

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 070**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2010 E 10732313 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2454596**

54 Título: **Flap endonucleasa-1 como marcador para el cáncer**

30 Prioridad:

**16.07.2009 EP 09165636**

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

**11.09.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WILD, NORBERT;  
HAGMANN, MARIE LUISE;  
KARL, JOHANN;  
RIEDLINGER, JULIA;  
ROESSLER, MARKUS y  
TACKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 493 070 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**

Flap endonucleasa-1 como marcador para el cáncer.

5 La presente invención se refiere a un método y su uso como se define en las reivindicaciones 1-11.

10 El cáncer sigue siendo el mayor desafío para la sanidad pública a pesar de los progresos en su detección y terapia. Las células cancerosas se caracterizan por la producción de proteínas marcadoras asociadas al cáncer. Las proteínas marcadoras asociadas al cáncer se encuentran tanto en los tejidos como en los fluidos corporales de un individuo que tiene las células cancerígenas. Sus niveles normalmente están bajos en los estadios tempranos del progreso carcinogénico e incrementan durante la progresión de la enfermedad y solo en casos raros se observan que las proteínas muestren un descenso del nivel en el curso de la progresión de la enfermedad. La detección sensible de estas proteínas es una estrategia ventajosa y prometedora para el diagnóstico del cáncer, en particular en el diagnóstico del cáncer en un estadio temprano. Los tipos más prevalentes de cáncer son el cáncer de mama (BC), el cáncer de pulmón (LC) y el cáncer colorrectal (CRC).

15 Las estrategias terapéuticas más importantes para los tumores sólidos son:

- 20 a) resección quirúrgica del tumor,
- b) quimioterapia,
- c) radioterapia,
- d) tratamientos con agentes biológicos, como los anticuerpos antitumorales o los anticuerpos anti-angiogénicos y
- e) una combinación de los métodos anteriores.

25 La resección quirúrgica de los tumores se acepta ampliamente como el tratamiento de primera línea para los tumores sólidos en estadio temprano. La mayoría de los cánceres, sin embargo, se detectan solamente cuando se vuelven sintomáticos, es decir, cuando los pacientes están ya en un estado bastante tardío de la progresión de la enfermedad.

30 La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión, y gravedad. Agrupa los pacientes con cáncer de forma que se puedan hacer generalizaciones sobre el pronóstico y elección de la terapia.

35 Los diferentes estadios de CRC se usan para clasificarse según los estadios de Dukes A a D. Hoy día, el sistema TNM es la clasificación que se utiliza más ampliamente de la extensión anatómica del cáncer. Representa un sistema de estadificación uniforme, aceptado internacionalmente. Hay 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 distantes). Los criterios TNM los publica la UICC (Unión Internacional contra el cáncer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds.), TNM Classification of Malignant Tumours, sexta edición (2002)). Una vez que se determina el estado TNM los pacientes se agrupan en estadios de enfermedad que se indican con números romanos que varían del I al IV que es el estadio de enfermedad más avanzado. La estadificación TNM y los estados de enfermedad de UICC se corresponden entre ellos como se muestra en la siguiente tabla tomada de Sobin y Wittekind (eds.), supra.

Tabla 1: Interrelación entre la estadificación TNM y los estados de enfermedad de UICC

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

45 Lo que es especialmente importante es que el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del CRC se traduce en un pronóstico mucho mejor. Los tumores CRC malignos del colon-recto se desarrollan a partir de tumores benignos, es decir, a partir de un adenoma. Por lo tanto, tienen mejor pronóstico los pacientes diagnosticados en estado de adenoma. Los pacientes diagnosticados en estados tempranos como Tis, N0, M0 o T1-3; N0; M0, si se tratan apropiadamente tienen más de un 90% de oportunidades de supervivencia 5 años después del diagnóstico en

comparación con la tasa de supervivencia a los cinco años del 10% de los pacientes diagnosticados cuando están ya presentes las metástasis distantes.

5 Los métodos de detección actuales incluyen métodos de diagnóstico por imagen, tales como rayos x o imágenes de resonancia magnética en teoría pueden ser apropiados al menos parcialmente para su uso como una herramienta exploratoria general. Sin embargo, son muy costosas y no asequibles para los sistemas de salud pública para un uso amplio y general para exploración de un gran número de sujetos, especialmente sujetos sin síntomas de que tengan un tumor.

