cell 69 (1992) 205-216). El ErbB-2 (HER-2) también se ha denominado CD340 (cúmulo de diferenciación 340) o p185. El ErbB-2 (HER-2) tiene un papel importante en la patogénesis del cáncer de mama y como diana de tratamiento. Es un receptor de tirosina quinasa unido a la superficie de la membrana celular y normalmente está involucrado en las vías de transducción de señales que llevan al crecimiento y diferenciación celular. Se cree que el ErbB-2 es un receptor huérfano y ninguna de los ligandos de la familia de EGF puede activarlo. No obstante, los receptores del ErbB dimerizan tras la unión con el ligando y ErbB-2 es el compañero de dimerización preferible de otros miembros de la familia ErbB. El gen humano del c-erbB-2 es un protooncogén localizado en el brazo largo del cromosoma humano 17 (17q11.2-q12).

En el sentido de la presente invención, el diagnóstico precoz del BC hace referencia al diagnóstico en un estado precanceroso (DCIS) o en un estadio tumoral en el que no existen metástasis (ni proximales ni distales), es decir, se presenta un estadio T_{is}, N0, M0 o T1-4; N0; M0. T_{is} hace referencia a un carcinoma in situ. En una realización preferible la detección del ErbB-3 se utiliza para diagnosticar el BC en un estadio no metastático, es decir, que el diagnóstico se lleva a cabo en un estadio T_{is}, N0, M0 o T1-3; N0; M0 (=T_{is}, -3; N0;M0).

La sangre total, el suero y el plasma son las fuentes de muestra más ampliamente utilizadas en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral precoz del BC que permita la detección fiable del cáncer o que proporcione información pronóstica precoz podría conducir a un ensayo diagnóstico que ayudase en gran medida al diagnóstico y al manejo de esta enfermedad. Así, existe una necesidad clínica urgente de mejorar el diagnóstico del BC a partir de la sangre. Es especialmente importante la mejora del diagnóstico precoz del BC, dado que la probabilidad de supervivencia de los pacientes diagnosticados precozmente son mucho mayores en comparación a la que presentan los que se diagnostican en estadios avanzados de la enfermedad.

Un objetivo de la presente invención era investigar si se puede identificar un marcador bioquímico que pueda utilizarse en la evaluación de la enfermedad del cáncer. En particular, los inventores de la presente invención investigaron si se podía identificar un marcador bioquímico para la evaluación de diferentes tipos de cáncer, tales como el cáncer de mama, el colorrectal, y/o el ovárico en muestras de tejido o en los fluidos corporales.

Sorprendentemente, se ha observado que la utilización del s-ErbB-3 como biomarcador, que incluye (i) el dominio extracelular libre de una proteína "oncogén c-erbB-3" y (ii) las isoformas de la proteína secretadas y codificadas mediante variantes de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3", puede solucionar algunos de los problemas de los marcadores que actualmente se conocen en el estado de la materia, al menos de forma parcial.

Resumen de la invención

En una realización, la presente invención hace referencia a un método para la evaluación *in vitro* del cáncer de mama que incluye la medición en una muestra de suero o plasma la concentración de (a) s-ErbB-3, (b) de manera opcional, uno o más marcador de cáncer diferentes, y (c) la utilización del resultado del paso (a), y de manera opcional del paso (b), en la evaluación del cáncer de mama, en el que una concentración aumentada del s-ErbB-3 indica la presencia de cáncer de mama.

Además, la presente invención hace referencia a la utilización de s-ErbB-3 en la evaluación del cáncer de mama en una muestra de suero o plasma.

Además, la presente invención hace referencia a la utilización de un anticuerpo dirigido contra la proteína s-ErbB-3 en la evaluación *in vitro* del cáncer de mama en una muestra de suero o plasma, en la que una concentración aumentada de s-ErbB-3 indica la presencia de cáncer de mama.

Además, la presente invención describe la utilización de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y, de manera opcional, uno o más marcador de cáncer diferentes en la evaluación *in vitro* del cáncer de mama en una muestra de suero o plasma, en la que una concentración aumentada del s-ErbB-3 indica la presencia de cáncer de mama.

Descripción detallada de la invención

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para la evaluación del cáncer de mama *in vitro* que incluye la medición de la concentración del s-ErbB-3 en una muestra de suero o plasma y la utilización de los resultados de la medición, en particular la concentración determinada en la evaluación del cáncer de mama.

Sorprendentemente, se ha observado que una concentración aumentada del s-ErbB-3 en la muestra de ensayo se asocia a la aparición de cáncer. Se puede observar que el s-ErbB-3 es un marcador no específico para un único tipo de cáncer, sino que es un marcador para diferentes tipos de cáncer, es decir, un marcador tumoral general. Dado que el s-ErbB-3 parece ser bastante específico para procesos tumorales, el novedoso marcador tumoral s-ErbB-3 tiene un gran potencial de utilidad clínica para varias clases de tipos de tumores.

Además, un método de la presente invención es adecuado para la evaluación de muchos tipos diferentes de cáncer. En comparación con controles normales, se han observado concentraciones aumentadas del s-ErbB-3 en muestras de tipos de cáncer específicos como por ejemplo el cáncer de mama, el cáncer colorrectal o el ovárico, respectivamente.

De acuerdo con una realización preferible de la invención, la concentración del s-ErbB-3 se mide en una muestra para evaluar tipos de cáncer específicos, tales como el cáncer de mama, el colorrectal y/o el ovárico *in vitro*.

De acuerdo con otra realización preferible de la invención, la concentración del s-ErbB-3 se mide en una muestra para evaluar el cáncer, tal como el cáncer de mama, el colorrectal y/o el ovárico *in vitro*.

De acuerdo con otra realización preferible de la invención, la concentración del s-ErbB-3 se mide en una muestra para evaluar el cáncer, tal como el cáncer de mama y/o el colorrectal *in vitro*.

De acuerdo con otra realización preferible de la invención, la concentración del s-ErbB-3 se mide en una muestra para evaluar el cáncer de mama *in vitro*.

Una realización de la presente invención hace referencia al cribado en masa de una población para distinguir entre los individuos que probablemente están libres de cáncer y los individuos que pueden clasificarse como casos "sospechosos". El último grupo de individuos puede someterse entonces a procedimientos diagnósticos adicionales, por ejemplo mediante métodos de imagen u otros medios adecuados.

Otra realización de la presente invención hace referencia a una mejora en los paneles de marcadores tumorales adecuados para el diagnóstico de cáncer en general o en los paneles de marcadores tumorales adecuados para el diagnóstico de un tipo de tumor específico, por ejemplo el cáncer de mama.

La presente invención también hace referencia a un método para la evaluación del cáncer *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que incluye la medición de la concentración del s-ErbB-3 y de uno o más marcadores diferentes específicos para el cáncer en una muestra, y la utilización de los resultados de la medición, en particular las concentraciones determinadas, en la evaluación del cáncer. Los marcadores preferibles para la utilización en combinación con el s-ErbB-3 son, por un lado, marcadores que son marcadores tumorales generales (es decir, marcadores no específicos para un único tipo de tumor) o, por otro lado, marcadores específicos tumorales (marcadores específicos para un único tipo de tumores). Los marcadores preferibles, por ejemplo para la evaluación del cáncer, tales como el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, son el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2 (HER-2). Estos marcadores pueden utilizarse de modo individual o en cualquier combinación junto a s-ErbB-3.

Si se evalúa el cáncer de acuerdo con este método de la invención, el o los marcadores del cáncer respectivo se selecciona(n) a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, CA 19-9 y ErbB-2.

Por consiguiente, la presente invención, en una realización preferible hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, el marcador s-ErbB-3 y, al menos, otro marcador tumoral en la evaluación del cáncer, por ejemplo el cáncer mamario, ovárico y/o colorrectal.

La presente invención también hace referencia a la utilización de un anticuerpo dirigido contra el s-ErbB-3 en la evaluación del cáncer, en la que una concentración aumentada del s-ErbB-3 indica la existencia de cáncer.

Además, la presente invención hace referencia a la utilización de un anticuerpo dirigido contra las isoformas de la

proteína secretadas y codificadas por variantes de empalme de mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano en la evaluación del cáncer, en la que una concentración aumentada de las isoformas de la proteína secretadas y codificadas por variantes de empalme de mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano indica la existencia de cáncer.

Además, la presente invención hace referencia a la utilización de un anticuerpo dirigido contra el dominio extracelular libre de una proteína "oncogén c-erbB-3" humana en la evaluación del cáncer, en la que una concentración aumentada del dominio extracelular libre de una proteína "oncogén c-erbB-3" humana indica la existencia de cáncer.

Preferiblemente, la presente invención hace referencia a un método para la evaluación *in vitro* del cáncer, tal como el cáncer de pulmón o el cáncer colorrectal, mediante marcadores bioquímicos que incluye la medición de la concentración del s-ErbB-3 y de uno o más marcadores de cáncer diferentes en una muestra, por ejemplo uno o más marcadores diferentes de cáncer de mama o colorrectal, y la utilización de los resultados de la medición, en particular las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer. Es preferible que se seleccionen uno o más marcadores diferentes a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2.

La presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye al menos el s-ErbB-3 y el CYFRA 21-1 en la evaluación del cáncer, en particular el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, y más particularmente el cáncer colorrectal.

La presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye al menos el s-ErbB-3 y el CEA en la evaluación del cáncer, en particular el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, y más particularmente el cáncer colorrectal.

La presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye al menos el s-ErbB-3 y el CA 15-3 en la evaluación del cáncer, en particular el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, y más particularmente el cáncer colorrectal.

La presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye al menos el s-ErbB-3 y el CA 19-9 en la evaluación del cáncer, en particular el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, y más particularmente el cáncer colorrectal.

La presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye al menos el s-ErbB-3 y el ErbB-2 en la evaluación del cáncer, en particular el cáncer de mama o el cáncer colorrectal, y más particularmente el cáncer colorrectal. La presente invención también hace referencia a la utilización de una proteína s-ErbB-3 en la evaluación del cáncer, en la que una concentración aumentada del s-ErbB-3 indica la existencia de cáncer.

La presente invención también hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 en la evaluación de varios tipos de cáncer específicos, en particular el cáncer mamario, colorrectal y/o ovárico.