10 Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento simple y de bajo coste para las evaluaciones de un tumor, por ejemplo, para identificar individuos sospechosos de tener un cáncer. Para este propósito, sería deseable un marcador tumoral general que sea detectable en fluidos corporales, por ejemplo, en la sangre, o el suero, o plasma o un panel de tales marcadores.

15 Hay ya varios marcadores tumorales en el suero en uso clínico. Por ejemplo, los marcadores de LC más importantes son: el fragmento soluble de citocaratina 19 de 30 kDa (CYFRA 21-1), antígeno carcinoembriogénico (CEA), enolasa específica de neuronas (NSE), y antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC). Sin embargo, ninguno de ellos cumple los criterios de sensibilidad y especificidad necesario para una herramienta de exploración (Thomas, L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/ Main, Alemania (2000)).

20 Con el fin de tener utilidad clínica, un nuevo marcador diagnóstico como único marcador debería ser comparable a otros marcadores conocidos en la técnica, o mejor. O, un nuevo marcador debería dar lugar a un progreso en la sensibilidad y/o especificidad diagnósticas sea utilizado solo o en combinación o con uno o más de otros marcadores, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnósticas de un ensayo se evalúa mejor por sus características operativas de receptor, que serán descritas posteriormente en detalle.

25 La sangre entera, suero o plasma son las fuentes de muestras utilizadas más ampliamente en la rutina clínica. La identificación de un marcador precoz que ayudara detección fiable del cáncer o proporcionara información pronóstica precoz podría dar lugar a un método que ayudaría mucho al diagnóstico y el manejo de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una urgente necesidad clínica para mejorar la evaluación del cáncer in vitro. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz del cáncer, ya que los pacientes diagnosticados precozmente tienen oportunidades de supervivencia mucho mayores al compararse con los que se diagnostican en un estadio de la enfermedad que ha progresado.

35 Se ha revisado recientemente la utilidad clínica de los marcadores bioquímicos en el cáncer de pulmón (Duffy, M.J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262).

40 Con respecto a los perfiles de marcadores que pretenden un mejor diagnóstico de cáncer de pulmón, se publicó un método (Schneider, J. y col., Int. J. Clin. Oncol. 7 (2002) 145-151) que utiliza algoritmos de clasificación basados en lógica difusa para combinar los niveles en el suero de CYFRA 21-1, NSE y proteína reactiva C (CRP) que es un marcador general de inflamación. Los autores anuncian una sensibilidad del 92% con una especificidad del 95%. Sin embargo en este estudio, por ejemplo se informa que la sensibilidad de CYFRA 21-1 como marcador único de cáncer es del 72% con una especificidad del 95%, lo que es significativamente más alta que en muchos otros informes de estudios. Duffy, M.J., in Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262, informa de una sensibilidad de entre el 46% y el 61%. Este poco habitual alto rendimiento conseguido por Schneider y col, plantea algunas dudas y puede ser debido a varios factores. En primer lugar, el colectivo de pacientes control parece ser más joven que el colectivo de los pacientes, es decir, los grupos no tienen una buena coincidencia de edades, y el colectivo de pacientes comprende muchos estadios avanzados. En segundo lugar e incluso más crítico, el rendimiento del algoritmo se verifica en muestras del grupo de entrenamiento que se usó para la determinación de los calificadores de la lógica difusa. Por tanto estos calificadores están, hablando estrictamente "hechos a medida", para este grupo y no es aplicable a un grupo de validación independiente. Bajo circunstancias normales, se espera que el mismo algoritmo aplicado a un grupo de validación más grande, independiente y bien equilibrado daría lugar a una reducción significativa del rendimiento total.

55 Era el objetivo de la presente invención investigar si se puede identificar un marcador bioquímico que se pueda utilizar para evaluar la enfermedad del cáncer. En particular, los inventores de la presente invención investigaron si un marcador bioquímico general podía identificarse para evaluar el cáncer en los fluidos corporales. En la presente invención se ha investigado la identificación, especialmente de un marcador bioquímico para la evaluación del cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de cérvix, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de riñón o cáncer de pulmón de células no pequeñas.

65 Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de la proteína Flap endonucleasa-1(FEN-1) puede al menos parcialmente superar algunos de los problemas de los marcadores que se conocen actualmente en el estado de la técnica.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un aumento en la concentración de FEN1 en la muestra de ensayo se asocia con la presencia de cáncer. Se podría mostrar que FEN1 es un marcador que no es específico para un solo tipo de cáncer, sino que es un marcador para diferentes tipos de cáncer, es decir un marcador tumoral general. Como parece que FEN1 es bastante específico para procesos tumorigénicos, el nuevo marcador tumoral FEN1 tiene un gran potencial para ser de utilidad clínica en varias clases de tipos tumorales.

Sorprendentemente, se ha descubierto en la presente invención que una determinación de la concentración de FEN1 en una muestra y/o fluido corporal, permite la evaluación del cáncer, por ejemplo, del cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de cérvix, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de riñón o cáncer de pulmón de células no pequeñas. Incluso más sorprendentemente, se ha descubierto que un aumento de la concentración de FEN1 o fragmentos de la misma en una muestra y/o un fluido corporal al compararse con controles normales es indicativo de riesgo de padecer un cáncer.

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer in vitro que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de FEN1 por un método de detección inmunológico y la utilización del resultado medido, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

#### Sumario de la Invención

En una realización la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer in vitro que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de a) proteína Flap endonucleasa-1 (=FEN1), b) opcionalmente uno o más marcadores de cáncer, y c) utilizar el resultado de la medición de la etapa (a) y opcionalmente la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en donde un aumento de la concentración de la proteína FEN1 es indicativo de cáncer.

Además la presente invención se refiere al uso de la proteína FEN1 en la evaluación in vitro del cáncer, donde un aumento de la concentración de una proteína FEN1 es indicativo de cáncer y donde la proteína FEN1 se detecta en una muestra de suero o plasma.

Además la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra FEN1 en la evaluación in vitro del cáncer, donde un aumento de la concentración de la proteína FEN1 en una muestra de suero o plasma es indicativo de cáncer.

Además la presente invención desvela el uso de un panel de marcadores que comprende la proteína FEN1 y opcionalmente uno o más de otros marcadores de cáncer en la evaluación in vitro de cáncer, donde un aumento en la concentración de la proteína FEN1 en una muestra de suero o plasma es indicativo de cáncer.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un aumento de la concentración de FEN1 en la muestra de ensayo se asocia con la existencia de un cáncer. Se podría mostrar que FEN1 es un marcador que no es específico de un único tipo de cáncer, sino que es un marcador para diferentes tipos de cáncer, es decir un marcador tumoral general. Como parece que FEN1 es bastante específico para los procesos tumorigénicos, el nuevo marcador tumoral FEN1 tiene un gran potencial de ser de utilidad clínica con varias clases de tipos tumorales.

#### Descripción detallada de la Invención

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer in vitro que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de FEN1 y la utilización de los resultados medidos, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

El método para evaluar el cáncer in vitro comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de (a) FEN1, (b) opcionalmente uno o más de otros marcadores de cáncer, y (c) la utilización del resultado de la medición de la etapa (a) y opcionalmente la (b) en la evaluación del cáncer, donde un aumento de la concentración de FEN1 es indicativo de cáncer.

El método de la presente invención es adecuado para la evaluación de muchos diferentes tipos de cáncer. El aumento de las concentraciones de la proteína FEN1 en una muestra de suero o plasma se ha encontrado por ejemplo en tipos de cáncer específicos como en el cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de cérvix, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de riñón o cáncer de pulmón de células no pequeñas, respectivamente.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la concentración de la proteína FEN1 se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar tipos de cáncer específicos tales como el cáncer de endometrio (EM), melanoma maligno (MM), cáncer de cérvix (CC), cáncer de cabeza y cuello (H/NC), cáncer ovárico (OC), cáncer de colon (CRC), cáncer de vejiga (BLC), cáncer de páncreas (PAC), cáncer de mama (BC), cáncer de

pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de próstata (PC), cáncer de riñón (KC) o cáncer de pulmón de células no pequeñas NSCLC) in vitro.

5 Una realización de la presente invención se refiere a una exploración en masa de una población para distinguir entre individuos que están libres probablemente de cáncer e individuos que se podrían clasificar como casos "sospechosos". El último grupo de individuos podrían entonces someterse a más procedimientos diagnósticos, por ejemplo, métodos de diagnóstico por imagen y otros medios adecuados.

10 Una realización más de la presente invención se refiere a paneles de marcadores tumorales mejorados que son adecuados para el diagnóstico del cáncer en general o paneles de marcadores tumorales que son adecuados para el diagnóstico de un tipo tumoral específico.