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para la evaluación del cáncer de mama *in vitro* que incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de a) s-ErbB-3, b) de manera opcional, uno o más marcadores diferentes de cáncer, y (c) la utilización de los resultados de la medición del paso (a) y, de manera opcional, del paso (b) en la evaluación del cáncer de mama, en el que una concentración aumentada de s-ErbB-3 indica la existencia de cáncer de mama.

Preferiblemente, el término "medición" incluye una medición cualitativa, semicualitativa o cuantitativa del s-ErbB-3 en una muestra. En una realización preferible, la medición es una medición semicuantitativa, es decir, se determina si la concentración del s-ErbB-3 es superior o inferior a un valor de corte. Tal y como los expertos en la materia comprenderán, en un ensayo Sí- (presencia) o No- (ausencia), la sensibilidad del ensayo se configura para que se adecue al valor de corte. Un valor de corte puede determinarse, por ejemplo mediante la evaluación de un grupo de individuos sanos. Preferiblemente, el corte se configura para que la especificidad sea del 90%, y también es preferible que el corte se configure para que la especificidad sea del 95%, o también es preferible que el corte se configure para que la especificidad sea del 98%. Un valor superior al valor de corte puede indicar, por ejemplo, la presencia de cáncer. En particular, un valor superior al valor de corte puede indicar, por ejemplo, la presencia de cáncer de mama, colorrectal y/o ovárico. En otra realización preferible, la medición del s-ErbB-3 es una medición cuantitativa. En otras realizaciones, la concentración del s-ErbB-3 se correlaciona con una cuestión diagnóstica subyacente, como por ejemplo el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

En otra realización preferible determinada, por ejemplo en la monitorización de la terapia o el seguimiento, el valor de corte se configura para obtener una sensibilidad del 90%, también es preferible que el valor de corte se configure para obtener una sensibilidad del 95%, o también es preferible que el valor de corte se configure para obtener una sensibilidad del 98%.

Un valor inferior al valor de corte puede indicar, por ejemplo, la ausencia de cáncer. En particular, un valor inferior al valor de corte puede indicar, por ejemplo, la ausencia de cáncer de mama, colorrectal y/o ovárico.

5 En otra realización preferible, la medición del s-ErbB-3 es una medición cuantitativa. En otras realizaciones, la concentración del s-ErbB-3 se correlaciona con una cuestión diagnóstica subyacente como, por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad, o la respuesta a la terapia.

10 El ErbB-3, así como el ErbB1, el ErbB2 y el ErbB4, pertenece a la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR/ErbB).

15 Tras la unión a neuregulinas, que también se conocen como factores de diferenciación o heuregulinas, el ErbB-3 se activa mediante heterodimerización con el ErbB1, el ErbB2 o el ErbB4 (Riese, D.J. et al., Mol. Cell Biol. 15 (1995) 5770-5776). Mediante la unión al ErbB-3 o al ErbB4, la neuregulinas inducen la proliferación o diferenciación de las células epiteliales, gliales y musculares (Lee, H. et al., Oncogene 16 (1998) 3243-3252; Lee, H. et al, Cancer Res. 61 (2001) 4467-4473; Citri, A. et al., Exp. Cell Res. 284 (2003) 54-65).

20 La proteína humana ErbB-3, que también se denomina p180 ErbB-3 o "receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3", está codificada por el oncogén humano c-erbB-3. Dicha glicoproteína p180 ErbB-3 (180 kDa), codificada por la longitud total del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano, presenta un dominio extracelular (dominio de unión a ligando, ECD), un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático homólogo a las tirosina quinasas (Kraus, M.H. et al., PNAS 86 (1989) 9193-9197; Plowman, G.D. et al., PNAS 87 (1990) 4905-4909).

25 Sue-Hwa, L. et al., Clin. Cancer Res. 14 (2008) 3729-3736, observaron niveles aumentados de las formas secretadas de ErbB3 en la médula ósea y en las muestras plasmáticas de hombres con cáncer de próstata.

Siegel, P.M. et al., EMBL J. 18 (1999), 2149-2164 observaron que la expresión elevada de NEU/ErbB2 y ErbB3 están involucrada en la inducción de tumores mamarios en ratones transgénicos.

30 Los análisis de inmunoprecipitación con cultivos primarios de carcinomas ováricos humanos muestran la expresión de una proteína ErbB3 de 90kDa (Lee, H. et al., Oncogene 16 (1998) 3243-3252).

35 Por consiguiente, la patente US2008/274115 describe los métodos de detección del ErbB3 soluble y sus anticuerpos. Los autores encontraron el p85-s-ErbB3 en tejido mamario normal y en tejido de cáncer de mama, lo cual indica una expresión entre moderada y alta de s-ErbB3.

40 El término "s-ErbB-3" hace referencia a (i) el dominio extracelular libre de la proteína "oncogén c-erbB-3" humana y (ii) las isoformas secretadas de la proteína codificadas por variantes de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano.

45 Lee, H. et al., Oncogene 16 (1998) 3243-3252 han descrito cuatro nuevos transcritos del oncogén c-erbB-3 alternativos (mRNAs) aislados en la línea celular derivada del carcinoma ovárico. La expresión de estas isoformas alternativas (para más detalles, siga más abajo) se examinó mediante la utilización de un análisis Northern Blot en el que se observó la localización específica en el tejido y en la célula (Kato, M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1993) 1189-1197).

50 El dominio extracelular libre de la proteína humana p180 ErbB-3 se muestra en el Id. de Sec. N°1 (tipo salvaje). Las isoformas secretadas de la proteína que están codificadas por variantes de empalme de los mRNA derivados del "oncogén c-erbB-3" humano se muestran en el Id. de Sec. N°2 (p45 ErbB-3, isoforma R2), el Id. de Sec. N°3 (p85 ErbB-3, isoforma R31), el Id. de Sec. N°4 (p85 ErbB-3, isoforma R35) y el Id. de Sec. N°5 (isoforma R1/Variante S).

55 Los fibroblastos transfectados de manera estable muestran que esas cuatro formas truncadas son proteínas secretadas solubles. En el medio de cultivo de una línea celular primaria de ovario se detectó una isoforma de proteína ErbB-3 de 90 kDa mediante la utilización de un anticuerpo frente al dominio de unión a ligando del ErbB-3 (la isoforma de la proteína ErbB-3 de 90 kDa es una forma más glicosilada derivada de la isoforma de la proteína ErbB-3 de 85 kDa que se muestra arriba). Estudios adicionales sugieren que la isoforma secretada de la proteína p85 ErbB-3 inhibe la unión de la neuregulina con el receptor del ErbB-3, lo cual resulta en la neutralización del ligando endógeno. En conjunto, estas observaciones sugieren que la isoforma de la proteína p85 ErbB-3 es un regulador negativo natural de la transducción de señales estimulada por HRG. Recientemente, se ha identificado la isoforma secretada de la proteína p45 ErbB-3 en muestras de sobrenadante de médula ósea de hombres con cáncer de próstata. Además, se ha observado mediante el análisis inmunohistoquímico de especímenes de tejido humano que la isoforma secretada de la proteína p45 ErbB-3 se expresa en abundancia en las células cancerosas de cáncer de próstata metastático en la médula ósea (Chen, N. et al., Cáncer Res. 67 (2007) 6544-6548).

65 Como resultará obvio para los expertos en la materia, la presente invención no pretende limitarse por el dominio extracelular libre de longitud completa de la proteína ErbB-3 mostrada en el Id. de Sec. N°1 o las isoformas

secretadas de las proteínas codificadas mediante variantes de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano mostradas en las Id. de Sec. N°2-5. La presente invención también engloba los fragmentos fisiológicos o artificiales del s-ErbB-3, las modificaciones secundarias del s-ErbB-3 así como las variantes alélicas del s-ErbB-3. Las variantes de un polipéptido están codificadas por el mismo gen pero puede diferir en su punto isoeléctrico (=PI) o su peso molecular (=MW), o en ambos como resultado, por ejemplo, del procesamiento alternativo del mRNA o del procesamiento previo del mRNA. La secuencia de aminoácidos de una variante es hasta un 95% o más idéntica en relación a la secuencia del marcador correspondiente. Preferiblemente, los fragmentos artificiales engloban un péptido producido sintéticamente o mediante técnicas de recombinación, que al menos incluye un epítipo de interés diagnóstico que contiene al menos 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos, tal y como se deriva de las secuencias descritas en las Id. de Sec. N°1-5. Tal fragmento puede utilizarse de manera ventajosa en la generación de anticuerpos o como control en un inmunoensayo. Más preferiblemente, el fragmento artificial incluye, al menos, dos epítopos de interés apropiados para configurar un inmunoensayo en sándwich.

R&D Systems ofrece un ensayo ELISA con ErbB-3 para medir el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 3 humano y recombinante en sobrenadantes de cultivos celulares.

Genentech Inc. describió anticuerpos que se unen a la proteína ErbB-3 y reducen la formación inducida por HRG de un complejo proteico ErbB2-ErbB-3 en una célula que expresa ErbB2 y ErbB-3. Además, los anticuerpos incrementan la afinidad de unión de la heregulina por la proteína ErbB-3 y producen una reducción característica de la activación del ErbB2 inducida por HRG en una célula que expresa ErbB2 y ErbB-3.

Tal y como se utiliza aquí, cada uno de los términos tiene el significado asociado a estos en esta sección.

Los determinantes "un" y "una" se utilizan aquí para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un marcador" hace referencia a un marcador o más de un marcador. El término "al menos" se utiliza para indicar que, de manera opcional, uno o más objetos adicionales pueden estar presentes. A modo de ejemplo, un panel de marcadores que incluye, al menos (los marcadores) s-ErbB-3 y CYFRA 21-1, puede incluir de manera opcional uno o más marcador diferentes.

La expresión "uno o más" indica de 1 a 50, preferiblemente de 1 a 20, también preferible 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15.

Tal y como se utiliza aquí, el término "marcador" o "marcador bioquímico" hace referencia a una molécula que puede utilizarse como diana para el análisis de una muestra de ensayo de un paciente. Algunos ejemplos de tales dianas moleculares son proteínas o polipéptidos. Se contempla que las proteínas o polipéptidos que se utilizan como marcador en la presente invención incluyen variantes naturales de dicha proteína, así como fragmentos de dicha proteína o dicha variante, en particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Preferiblemente, los fragmentos inmunológicamente detectables incluyen, al menos, 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Los expertos en la materia sabrán apreciar que las proteínas que las células liberan o que están presentes en la matriz extracelular pueden dañarse, por ejemplo durante la inflamación, y pueden degradarse o escindir-se en tales fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en una forma inactiva que puede activarse subsiguientemente mediante proteólisis. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, las proteínas o los fragmentos de las mismas también pueden estar presentes como parte de un complejo. Tal complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Además, el polipéptido marcador alternativo o una variante del mismo pueden sufrir una modificación postraducciona. Algunos ejemplos no limitantes de las modificaciones postraduccionales son la glicosilación, la acilación, y/o la fosforilación.

Las proteínas s-ErbB-3, en particular (i) el dominio extracelular libre de una proteína humana "oncogén c-erbB-3" y (ii) las isoformas secretadas de la proteína codificadas por variantes de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano, se detectan en muestras apropiadas. Las muestras preferibles son las muestras tisulares o los fluidos corporales, tales como la sangre, el plasma, el suero, las heces (preferibles en caso de sospecha de CRC), el fluido aspirado del pezón (= NAF; preferible en caso de sospecha de BC), etc. Preferiblemente, la muestra se deriva de un sujeto humano, por ejemplo un paciente con un tumor o una persona en riesgo de presentar un tumor o una persona sospechosa de tener un tumor. También es preferible que se detecte el s-ErbB-3 en una muestra de suero o plasma.

En una realización preferible de acuerdo con la presente invención, se determina la concentración del s-ErbB-3. En una realización, el marcador s-ErbB-3 se mide específicamente en una muestra mediante la utilización de un agente de unión específico.

Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para el s-ErbB-3, una lectina de unión al s-ErbB-3 o un anticuerpo frente al s-ErbB-3. Un agente de unión específico tiene, al menos, una afinidad de 10^7 l/mol para su molécula diana correspondiente. Preferiblemente, el agente de unión específico tiene una afinidad de 10^8 l/mol o también preferible de 10^9 l/mol para su molécula diana. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, el término específico se utiliza para indicar que las otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para el s-ErbB-3. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula diferente a la

molécula diana da como resultado una afinidad que, como máximo, es de un 10% o menor, sólo del 5% o menor, solo del 2% o menor, sólo del 1% o menor respecto a la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica cumplirá tanto los criterios mínimos de afinidad como los de especificidad mencionados con anterioridad.

Preferiblemente, un agente de unión específico es un anticuerpo reactivo frente al s-ErbB-3. El término anticuerpo hace referencia a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígeno de tales anticuerpos, anticuerpos de cadena simple así como constructos genéticos que incluyen el dominio de unión de un anticuerpo.

Se puede utilizar cualquier fragmento de anticuerpo que cumpla los criterios anteriores de un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la materia, por ejemplo, tal y como describen Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, el libro completo, especialmente las páginas 43-78). Además, los expertos en la materia estarán relacionados con los métodos basados en inmuoabsorción, que pueden utilizarse en el aislamiento específico de anticuerpos. Con estos medios se puede potenciar la calidad de los anticuerpos policlones y, por consiguiente, su rendimiento en los inmunoensayos (Tijssen, P., visto antes, páginas 108-115).

Se pueden utilizar anticuerpos policlones formados en conejos para las realizaciones descritas en la presente invención. No obstante, también se pueden utilizar anticuerpos policlones de diferentes especies, por ejemplo, ovejas o cabras, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad necesaria con unas propiedades constantes, estos representan una herramienta ideal en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales frente al s-ErbB-3 en un método de acuerdo con la presente invención, respectivamente, representan otras realizaciones preferibles.

Tal y como apreciarán los expertos en la materia, ahora que se ha identificado el s-ErbB-3 como marcador útil en la evaluación del cáncer, preferiblemente el cáncer de mama o el colorrectal, se pueden utilizar varios procedimientos inmunodiagnósticos para alcanzar un resultado comparable con las realizaciones de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Tales estrategias incluyen, entre otras, la utilización de péptidos sintéticos que representan un epítipo del s-ErbB-3 para la inmunización. De forma alternativa, también se puede utilizar la inmunización con DNA, que también se conoce como vacunación con DNA.

Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específico frente al s-ErbB-3 bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre el agente de unión y el s-ErbB-3. No es necesario especificar tales condiciones dado que los expertos en la materia pueden identificar fácilmente tales condiciones de incubación apropiadas. Se mide la cantidad del complejo entre el agente de unión y el s-ErbB-3 y se utiliza en la evaluación del cáncer, preferiblemente del cáncer de pulmón. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, existen muchos métodos para medir la cantidad del complejo entre el agente de unión específico y el s-ErbB-3, y todos ellos se describen en detalle en los libros de texto relevantes (véase, por ejemplo, Tijssen P., visto antes, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (editores), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

Preferiblemente, el s-ErbB-3 se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich. En tal ensayo se utiliza un primer agente de unión específico para capturar el s-ErbB-3 en un lado y, en el otro lado, se utiliza un segundo agente de unión específico, que se marca para poder detectarlo directamente o indirectamente. Los agentes de unión específicos que se utilizan en un formato de ensayo de tipo sándwich pueden ser anticuerpos dirigidos específicamente contra el s-ErbB-3. La detección puede llevarse a cabo mediante la utilización de diferentes anticuerpos marcados y de captura, es decir, anticuerpos que reconocen diferentes epítopos de la proteína s-ErbB-3.

Un "marcador de cáncer" y, en particular, un "marcador de cáncer que se selecciona a partir del grupo que incluye el BC, el CRC y el OC" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que, en combinación con el marcador s-ErbB-3, añade información relevante en la evaluación de la enfermedad del cáncer, en la evaluación del cáncer en general o en la evaluación de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo en la evaluación del BC. La información se considera relevante o con valor aditivo si con una especificidad determinada la sensibilidad, o si con una sensibilidad determinada la especificidad, respectivamente, se pueden mejorar mediante la inclusión de tal marcador en una combinación de marcadores que incluye el marcador s-ErbB-3 para la evaluación del cáncer. En la realización preferible de la evaluación del cáncer, la mejora en la sensibilidad o la especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa con un nivel de significación de $p = 0,05$, $0,02$, $0,01$ o menor. Preferiblemente, el o los marcadores tumorales se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2.

El término "muestra", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una muestra biológica obtenida con el propósito de la evaluación *in vitro*. Preferiblemente, en los métodos de la presente invención, la muestra o la muestra del paciente incluye cualquier fluido corporal. Las muestras preferibles son la sangre total, el suero, el plasma, el fluido aspirado del pezón (= NAF; preferible en caso que se sospeche un BC), heces (preferible en caso que se sospeche un CRC),

lisados de tejido o muestras tisulares, y las más preferibles son el plasma o el suero.

Tal y como se utiliza aquí, el término "muestra tisular" y/o "sección de tejido" hace referencia a una muestra biológica tomada de un paciente durante la cirugía, las resecciones terapéuticas o una biopsia (por ejemplo, una biopsia incisional, una biopsia excisional, una biopsia con aguja gruesa o una biopsia por aspiración con aguja) que incluye la extracción de células o tejidos con el propósito de la evaluación *in vitro*. Cuando se lleva a cabo un análisis de acuerdo con la presente invención, el material de la muestra tisular se utiliza directamente o en forma de "lisado tisular". Tal y como se utiliza aquí, una "muestra tisular" también hace referencia a láminas finas de tejido que habitualmente se obtienen mediante la utilización de un micrótopo. En cualquiera de las realizaciones de los métodos descritos que incluyen una muestra biológica, tal muestra biológica puede (pero no es necesario) montarse en un portaobjetos de microscopio, puede ser una sección tisular (tal como una sección tisular fijada con formalina y embebida en parafina) y/o puede ser un tejido neoplásico (tal como un cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer gástrico, o un glioblastoma).

Tal y como se utiliza aquí, un "lisado tisular", "lisado celular", "lisado", "muestra lisada", "extracto de tejido" o "extracto celular" hacen referencia a un material de muestra y/o muestra biológica que incluye tejido o células lisados, es decir, en los que se ha alterado la integridad estructural del tejido o las células. Para liberar los contenidos de la muestra tisular o celular, habitualmente se trata el material con enzimas y/o con químicos para disolver, degradar o alterar las paredes celulares y las membranas celulares de tales tejidos o células. Los expertos en la materia estarán completamente familiarizados con los métodos apropiados para obtener lisados. Este proceso se denomina con el término "lisis".

El término "evaluación del cáncer" y, en particular, "evaluación de un cáncer que se selecciona a partir del grupo que incluye el BC, el OC y el CRC" se utiliza, por ejemplo, para indicar que el método de acuerdo con la presente invención ayudará al médico (por sí solo o junto a otros marcadores o variables, por ejemplo, los criterios descritos por la UICC (véase arriba)) en el establecimiento o confirmación de la ausencia o presencia de cáncer, en particular del BC; o ayudará al médico en el pronóstico, la detección de recurrencias (seguimiento de pacientes tras la cirugía) y/o la monitorización del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

Tal y como apreciarán los expertos en la materia, cualquiera de tales evaluaciones se realiza *in vitro*. La muestra del paciente se desecha posteriormente. La muestra del paciente sólo se utiliza para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. Preferiblemente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo, sangre total, suero, o plasma.

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con su utilización convencional. Las definiciones de términos comunes de la célula y la biología molecular se pueden encontrar en Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287 9; Kendrew, J. et al. (editores), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A. (editor), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8.

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para la evaluación *in vitro* del cáncer, por ejemplo el BC, mediante marcadores bioquímicos, que incluye la medición en una muestra de la concentración del s-ErbB-3 y la utilización de la concentración determinada en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

En otra realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para la evaluación *in vitro* del BC mediante marcadores bioquímicos, que incluye la medición en una muestra de la concentración del s-ErbB-3 y la utilización de la concentración determinada en la evaluación del BC.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han podido detectar una concentración aumentada del marcador s-ErbB-3 en un porcentaje significativo de muestras procedentes de pacientes con cáncer, en particular con cáncer de mama (BC), cáncer colorrectal (CRC) o cáncer ovárico (OC). Todavía más sorprendente es que han podido demostrar que la concentración elevada del s-ErbB-3 en tal muestra obtenida de un individuo puede utilizarse en la evaluación del cáncer, en particular de las enfermedades de cáncer mencionadas con anterioridad.