15 Actualmente, CYFRA 21-1 está considerado como el mejor de los marcadores tumorales para el cáncer de pulmón que se conocen hasta ahora. Incluso aunque no es específico de órgano se ha encontrado predominantemente en el tejido pulmonar. Se ha descrito que la sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón está entre un 46-61% con una especificidad del 95% respecto a otras enfermedades pulmonares benignas. El aumento de los niveles séricos de CYFRA 21-1 se ha asociado también con enfermedades pronunciadas benignas del hígado, insuficiencia renal y cáncer invasivo de vejiga. Se recomienda el ensayo de CYFRA 21-1, como terapia de seguimiento postoperatoria.

20 El CEA pertenece al grupo de antígenos carcinofoetales, normalmente producidos durante la embriogénesis. El CEA no es específico de órgano y se utiliza predominantemente para el control del cáncer colorrectal. Además de enfermedades malignas, también varias enfermedades benignas tales como cirrosis, bronquitis, pancreatitis y enfermedades autoinmunes se han asociado con el aumento de los niveles séricos de CEA. Con una especificidad del 95% para enfermedades benignas de pulmón su sensibilidad para el cáncer de pulmón se ha informado que es de 29-44%. El uso primario de CEA es el control del cáncer de colon, especialmente cuando la enfermedad ha metastatizado. Sin embargo, una variedad de cánceres pueden producir niveles elevados de CEA, incluyendo el cáncer de mama. Un uso preferido de CEA es el seguimiento de la terapia del cáncer de pulmón.

30 La NSE es un marcador tumoral para SCLC. Generalmente, se encuentran niveles aumentados de NSE en el suero en asociación con tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. Los niveles séricos aumentados se encuentran también en pacientes con enfermedades pulmonares benignas y enfermedades cerebrales, tales como meningitis y otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y en lesiones traumáticas de la cabeza. Mientras la sensibilidad para SCLC con una especificidad del 95% se ha informado que es del 60-87%, el rendimiento del ensayo de NSE para NSCLC es pobre (7-25%). La NSE se recomienda para el seguimiento de la terapia de SCLC.

40 El CA 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9), un antígeno Lewis sialilado (a) en un glucolípido es un marcador para cánceres gastrointestinales. Se produce en los epitelios gástricos, intestinales y pancreáticos fetales. Se pueden encontrar bajos niveles en tejidos adultos en el hígado, pulmones, y páncreas. No hay una correlación entre la masa tumoral y los valores del ensayo de CA 19-9. Por lo tanto la determinación de CA 19-9 no se puede utilizar para la detección precoz de carcinoma pancreático. Como la mucina se excreta exclusivamente por el hígado, incluso una ligera colestasis puede dar lugar a niveles claramente elevados del CA 19-9 sérico en algunos casos. El marcador se utiliza principalmente como ayuda en el seguimiento del estado de enfermedad en los pacientes que tienen un cáncer pancreático confirmado (sensibilidad del 70-87%). El 3-7% de la población tiene una configuración de grupo sanguíneo Lewis a negativo/ b negativo) y son incapaces de expresar mucina con el determinante reactivo CA 19-9. Esto se tiene que tener en cuenta a la hora de interpretar los hallazgos.

50 El CA 125 se encuentra en un alto porcentaje de los tumores ováricos no mucinosos de origen epitelial y se puede detectar en el suero. El carcinoma de ovarios representa aproximadamente el 20% de los tumores ginecológicos. Aunque los valores más altos de CA 125 se encuentran en pacientes que padecen carcinoma ovárico, los valores claramente elevados se observan también en enfermedades malignas del endometrio, mama, tracto gastrointestinal y otras varias enfermedades malignas. Se encuentran a veces valores aumentados en varias enfermedades ginecológicas benignas tales como quistes ováricos, metaplasia ovárica, endometriosis, útero miomatoso o cervicitis. Ligeras elevaciones de este marcador se pueden producir también en el principio de la gestación y varias enfermedades benignas (por ejemplo, en pancreatitis agudas y crónicas, enfermedades gastrointestinales benignas, insuficiencia renal, enfermedades autoinmunes y otras). Los niveles marcadamente elevados se han encontrado en enfermedades benignas del hígado tales como cirrosis y hepatitis. Las elevaciones extremas pueden encontrarse en cualquier tipo de ascitis debida a enfermedades malignas y benignas, Aunque CA 125 es un marcador relativamente inespecífico, hoy día es el marcador tumoral más importante para el seguimiento de la terapia y el progreso de pacientes con carcinoma ovárico grave. Se ha informado de una sensibilidad del 69-79% con una especificidad del 82-93%.