La situación ideal para el diagnóstico sería una situación en la que la enfermedad respectiva estuviera causada por un único acontecimiento o proceso como, por ejemplo, una enfermedad infecciosa. En el resto de casos, el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se conoce del todo, como es el caso de muchos tipos de cáncer, por ejemplo el BC, el CRC o el OC. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad del 100% y a la vez una sensibilidad del 100% para una enfermedad multifactorial, por ejemplo el BC. Por el contrario, los marcadores bioquímicos, por ejemplo el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9, el ErbB-2, o como se muestra aquí, el s-ErbB-3, pueden utilizarse para evaluar con cierta probabilidad o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, la ausencia o la gravedad de una enfermedad. Por consiguiente, en el diagnóstico clínico de rutina generalmente se consideran en conjunto varios síntomas clínicos y marcadores biológicos para el diagnóstico, tratamiento y manejo

de la enfermedad subyacente. Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o, en una realización preferible de la invención, pueden medirse de forma simultánea mediante la utilización de una tecnología de matrices basadas en cuentas o chips. Entonces, se interpretan las concentraciones de los biomarcadores de forma independiente, por ejemplo, mediante la utilización de un valor de corte individual para cada marcador, o pueden combinarse para su interpretación.

En otra realización preferible, la evaluación del cáncer de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en un método que incluye la medición en una muestra de la concentración de a) s-ErbB-3, b) uno o más marcador diferentes de cáncer, y c) la utilización del resultado de la medición, por ejemplo la concentración determinada en el paso (a) y el paso (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer.

En la evaluación del cáncer, el marcador s-ErbB-3 será ventajoso en uno o más de los siguientes aspectos: cribado; ayuda diagnóstica; pronóstico; monitorización de una terapia tal como la quimioterapia, la radioterapia, y la inmunoterapia.

Cribado:

El cribado se define como la solicitud sistemática de un ensayo para identificar individuos, por ejemplo individuos en riesgo, que presentan indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de cáncer. Preferiblemente, la población de cribado se compone de individuos de los que se conoce que presentan un riesgo superior al riesgo medio de cáncer. Por ejemplo, una población de cribado para el cáncer de mama se compone de individuos de los que se conoce que presentan un riesgo mayor al riesgo medio de cáncer.

En la realización preferible, se utiliza una muestra tisular o cualquier fluido corporal como la sangre total, el plasma, el suero, las heces (preferibles en caso de sospecha de CRC) o el fluido aspirado del pezón (= NAF; preferible en caso de sospecha de BC) para el cribado de cáncer, por ejemplo de cáncer de mama.

En otra realización preferible, se utiliza plasma, suero o NAF (preferible en caso de sospecha de BC) como muestra en el cribado de cáncer de mama.

Para la mayoría de enfermedades no existe un único marcador bioquímico en la circulación que cumpla los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para los propósitos de cribado. Parece ser que esto también se cumple para el cáncer y, en particular, para el cáncer de mama. Debe esperarse la utilización de un panel de marcadores que incluye varios marcadores en el cribado de cáncer. Los datos establecidos en la presente invención indican que, con ventaja, el marcador s-ErbB-3 forma una parte integral de un panel de marcadores adecuados para los propósitos de cribado. Así, la presente invención hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 como un marcador de un panel de marcadores para cáncer, es decir un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y uno o más marcadores adicionales para los propósitos de cribado de cáncer. En particular, la presente invención hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 como marcador de un panel de marcadores generales de cáncer. Tal panel de marcadores incluye el marcador s-ErbB-3 y uno o más marcadores adicionales, por ejemplo marcadores generales de cáncer y/o marcadores para los tipos de cáncer mencionados con anterioridad.

También es probable que el s-ErbB-3 contribuya a otros paneles de marcadores para ciertos tipos de cáncer específicos, por ejemplo, el cáncer de mama, el colorrectal y/o el ovárico.

Otros tipos de cáncer preferibles que pueden evaluarse con un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 son el cáncer de mama, el colorrectal o el cáncer ovárico.

Otros tipos de cáncer preferibles que pueden evaluarse con un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 son el cáncer de mama o el colorrectal.

Un tipo de cáncer preferible para evaluar con un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 es el cáncer de mama (BC).

Los datos presentes también indican que ciertas combinaciones de marcadores serán ventajosas en el cribado del cáncer. Por ejemplo, con referencia a la realización preferible del cribado del BC, el OC o el CRC, la presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y el CYFRA 21-1, o de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y el CEA, o de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y el CA 15-3, o de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y el CA 19-9, o de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y el ErbB-2, o de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y dos o más marcadores que se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2.

Ayuda diagnóstica:

Los marcadores pueden ayudar en el diagnóstico diferencial entre enfermedad benigna o maligna en un órgano

particular, ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o a establecer los valores basales del marcador antes de la cirugía.

Actualmente, algunos de los métodos importantes utilizados en la detección del cáncer de mama son la radiología y/o los escáneres de tomografía computerizada (TC). Con estos métodos se pueden visualizar pequeños nódulos, es decir, pequeñas regiones de tejido sospechoso. No obstante, muchos de esos nódulos - más de un 90% con la TC - representan cambios tisulares benignos y sólo una minoría de los nódulos representa tejido canceroso. La utilización del marcador s-ErbB-3 puede ayudar a diferenciar entre enfermedad benigna o maligna.

En una realización preferible, el marcador s-ErbB-3 se utiliza en un método inmunohistológico para establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de BC, OC y/o CRC, preferiblemente de BC.

Dado que el s-ErbB-3 como marcador único puede ser superior a otros marcadores, por ejemplo en el caso del BC frente a otros marcadores como el CEA o el CYFRA 21-1, se debe esperar que el s-ErbB-3 se utilice como ayuda diagnóstica, especialmente mediante el establecimiento de un valor basal antes de la cirugía. Por consiguiente, la presente invención también hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 para establecer un valor basal previo a la cirugía del cáncer.

Pronóstico:

Los indicadores de pronóstico se pueden definir como características clínica, patológicas, o bioquímicas de los pacientes con cáncer y sus tumores que predicen con una cierta probabilidad el resultado de la enfermedad. Su utilización principal es en la ayuda a la planificación racional del manejo del paciente, es decir, para evitar el infratratamiento de una enfermedad agresiva y el sobretatamiento de una enfermedad indolente, respectivamente. Molina, R. et al., Tumor Biol. 24 (2003) 209-218 evaluaron el valor pronóstico del CEA, el CA 125, el CYFRA 21-1, el SSC y el NSE en el NSCLC. En su estudio, los niveles séricos anormales de los marcadores NSE, CEA, y LDH (lactato deshidrogenasa) parecen indicar un acortamiento en la supervivencia.

Dado que el s-ErbB-3 por sí solo contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes con cáncer, por ejemplo a los pacientes con BC o CRC, de los controles sanos, debe esperarse que ayude en la evaluación del pronóstico de los pacientes que padecen cáncer, preferiblemente BC o CRC. Probablemente, el nivel del s-ErbB-3 preoperatorio podrá combinarse con uno o más marcadores diferentes de cáncer y/o el sistema de estadificación TNM. En una realización preferible, el s-ErbB-3 se utiliza en el pronóstico de los pacientes con BC, CRC o OC.

Monitorización de la terapia:

Merle, P. et al., Int. J. of Biological Markers 19 (2004) 310-315 han evaluado las variaciones del nivel sérico del CYFRA 21-1 en pacientes con NSCLC localmente avanzado (cáncer de pulmón de célula no pequeña) tratado con quimioterapia de inducción. Concluyeron que la monitorización precoz de los niveles séricos del CYFRA 21-1 pueden ser una herramienta pronóstica útil para la respuesta tumoral y supervivencia en los pacientes con un estadio III de NSCLC. Además, se ha descrito la utilización del CEA en la monitorización del tratamiento de pacientes con LC (Fukasawa, T. et al., Gan to Kagaku Ryoho 13 (1986) 1862-1867). La mayoría de los estudios fueron retrospectivos, no aleatorizados y contenían un número de pacientes pequeño. Del mismo modo que los estudios con el CYFRA 21-1, los estudios con el CEA sugirieron que: a) los pacientes con una disminución en los niveles del CEA durante la recepción de la quimioterapia generalmente presentaron un mejor resultado que los pacientes cuyos niveles de CEA no disminuyeron y (b) para casi todos los pacientes, los aumentos en los niveles del CEA se asociaron con la progresión de la enfermedad.

Se espera que el s-ErbB-3 será, al menos, tan buen marcador para la monitorización de la quimioterapia como lo son el CYFRA 21-1 o el CEA, respectivamente. Así, la presente invención también hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 en la monitorización de los pacientes con cáncer y, preferiblemente, los pacientes con cáncer de mama (BC) o cáncer colorrectal (CRC) bajo tratamiento con quimioterapia. En una realización preferible, en la monitorización de la terapia se combinarán las mediciones del s-ErbB-3 y, al menos, otro marcador que se selecciona a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2, y se utilizarán en la evaluación del BC o el CRC.

Seguimiento:

Una gran parte de pacientes (por ejemplo los pacientes con cáncer de pulmón) que se someten a la resección quirúrgica con intención de resección completa del tejido canceroso, posteriormente desarrollan enfermedad recurrente o metastática (Wagner, H., Chest 117 (2000) 110-118; Bucchieri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). La mayoría de estas recidivas aparecen en los primeros 2-3 años después de la cirugía. Dado que la enfermedad recurrente/metastática es fatal de manera invariable si se detecta demasiado tarde, se ha concentrado la investigación de manera considerable en la recidiva del cáncer en un estadio precoz y, consecuentemente, potencialmente tratable.

Consecuentemente, la mayoría de los pacientes con cáncer, por ejemplo los pacientes con BC, se someten a un programa de vigilancia postoperatoria que frecuentemente incluye la monitorización regular del CEA. Se ha observado que la monitorización seriada con el CEA un año después de la resección quirúrgica detecta la enfermedad recurrente/metastática postoperatoria con una sensibilidad de aproximadamente el 29 %, con una especificidad de aproximadamente el 97 %, incluso ante la ausencia de síntomas o signos de sospecha (Buccheri, G. et al., *Ann. Thorac. Surg.* 75 (2003) 973-980). Por consiguiente, el seguimiento de las pacientes con BC tras la cirugía es uno de los campos más importantes para la utilización de un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad del s-ErbB-3 en las pacientes de BC investigadas es probable que el s-ErbB-3 solo o en combinación con uno u otros marcadores sea de gran ayuda en el seguimiento de las pacientes con BC, especialmente en las pacientes con BC tras la cirugía. La utilización de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y uno o más marcadores diferentes de BC en el seguimiento de las pacientes con BC representa otra realización preferible de la presente invención.

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 en el campo diagnóstico del cáncer. Preferiblemente, el s-ErbB-3 se utiliza en la evaluación del cáncer de mama, el colorrectal o el ovárico, respectivamente.

En aún otra realización preferible, la presente invención hace referencia a la utilización del s-ErbB-3 como molécula marcadora para el cáncer, por ejemplo el cáncer en general o tipos específicos de cáncer, tal como el cáncer de mama, el colorrectal o el ovárico, en combinación con una o más moléculas marcadoras de cáncer. Las moléculas marcadoras adicionales pueden ser moléculas marcadoras generales no específicas de un tipo de cáncer y/o las moléculas marcadoras específicas de cáncer, por ejemplo, moléculas marcadoras para el cáncer de mama, el colorrectal o el ovárico. El s-ErbB-3 y, al menos, otro marcador adicional se utilizan en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC o el CRC en una muestra líquida obtenida a partir de un individuo. Los otros marcadores de cáncer preferibles seleccionados con los cuales se puede combinar la medición del s-ErbB-3 son el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y/o el ErbB-2. En particular, los otros marcadores de BC preferibles seleccionados con los que se puede combinar la medición del s-ErbB-3 son el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y/o el ErbB-2. Aún otro panel de marcadores adicional utilizado en la evaluación del BC incluye el s-ErbB-3 y, al menos, otra molécula marcadora que se selecciona a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1 y el CEA.

Tal y como apreciarán los expertos en la materia, existen muchas formas de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la cuestión diagnóstica bajo investigación. En un enfoque simple, pero sin embargo efectivo, se asume un resultado positivo si una muestra es positiva para, al menos, uno de los marcadores investigados. Por ejemplo, este puede ser el caso cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como el SIDA.

No obstante, frecuentemente se evalúa la combinación de marcadores. Preferiblemente, los valores medidos de los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo, del s-ErbB-3 y el CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores del marcador pueden combinarse con cualquier método matemático del estado de la materia apropiado. Los métodos matemáticos conocidos para la correlación de una combinación de marcadores con una enfermedad emplean métodos como el análisis discriminativo (DA) (es decir, DA lineal, cuadrático o regularizado), los métodos Kernel (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, clasificadores de k-Nearest-Neighbor), PLS (cuadrados mínimos parciales), los métodos de tipo árbol (es decir, la regresión lógica, CART, los métodos Random Forest, los métodos Boosting/Bagging), los modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), los métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), los modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica heurística, métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Los expertos en la materia no tendrán problemas para seleccionar el método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferiblemente, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo en ausencia o presencia de LC, se selecciona del grupo que incluye el DA (es decir el análisis discriminativo lineal, cuadrático o regularizado), los métodos Kernel (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, clasificadores de k-Nearest-Neighbor), PLS (cuadrados mínimos parciales), los métodos de tipo árbol (es decir, la regresión lógica, CART, los métodos Random Forest, los métodos Boosting), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relacionados con estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I. et al., *J. de Computational and Graphical Statistics* 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., *J. de la American Statistical Association* 84 (1989) 165-175; Hastie, T. et al., *The Elements of Statistical Learning*, Springer Series en Statistics (2001); Breiman, L. et al., *Classification and regression trees*, Wadsworth, Inc., California (1984); Breiman, L., *Random Forests*, *Machine Learning* 45 (2001) 5-32; Pepe, M.S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); y Duda, R.O. et al., *Pattern Classification*, Wiley Interscience, 2ª edición (2001).

Es una realización preferible de la invención la utilización de un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para la discriminación entre el estado A y el estado B, por ejemplo, entre enfermo o sano. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que forman un panel de marcadores.

La precisión de un método diagnóstico se describe mejor mediante sus características operativas de receptor (ROC)

(véase especialmente Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es un gráfico cuyos pares de sensibilidad/especificidad resultan de la variación continua del umbral de decisión por encima del rango completo de los datos observados.

- 5 El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de la precisión diagnóstica o la habilidad de clasificar de modo correcto a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la habilidad del ensayo para distinguir correctamente entre dos condiciones diferentes en los sujetos investigados. Tales condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad benigna frente a maligna.
- 10 En cada caso, el gráfico ROC ilustra la superposición entre las dos distribuciones mediante la representación de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. En el eje Y se representa la sensibilidad o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados verdaderos positivos del ensayo)/(número de verdaderos positivos + número de resultados falsos negativos del ensayo)]. También se hace referencia a esto como positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje X se representa la fracción de falsos positivos, o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calculan completamente por separado mediante la utilización de los resultados de los ensayos de dos subgrupos diferentes, el ensayo ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en el gráfico ROC representa un par de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con una discriminación perfecta (sin superposición en las dos distribuciones de resultados) tiene un ensayo ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde la fracción de verdaderos positivos es de 1,0, o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones de resultados idénticas en los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hacia la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se sitúan entre estos dos extremos. (Si el gráfico ROC se sitúa por completo bajo la diagonal de 45°, esto se puede remediar fácilmente mediante la inversión de los criterios de "positividad" desde "mayor de" a "menor de" o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cercano esté el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la precisión global del ensayo.
- 20 Un modo preferible de cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. Por ejemplo, tal parámetro global se llama "error total" o alternativamente "área bajo la curva = AUC". La medida global más común es el área bajo el gráfico ROC. Por convención, este área siempre es $\geq 0,5$ (si no lo es, se puede invertir la regla de decisión para que lo sea). Los valores se comprenden entre 1,0 (separación perfecta de los valores del ensayo en dos grupos) y 0,5 (sin diferencia distribucional aparente entre los dos grupos de valores del ensayo). El área no sólo depende de una fracción particular del gráfico, tal como el punto más cercano a la diagonal o a la sensibilidad con una especificidad del 90%, sino del gráfico completo. Esto es una expresión cuantitativa y descriptiva de cuán cercano está el gráfico ROC del gráfico perfecto (área = 1,0).
- 30 Mediante la combinación de mediciones de s-ErbB-3 con otros marcadores tales como el CYFRA 21-1 o el CEA, o con otros marcadores de BC por descubrir, hace que el s-ErbB-3 conduzca hacia mejoras adicionales en la evaluación del BC.
- 35 En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para mejorar la precisión diagnóstica para el cáncer, por ejemplo del BC frente a controles sanos mediante la medición en una muestra de la concentración de, al menos, el s-ErbB3 y el CYFRA 21-1, y de manera opcional el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y/o el HER-2, respectivamente; y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo de BC, y la mejora resulta en un mayor número de pacientes que se clasifican correctamente como enfermos de cáncer, por ejemplo de BC frente a controles sanos en comparación con una clasificación basada en la investigación de un único marcador.
- 40 En un método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3 y CYFRA 21-1, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.
- 45 En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3 y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.
- 50 En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3 y CA 15-3, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.
- 55 En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3 y CA 19-9, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3 y ErbB-2, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

Aún en otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3, CYFRA 21-1 y CEA, respectivamente y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

Aún en otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3, CYFRA 21-1 y CA 15-3, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

Aún en otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3, CYFRA 21-1 y CA 19-9, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

Aún en otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores s-ErbB-3, CYFRA 21-1 y ErbB-2, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el BC.

Los siguientes ejemplos, listados de secuenciación y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de la cual se describe en las reivindicaciones anejas. Debe entenderse que pueden realizarse modificaciones en los procedimientos descritos sin alejarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra el diagrama de cajas del s-ErbB-3 en diferentes grupos de enfermedad. BC = cáncer de mama; CRC = cáncer colorrectal; ctrl = cohorte control.

La figura 2 muestra el gráfico de las características operativas de receptor (gráfico ROC) del s-ErbB-3 en las muestras del cáncer de mama (BC) con una AUC de 0,79 para la evaluación de 39 muestras obtenidas a partir de pacientes con BC, en comparación con 43 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos.

La figura 3 muestra el gráfico de las características operativas de receptor (gráfico ROC) del s-ErbB-3 en las muestras del cáncer colorrectal (CRC) con una AUC de 0,79 para la evaluación de 110 muestras obtenidas a partir de pacientes con CRC, en comparación con 43 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos.

Descripción de las secuencias

El Id. de Sec. Nº 1 muestra la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular libre codificado por el mRNA de longitud completa derivado del "oncogén c-erbB-3" humano (salvaje); número de acceso de la base de datos SwissProt: P21860.

El Id. de Sec. Nº 2 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano; la isoforma también se conoce en la literatura como "p45 s-ErbB-3" o "isoforma R2".

El Id. de Sec. Nº 3 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano; la isoforma también se conoce en la literatura como "p85 s-ErbB-3" o "isoforma R31".

El Id. de Sec. Nº 4 muestra la secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano; la isoforma también se conoce en la literatura como "p85 s-ErbB-3" o "isoforma R35".

El Id. de Sec. Nº 5 muestra la secuencia de aminoácidos codificado por una variante de empalme del mRNA derivado del "oncogén c-erbB-3" humano; la isoforma también se conoce en la literatura como "isoforma R1/variante S".

El Id. de Sec. Nº 6 muestra un motivo de aminoácidos de de la región yuxtamembrana (JM) de la glicoproteína p180 ErbB-3 (HER-3) humana.

El Id. de Sec. Nº 7 muestra un motivo de aminoácidos de de la región yuxtamembrana (JM) de la glicoproteína ErbB-2 (HER-2) humana.

El Id. de Sec. Nº 8 es el cebador 1 (sentido)

El Id. de Sec. Nº 9 es el cebador 2 (antisentido)

5 El Id. de Sec. Nº 10 es el cebador 3 (antisentido)

El Id. de Sec. Nº 11 es el cebador 4 (antisentido)

Ejemplo 1

10

Identificación del s-ErbB-3 como marcador potencial del cáncer de mama

Se sabe que el dominio extracelular de HER-2/neu, una proteína transmembrana de 185 kDa, se somete a la escisión proteolítica de metaloproteasas y que se libera hacia la sangre en forma de antígeno circulante. Se ha observado que el HER-2 sérico contiene información pronóstica y predictiva para el cáncer de mama. El receptor transmembrana HER-2, junto con HER-3, forma un correceptor de heuregulina de alta afinidad (Sliwkowski, M.X. et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 14661-14665) del que se cree que induce una potente señal de transformación y mitogénesis.