65 El PSA ("antígeno relacionado con la próstata") es un marcador ensayado habitualmente en los ensayos sanguíneos. El PSA parece tener una alta especificidad de tejido, la glicoproteína se encuentra en el epitelio prostático normal y en las secreciones pero no en otros tejidos. El PSA es altamente sensible de la presencia de un cáncer prostático. La elevación se correlaciona con el estado y el volumen tumoral. Predice la recurrencia y la

respuesta al tratamiento. Finalmente, el antígeno tiene un valor pronóstico ya que los pacientes con valores muy altos antes de la cirugía tienen probabilidades de recurrencia.

La NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa; Swiss-PROT: P40261) tiene un peso molecular aparente de 29,6 kDa y un punto isoeléctrico de 5,56. La NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida y otras piridinas. Esta actividad es importante para la biotransformación de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. Se ha informado de que la proteína se expresa predominantemente en el hígado y se localiza en el citoplasma. La NNMT se ha clonado del ADNc del hígado humano y contenía una fase de lectura abierta de 792 nucleótidos que codifica una proteína de 264 aminoácidos con una masa molecular calculada de 29,6 kDa (Aksoy, S. y col., J. Biol. Chem. 269 (1994) 14835-14840). Se sabe poco en la bibliografía sobre el papel potencial de la enzima en el cáncer humano. En un trabajo, la actividad enzimática aumentada de la NNMT hepática se informó como un marcador de la caquexia por cáncer en ratones (Okamura, A. y col., Jpn. J. Cancer Res. 89 (1998) 649-656). En un reciente informe, se ha demostrado la regulación negativa del gen NNMT en respuesta a la radiación en líneas celulares sensibles a la radiación (Kassem, H. y col., Int. J. Cancer 101 (2002) 454-460). Se ha encontrado recientemente (documento WO 2004/057336) que NNMT será interesante en la evaluación del CRC.

El ProGRP es un marcador tumoral, útil en la detección y seguimiento de SCLC. El aumento de los niveles séricos se encuentran también en pacientes con enfermedades no malignas pulmonares/pleurales, tal como la fibrosis pulmonar idiopática o sarcoidosis. Aunque la sensibilidad para proGRP en el campo de SCLC (con una especificidad del 95%) se ha informado que es del 47-86%, el rendimiento del ensayo del proGRP en el campo de NSCLC es pobre porque la sensibilidad informada es baja (10%).

El SCC se identificó originalmente en el CA de células escamosas del cérvix. La sensibilidad para SCC para LC es baja en general (18-27%). Por lo tanto, el ensayo de SCC se determina como que no es adecuado para la exploración. Sin embargo, debido a la alta sensibilidad para el CA de células escamosas, un uso preferido del SCC es el seguimiento de la terapia incluso cuando CYFRA 21-1 generalmente actúa mejor.

p53 (TP53, antígeno tumoral celular p53, supresor tumoral p53 o fosfoproteína p53) es un factor de transcripción que induce la detención del crecimiento celular o apoptosis (Appella, E. y col., Pathol. Biol. 48 (2000) 227-245). El p53 actúa como un supresor tumoral en muchos tipos de tumores y que inactiva mutaciones en su gen que son los acontecimientos genéticos más comunes que promueven el desarrollo del cáncer en seres humanos (revisado en Olivier, M. y Petitjean, A., Cancer Gene Ther. 1 (2009) 1-12; Petitjean, A. y col., Oncogene 26 (2007) 2157-2165). La mutación de p53 se observa en el 40-50% de los carcinomas colorrectales, y se asocian con la agresividad del carcinoma (Soussi T., Cancer Res. 60 (2000) 1777-1788). Las mutaciones en el gen p53 dan lugar no solo a la alteración de la función de las proteínas, sino también a la expresión de antígenos asociados al tumor (TAA) y el inicio de la respuesta autoinmune y la generación de anticuerpos anti- p53 en el suero de los pacientes con cáncer (Zhang, J.Y. y col., Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 12 (2003) 136-143; Soussi T., Cancer Res. 60 (2000) 1777-1788).