15

20

Además, se cree que existe un motivo en la región yuxtamembrana (JM) de la familia de receptores EGF donde la región sólo contiene 11 residuos de aminoácidos, en la cual existen posiciones de escisión. El motivo de la posición de escisión se define por un motivo de residuos de prolina/glicina con 5-7 residuos de aminoácido entremedio (P/GX 5-7 P/G). Se sabe que los residuos de prolina y glicina alteran de forma local las estructuras secundarias y se encuentran en sitios de escisión conocidos. En la secuencia proteica de la proteína humana p180 ErbB-3 de longitud completa (HER-3wt) también se puede encontrar este motivo en la región yuxtamembrana:

25

Región yuxtamembrana del HER-2 (ErbB-2) humano (Id. de Sec. Nº 7)

Her-2wt CQPCPINCTH SCVDLDDKGC **P**A**E**Q**R**A**S****P**L**T**

JM

30

Región yuxtamembrana del HER-3 (ErbB-3) humano (Id. de Sec. Nº 6)

HER-3wt YKYPDVQNECRPCHENCTQGCKGPELQDCL **G**Q**T**L**V**L**I****G**K**T**

JM

Se midió el nivel de la proteína s-ErbB-3 mediante la utilización del ELISA en las muestras séricas de pacientes con cáncer así como también de gente aparentemente sana (cohorte control). Se excluye la reactividad cruzada con otros miembros de la familia EGF mediante la evaluación de la especificidad del anticuerpo con dominios extracelulares recombinantes de HER-1, HER-2 y HER-4. No se observa reactividad cruzada.

35

La secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la proteína humana p180 ErbB-3 codificada por el mRNA de longitud completa derivado del "oncogén c-erbB-3" humano se muestra en el Id. de Sec. Nº1. La traducción de variantes de empalme de los mRNA derivados del "oncogén c-erbB-3" humano resulta en las proteínas que se muestran en el Id. de Sec. Nº2 (p45 s-ErbB-3, isoforma R2), el Id. de Sec. Nº3 (p85 s-ErbB-3, isoforma R31), el Id. de Sec. Nº4 (p85 s-ErbB-3, isoforma R35) y el Id. de Sec. Nº5 (isoforma R1/variante S). Todas las proteínas se expresaron en las células de mamífero HEK 293T y se evaluaron mediante Western Blot y ELISA.

40

45 Ejemplo 2

Anticuerpos frente a la proteína marcador de cáncer de mama s-ErbB-3

Los anticuerpos monoclonales frente a la proteína marcador de cáncer s-ErbB-3 se obtuvieron de R&D Systems (Nº Cat. DY348) para la medición de los niveles séricos, plasmáticos y sanguíneos del s-ErbB-3 mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo Western Blot y ELISA.

50

Expresión de la proteína recombinante en células HEK 293 T

Para generar material de calibración para la proteína s-ErbB-3, se llevó a cabo la expresión recombinante del p180 ErbB-3 salvaje (wt) y el transcripto alternativo (mRNA) de la proteína ErbB-3. La expresión se realiza en células de mamífero HEK 293T. En un primer paso, se realizó una PCR con cebadores oligonucleótidos específicos para una porción de la secuencia de nucleótidos publicada del gen humano del c-erbB-3, tal y como se describe en Lee, H. et al., Oncogene 16 (1998) 3243-3252. Las secuencias de nucleótidos de los cebadores sintetizados se seleccionaron del siguiente modo:

55

60

Cebador 1 (sentido) Id. de Sec. Nº 8
5'- gcaagctagccaccatgagggcgaacgacgctctgc -3'

5 Cebador 2 (antisentido) Id. de Sec. Nº 9
5'- gcaagcggccgccccaccttggacatagccccacaaggc -3'

10 Cebador 3 (antisentido) Id. de Sec. Nº 10
5'- gcaagcggccgcttgatgccacctgaacagttccattgcag -3'

Cebador 4 (antisentido) Id. de Sec. Nº 11
5'- gcaagcggccgcacaccccttctccttggtccatccctc -3'

15 Los productos de la PCR se clonaron en el vector de expresión de mamíferos pCMV-Fc marcado (Clonotech), y se secuenciaron mediante Geneart.

Línea celular: la línea celular de riñón embrionario humano 293 se cultivó en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%.

20 Purificación de la proteína s-ErbB-3:

25 Todas las proteínas s-ErbB-3 se aislaron a partir del medio concentrado de células transitoriamente transfectadas con el clon de la isoforma R2, la isoforma R35, la isoforma R31 o la isoforma R1/Variante S, y se purificaron en un paso. Mediante la utilización de una cromatografía HiTrap con una columna de proteína A (Amersham), la proteína se cargó durante la noche a 4°C en la columna. El material unido se lavó con el tampón A (10 mM de fosfato, pH de 7,4, 27mM de KCl y 137 mM de NaCl), se incubó con la proteasa PreScission durante la noche a 4°C, y luego se eluyó utilizando el tampón B que contiene 0,1M de citrato de sodio (pH 3,5). La proteasa PreScission marcada con GST se sustrajo mediante la utilización de una columna GSTrap (1ml). Las muestras de cada paso se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron mediante tinción con azul brillante de Coomassie y mediante Western Blot utilizando el anticuerpo anti-ErbB-3 que reconoce el dominio extracelular del s-ErbB-3.

Ejemplo 3

35 ELISA para la medición de la proteína s-ErbB-3 en las muestras séricas o plasmáticas humanas u otros fluidos corporales

Se desarrolla un sándwich ELISA para la detección de la proteína s-ErbB-3 en el suero o plasma humanos. Se conjugan alícuotas del anticuerpo monoclonal anti-ErbB-3 con biotina para la captura y detección del antígeno (véase el ejemplo 2).

40 Se incuban placas de 96 micropocillos recubiertas con estreptavidina con 100 µl del anticuerpo policlonal anti-s-ErbB-3 biotinilado durante la noche a 2 mg/ml en 10 mM de fosfato, pH de 7,4, 27mM de KCl y 137 mM de NaCl. Tras la incubación, se lava las placas tres veces con 10 mM de fosfato, pH de 7,4, 27mM de KCl y 137 mM de NaCl. Los pocillos se incuban durante 2 h. con 10 mM de fosfato, pH de 7,4, BSA al 1%, 27mM de KCl y 137 mM de NaCl para bloquear la unión inespecífica. Después de los tres lavados, los pocillos se incuban bien con una dilución seriada de la proteína recombinante (véase el ejemplo 2) como antígeno estándar, o con muestras líquidas diluidas obtenidas de pacientes. Tras la unión del sErbB-3 se lavan las placas tres veces con 10 mM de fosfato, pH de 7,4, 27mM de KCl y 137 mM de NaCl. Para la detección específica del s-ErbB-3 unido, se incuban los pocillos con 100 µl del anticuerpo monoclonal anti-s-ErbB-3 durante 60 min. a 4 mg/ml en 10 mM de fosfato, pH de 7,4, BSA al 1% y 137mM de NaCl. Luego se lavan las placas tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En un paso siguiente se incuban los pocillos con 200µg/ml de conjugados de POD antimurino durante 30 min. en 10 mM de fosfato, pH de 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%. Las placas se lavan subsiguientemente tres veces con el mismo tampón. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo los pocillos se incuban con 100 µl de la solución ABTS (R&D Systems) y el OD se mide después de 30 min. a 495 nm con un lector de ELISA.

55 Ejemplo 4

Análisis ROC para evaluar la utilidad clínica en términos de precisión diagnóstica

60 La precisión se evalúa mediante el análisis de muestras líquidas individuales obtenidas a partir de cohortes de pacientes bien caracterizadas, es decir, 50 pacientes que a las que se ha realizado una mamografía y se ha constatado que no presentan BC, 50 pacientes diagnosticadas y estadificadas como BC ductal invasivo y BC lobular invasivo T1-3, N0, M0, 50 pacientes diagnosticadas de BC evolucionado, que presentan al menos infiltración tumoral en, al menos, un nódulo linfático proximal o formas más graves de metástasis, 50 pacientes diagnosticadas de carcinoma mamario medular, mucinoso, tubular o papilar y 50 pacientes diagnosticadas de DCIS, respectivamente. El CA 15-3 se midió mediante un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, Ensayo CA 15-3 (Nº Cat. 0

304 5838 para el analizador de inmunoensayo Elecsys® Systems) y la proteína s-ErbB-3 medida tal y como se describe con anterioridad se cuantifica en el suero obtenido de cada uno de estos individuos. Los análisis ROC se realizan de acuerdo con Zweig, M. H., y Campbell, visto antes. Se ha observado que el poder de discriminación para diferenciar a los pacientes en el grupo T1-3, N0, M0 de los individuos sanos, tal y como se mide mediante el área bajo la curva, es al menos tan bueno para el biomarcador s-ErbB-3 como para el marcador establecido CA 15-3.

Valores de medición del ensayo s-ErbB-3:

La concentración del marcador de cáncer s-ErbB-3 en el suero humano se mide en muestras de pacientes con cáncer de mama (BC), pacientes con cáncer colorrectal (CRC) y en una cohorte control (Ctrl) de individuos aparentemente sanos. La tabla 1 muestra la distribución de los valores de medición absolutos del nivel de s-ErbB-3 en el suero humano de dichos grupos mediante la descripción de la media y la mediana, los valores mínimo y máximo, así como los cuartiles primero y tercero (percentil 25% y 75%) de los valores. Los datos de la tabla 1 se muestran en forma logarítmica en la tabla 2 y en forma de diagrama en el diagrama de cajas de la figura 1.

El s-ErbB-3 como marcador sérico de cáncer de mama (BC):

Las muestras derivaron de 39 pacientes con cáncer de mama (BC) bien caracterizadas con los datos dados en la tabla 3. La figura 2 muestra las curvas de características operativas de receptor (ROC) del nivel de s-ErbB-3 en el suero humano. El marcador se ha determinado en el colectivo de BC (39 pacientes) y en 43 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos (= cohorte control), lo que resulta en una AUC de 0,79.

El s-ErbB-3 como marcador sérico de cáncer colorrectal (CRC):

Las muestras derivaron de 110 pacientes con cáncer colorrectal (CRC) bien caracterizadas con los datos dados en la tabla 3. La figura 3 muestra las curvas de características operativas de receptor (ROC) del nivel de s-ErbB-3 en el suero humano. El marcador se ha determinado en el colectivo de CRC (110 pacientes) y en 43 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos (= cohorte control), lo que resulta en una AUC de 0,79.

Resúmenes:

Tabla 1:

Distribución de los valores de medición absolutos del nivel del s-ErbB-3 en el suero humano de pacientes con BC, pacientes con CRC y la cohorte control:							
	Min.	1r Cu.	Mediana	Media	3r Cu.	Máx.	n
BC	295,5	1974	3170	3748	4339	13620	39
CRC	753,2	1805	2249	2824	3459	8015	110
Ctrl	712,4	1109	1527	1680	2030	5914	43
BC = cáncer de mama; CRC = cáncer colorrectal; Ctrl = cohorte control; Min. = valor mínimo; 1r Cu. = primer cuartil (percentil 25% de los valores); 3r Cu. = tercer cuartil (percentil 75% de los valores); Máx. = valor máximo ; n = número de pacientes							

Tabla 2:

Distribución de los valores de medición absolutos del nivel del s-ErbB-3 en el suero humano de pacientes con BC, pacientes con CRC y la cohorte control:							
	Min.	1r Cu.	Mediana	Media	3r Cu.	Máx.	n
BC	5,688	7,588	8,061	7,957	8,375	9,519	39
CRC	6,624	7,498	7,718	7,83	8,149	8,989	110
Ctrl	6,569	7,011	7,331	7,337	7,615	8,685	43
BC = cáncer de mama; CRC = cáncer colorrectal; Ctrl = cohorte control; Min. = valor mínimo; 1r Cu. = primer cuartil (percentil 25% de los valores); 3r Cu. = tercer cuartil (percentil 75% de los valores); Máx. = valor máximo ; n = número de pacientes							

Los siguientes datos indican que el marcador de cáncer s-ErbB-3 también es útil en el seguimiento de los pacientes tras la cirugía.

Tabla 3:

Sensibilidad y especificidad diagnósticas del s-ErbB-3 para el cáncer de mama (BC) y el cáncer colorrectal (CRC)			
Panel A	CRC	BC	Individuos aparentemente sanos (Ctrl.)
Antígeno/formato	Ensayo ErbB-3 ELISA de R&D Systems		
Valor de corte en pg/ml para una especificidad del 95%	>2787	>3091	<3091
Sensibilidad	33%	51%	
Nº de sueros evaluados	110	39	43

LISTADO DE SECUENCIACIÓN

5 <110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> La utilización del s-ErbB-3 como marcador para cáncer

<130> 25942 WO

10 <150> EP09002586
<151> 24/02/2009

<160> 11

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 631
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
65 70 75 80

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

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

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
115 120 125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
130 135 140

Gly	Gly	Val	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asn	Asp	Lys	Leu	Cys	His	Met	Asp	Thr	145	150	155	160
Ile	Asp	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Arg	Asp	Arg	Asp	Ala	Glu	Ile	Val	Val	165	170		175
Lys	Asp	Asn	Gly	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Cys	His	Glu	Val	Cys	Lys	Gly	180	185		190
Arg	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Thr	Leu	Thr	Lys	Thr	195	200		205
Ile	Cys	Ala	Pro	Gln	Cys	Asn	Gly	His	Cys	Phe	Gly	Pro	Asn	Pro	Asn	210	215		220
Gln	Cys	Cys	His	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	225	230	235	240
Thr	Asp	Cys	Phe	Ala	Cys	Arg	His	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	Ala	Cys	Val	245	250		255
Pro	Arg	Cys	Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu	260	265		270
Glu	Pro	Asn	Pro	His	Thr	Lys	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Gly	Val	Cys	Val	Ala	275	280		285
Ser	Cys	Pro	His	Asn	Phe	Val	Val	Asp	Gln	Thr	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	290	295		300
Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Met	Glu	Val	Asp	Lys	Asn	Gly	Leu	Lys	Met	Cys	305	310	315	320
Glu	Pro	Cys	Gly	Gly	Leu	Cys	Pro	Lys	Ala	Cys	Glu	Gly	Thr	Gly	Ser	325	330		335
Gly	Ser	Arg	Phe	Gln	Thr	Val	Asp	Ser	Ser	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Val	340	345		350
Asn	Cys	Thr	Lys	Ile	Leu	Gly	Asn	Leu	Asp	Phe	Leu	Ile	Thr	Gly	Leu	355	360		365

Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln
 385 390 395 400

Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr
 405 410 415

Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile
 420 425 430

Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu
 435 440 445

Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr
 450 455 460

His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu
 485 490 495

Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro
 500 505 510

Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val
 515 520 525

Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Glu Pro Arg Glu Phe Ala
 530 535 540

His Glu Ala Glu Cys Phe Ser Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Met Gly
 545 550 555 560

Gly Thr Ala Thr Cys Asn Gly Ser Gly Ser Asp Thr Cys Ala Gln Cys
 565 570 575

Ala His Phe Arg Asp Gly Pro His Cys Val Ser Ser Cys Pro His Gly
 580 585 590

Val Leu Gly Ala Lys Gly Pro Ile Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn
 595 600 605

Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro
 610 615 620

<210> 2
 <211> 331

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1          5          10          15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
          20          25          30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
          35          40          45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
          50          55          60

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
65          70          75          80

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

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

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
          115          120          125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
          130          135          140

Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
145          150          155          160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
          165          170          175

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
          180          185          190

```

Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
195 200 205

Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
210 215 220

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
225 230 235 240

Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
245 250 255

Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
260 265 270

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
275 280 285

Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
290 295 300

Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
305 310 315 320

Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Gly Gly
325 330

<210> 3
<211> 562
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400> 3

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60

Ile	Val	Leu	Thr	Gly	His	Asn	Ala	Asp	Leu	Ser	Phe	Leu	Gln	Trp	Ile	
65					70					75					80	
Arg	Glu	Val	Thr	Gly	Tyr	Val	Leu	Val	Ala	Met	Asn	Glu	Phe	Ser	Thr	
				85					90					95		
Leu	Pro	Leu	Pro	Asn	Leu	Arg	Val	Val	Arg	Gly	Thr	Gln	Val	Tyr	Asp	
			100					105					110			
Gly	Lys	Phe	Ala	Ile	Phe	Val	Met	Leu	Asn	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ser	Ser	
		115					120					125				
His	Ala	Leu	Arg	Gln	Leu	Arg	Leu	Thr	Gln	Leu	Thr	Glu	Ile	Leu	Ser	
	130					135					140					
Gly	Gly	Val	Tyr	Ile	Glu	Lys	Asn	Asp	Lys	Leu	Cys	His	Met	Asp	Thr	
145					150					155					160	
Ile	Asp	Trp	Arg	Asp	Ile	Val	Arg	Asp	Arg	Asp	Ala	Glu	Ile	Val	Val	
				165					170					175		
Lys	Asp	Asn	Gly	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Cys	His	Glu	Val	Cys	Lys	Gly	
			180					185					190			
Arg	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Thr	Leu	Thr	Lys	Thr	
		195					200					205				
Ile	Cys	Ala	Pro	Gln	Cys	Asn	Gly	His	Cys	Phe	Gly	Pro	Asn	Pro	Asn	
	210					215					220					
Gln	Cys	Cys	His	Asp	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	Ser	Gly	Pro	Gln	Asp	
225					230					235					240	
Thr	Asp	Cys	Phe	Ala	Cys	Arg	His	Phe	Asn	Asp	Ser	Gly	Ala	Cys	Val	
				245					250					255		
Pro	Arg	Cys	Pro	Gln	Pro	Leu	Val	Tyr	Asn	Lys	Leu	Thr	Phe	Gln	Leu	
			260					265					270			
Glu	Pro	Asn	Pro	His	Thr	Lys	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Gly	Val	Cys	Val	Ala	
		275					280					285				
Ser	Cys	Pro	His	Asn	Phe	Val	Val	Asp	Gln	Thr	Ser	Cys	Val	Arg	Ala	

290	295	300
Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys 305 310 315 320		
Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser 325 330 335		
Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val 340 345 350		
Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu 355 360 365		
Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu 370 375 380		
Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln 385 390 395 400		
Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr 405 410 415		
Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile 420 425 430		
Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu 435 440 445		
Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr 450 455 460		
His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu 465 470 475 480		
Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Val Ala Glu 485 490 495		
Gly Lys Val Cys Asp Pro Leu Cys Ser Ser Gly Gly Cys Trp Gly Pro 500 505 510		
Gly Pro Gly Gln Cys Leu Ser Cys Arg Asn Tyr Ser Arg Gly Gly Val 515 520 525		

Cys Val Thr His Cys Asn Phe Leu Asn Gly Tyr Ser Lys Gly Ser Gln
530 535 540

Ser Arg Met Gly Gly Gly Gly Ala Leu Gln Trp Asn Cys Ser Gly Gly
545 550 555 560

Ile Gln

<210> 4
<211> 534
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
65 70 75 80

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

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

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
115 120 125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Glu Ile Leu Ser
130 135 140

Gly Gly Val Tyr Ile Glu Lys Asn Asp Lys Leu Cys His Met Asp Thr
145 150 155 160

Ile Asp Trp Arg Asp Ile Val Arg Asp Arg Asp Ala Glu Ile Val Val
 165 170 175

Lys Asp Asn Gly Arg Ser Cys Pro Pro Cys His Glu Val Cys Lys Gly
 180 185 190

Arg Cys Trp Gly Pro Gly Ser Glu Asp Cys Gln Thr Leu Thr Lys Thr
 195 200 205

Ile Cys Ala Pro Gln Cys Asn Gly His Cys Phe Gly Pro Asn Pro Asn
 210 215 220

Gln Cys Cys His Asp Glu Cys Ala Gly Gly Cys Ser Gly Pro Gln Asp
 225 230 235 240

Thr Asp Cys Phe Ala Cys Arg His Phe Asn Asp Ser Gly Ala Cys Val
 245 250 255

Pro Arg Cys Pro Gln Pro Leu Val Tyr Asn Lys Leu Thr Phe Gln Leu
 260 265 270

Glu Pro Asn Pro His Thr Lys Tyr Gln Tyr Gly Gly Val Cys Val Ala
 275 280 285

Ser Cys Pro His Asn Phe Val Val Asp Gln Thr Ser Cys Val Arg Ala
 290 295 300

Cys Pro Pro Asp Lys Met Glu Val Asp Lys Asn Gly Leu Lys Met Cys
 305 310 315 320

Glu Pro Cys Gly Gly Leu Cys Pro Lys Ala Cys Glu Gly Thr Gly Ser
 325 330 335

Gly Ser Arg Phe Gln Thr Val Asp Ser Ser Asn Ile Asp Gly Phe Val
 340 345 350

Asn Cys Thr Lys Ile Leu Gly Asn Leu Asp Phe Leu Ile Thr Gly Leu
 355 360 365

Asn Gly Asp Pro Trp His Lys Ile Pro Ala Leu Asp Pro Glu Lys Leu
 370 375 380

Asn Val Phe Arg Thr Val Arg Glu Ile Thr Gly Tyr Leu Asn Ile Gln
 385 390 395 400

Ser Trp Pro Pro His Met His Asn Phe Ser Val Phe Ser Asn Leu Thr
405 410 415

Thr Ile Gly Gly Arg Ser Leu Tyr Asn Arg Gly Phe Ser Leu Leu Ile
420 425 430

Met Lys Asn Leu Asn Val Thr Ser Leu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu
435 440 445

Ile Ser Ala Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Ala Asn Arg Gln Leu Cys Tyr
450 455 460

His His Ser Leu Asn Trp Thr Lys Val Leu Arg Gly Pro Thr Glu Glu
465 470 475 480

Arg Leu Asp Ile Lys His Asn Arg Pro Arg Arg Asp Cys Gly Glu Gly
485 490 495

Lys Gly Leu Leu Gly Gly Glu Asn Arg Glu Ser Gly Arg Arg Gly Leu
500 505 510

Lys Gly Leu Phe Cys Pro Arg Arg Gly Ser Arg Val Glu Gly Trp Asn
515 520 525

Gln Gly Glu Gly Gly Cys
530

<210> 5
<211> 183
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Ala Asn Asp Ala Leu Gln Val Leu Gly Leu Leu Phe Ser Leu
1 5 10 15

Ala Arg Gly Ser Glu Val Gly Asn Ser Gln Ala Val Cys Pro Gly Thr
20 25 30

Leu Asn Gly Leu Ser Val Thr Gly Asp Ala Glu Asn Gln Tyr Gln Thr
35 40 45

Leu Tyr Lys Leu Tyr Glu Arg Cys Glu Val Val Met Gly Asn Leu Glu
50 55 60

```

Ile Val Leu Thr Gly His Asn Ala Asp Leu Ser Phe Leu Gln Trp Ile
65                               70                               75                               80

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

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

Gly Lys Phe Ala Ile Phe Val Met Leu Asn Tyr Asn Thr Asn Ser Ser
115                             120                             125

His Ala Leu Arg Gln Leu Arg Leu Thr Gln Leu Thr Gly Gln Phe Pro
130                             135                             140

Met Val Pro Ser Gly Leu Thr Pro Gln Pro Ala Gln Asp Trp Tyr Leu
145                             150                             155                             160

Leu Asp Asp Asp Pro Arg Leu Leu Thr Leu Ser Ala Ser Ser Lys Val
165                             170                             175

Pro Val Thr Leu Ala Ala Val
180

```

<210> 6
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

```

<400> 6
Tyr Lys Tyr Pro Asp Val Gln Asn Glu Cys Arg Pro Cys His Glu Asn
1          5          10          15

Cys Thr Gln Gly Cys Lys Gly Pro Glu Leu Gln Asp Cys Leu Gly Gln
20          25          30

Thr Leu Val Leu Ile Gly Lys Thr
35          40

```

<210> 7
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 7

ES 2 434 017 T3

Cys Gln Pro Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp
1 5 10 15

Asp Lys Gly Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr
20 25 30

5 <210> 8
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador

15 <400> 8
gcaagctagc caucatgagg gcgaacgacg ctctgc 36

20 <210> 9
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador

30 <400> 9
gcaagcggcc gccccacctt tgggacatag tccccacaa ggc 43

35 <210> 10
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador

45 <400> 10
gcaagcggcc gcttgatgc cacctgaaca gtccattgc ag 42

<210> 11
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 11
gcaagcggcc gcacaccccc ttctccttg gtccatccc tc 42

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la evaluación *in vitro* del cáncer de mama que incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de
- 10 a) s-ErbB-3,
b) de manera opcional, uno o más marcadores diferentes de cáncer, y
c) la utilización del resultado del paso (a) y, de manera opcional, del paso (b) en la evaluación del cáncer de mama, en la que una concentración aumentada del s-ErbB-3 indica la presencia de cáncer de mama.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que también se caracteriza por que tal uno o más marcadores diferentes del paso (b) se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que también se caracteriza por que la concentración se mide mediante un método inmunológico.
4. La utilización del s-ErbB-3 en la evaluación *in vitro* del cáncer de mama en una muestra de suero o plasma.
- 20 5. La utilización de un anticuerpo dirigido contra el s-ErbB-3 en la evaluación *in vitro* del cáncer de mama en una muestra de suero o plasma, en la que una concentración aumentada de s-ErbB-3 indica la presencia de cáncer de mama.
- 25 6. La utilización de un panel de marcadores que incluye el s-ErbB-3 y, de manera opcional, uno o más marcadores diferentes de cáncer en la evaluación *in vitro* del cáncer de mama en una muestra de suero o plasma, en la que una concentración aumentada de s-ErbB-3 indica la presencia de cáncer de mama.
- 30 7. La utilización del panel de marcadores de acuerdo con la reivindicación 6, que también se caracteriza por que, de manera opcional, uno o más marcadores diferentes se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 15-3, el CA 19-9 y el ErbB-2.

Fig. 1

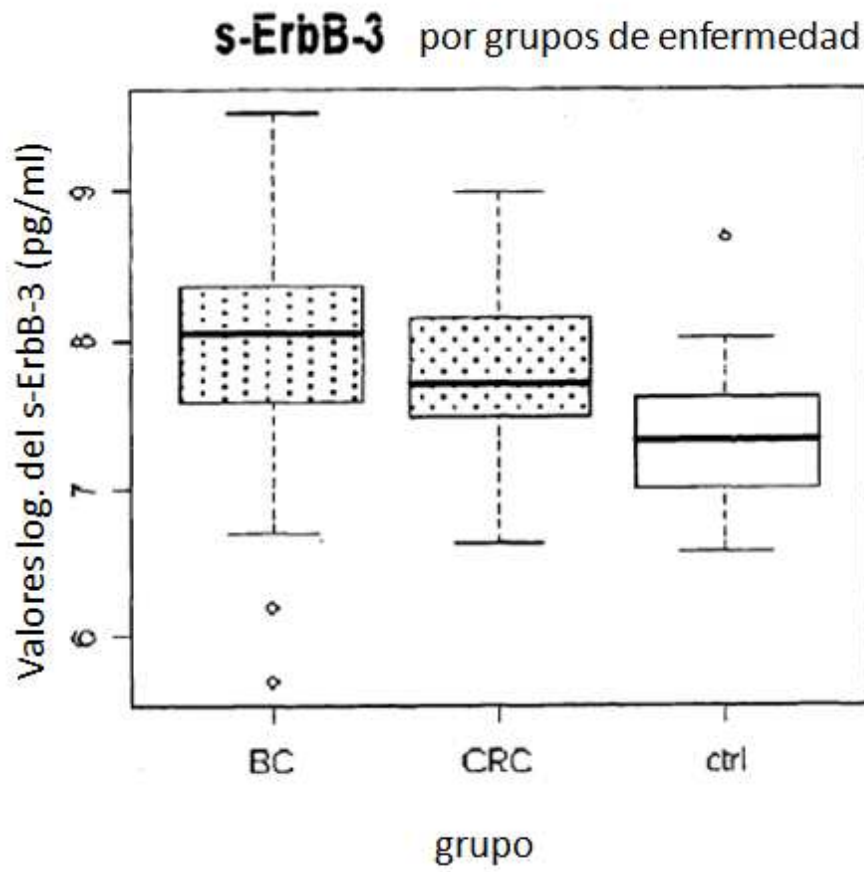


Fig. 2

s-ErbB-3 (pg/ml) de 39 pacientes con BC frente a 43 controles

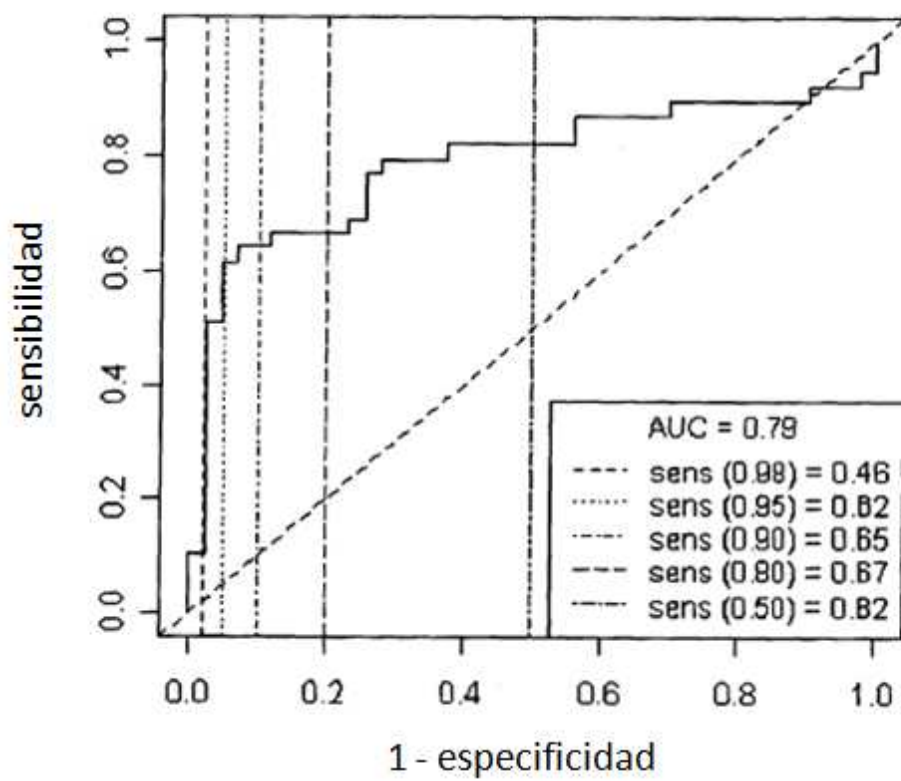


Fig. 3

s-ErbB-3 (pg/ml) de 110 pacientes con CRC frente a 43 controles