La detección de los anticuerpos anti- p53 en el suero humano es una herramienta en alza para el diagnóstico y manejo del cáncer. Dependiendo del tipo de cáncer, la frecuencia de autoanticuerpos anti- p53 en el suero varía de 17,8% (CRC) a 16,1% (LC) y 7,8% (cáncer de mama) (Tan, E.M. y Zhang, J., Immunological Reviews 222 (2008) 328-340; Zhang, J.Y. y col., Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 12 (2003) 136-143).

La Seprasa, también conocida como proteína de activación de fibroblastos (= FAP), es una glucoproteína de 170 kDa que tiene una actividad gelatinasa y dipeptidil peptidasa que consiste en dos unidades monoméricas idénticas de Seprasa (Pineiro-Sanchez, M.L. y col., J. Biol. Chem. 272 (1997) 7595-7601; Park, J.E. y col., J. Biol. Chem. 274 (1999) 36505-36512). El monómero de la membrana humana que se une a la Seprasa comprende 760 aminoácidos. Se ha predicho que la Seprasa humana tiene sus 4 primeros restos del extremo N en el citoplasma de fibroblastos, seguidos de un dominio transmembrana de 21 restos y un dominio catalítico en el extremo C extracelular de 734 restos (Goldstein, L.A. y col., Biochim Biophys Acta. 1361 (1997) 11-19; Scanlan, M.J. y col., Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994) 5657-5661). Una forma de la proteína Seprasa humana más corta es conocida por un experto en la técnica como Seprasa soluble o enzima que escinde la antiplasma circulante (= APCE) (Lee, K.N. y col., Blood 103 (2004) 3783-3788; Lee, K.N. y col., Blood 107 (2006) 1397-1404), que comprende las posiciones 26-760 del registro número Q12884 de la base de datos Swissprot. El dímero de la Seprasa soluble es una glucoproteína de 160 kDa que consisten en dos unidades de proteína Seprasa soluble monoméricas idénticas. Piñeiro-Sánchez y col (supra) descubrió que el aumento de expresión de Seprasa se correlaciona con el fenotipo invasivo del melanoma humano y las células de carcinoma. Henry, L.R. y col., Clin. Cancer Res. 13 (2007) 1736-1741 describe que los pacientes con tumor de colon que tienen altos niveles de Seprasa del estroma es más probable que tengan una progresión agresiva de la enfermedad y un potencial de desarrollo de metástasis o recurrencia.

La dipeptidil peptidasa IV (= SPPIV), que se conoce también como CD26, es una molécula de la superficie celular de 110 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana comprende 766 aminoácidos. Contiene la actividad intrínseca de la dipeptidil peptidasa IV que elimina selectivamente el dipéptido del extremo N en péptidos con prolina o alanina en la tercera posición de aminoácidos. Interactúa con varias moléculas extracelulares y también está implicada en las cascadas de transducción de la señal. Las actividades multifuncionales de la DPPIV

- humana dependen del tipo celular y de las condiciones intra o extracelulares que tienen influencia en su papel como enzima proteolítica, receptor celular de superficie, proteína que interactúa co-estimuladora y mediador de la transducción de la señal. La DPPIV humana tiene un corto dominio citoplasmático de la posición de aminoácidos 1 a 6, una región transmembrana de la posición de aminoácidos 7 a 28, y un dominio extracelular de la posición de aminoácidos 29 a 766 con actividad intrínseca dipeptidil peptidasa IV (DPPIV). La dipeptidil peptidasa IV soluble humana (= DPPIV soluble) comprende las posiciones 29 a 766 del número de registro P27487 de la base de datos Swissprot. El dímero de la DPPIV soluble es una glucoproteína de 170 kDa que consiste en dos unidades idénticas monoméricas solubles de DPPIV.
- El complejo soluble DPPIV/Seprasa (= DPPIV/Seprasa) se refiere al complejo soluble formado por un homodímero soluble DPPIV (170 kDa) y un homodímero soluble de Seprasa (160 kDa) con un peso molecular de 330 kDa. Bajo ciertas condiciones este complejo puede formar un complejo doble que tiene un peso molecular de 660 kDa.
- La presente invención también se refiere a un método para evaluar el cáncer in vitro por marcadores bioquímicos que comprende la medición en una muestra de plasma o suero de la concentración de proteína FEN1 y uno o más de otros marcadores específicos de cáncer, y utilizando los resultados medidos, particularmente las concentraciones determinadas, en la evaluación del cáncer. Los marcadores preferidos para su uso en combinación con FEN1 son, por otra parte, marcadores que son marcadores tumorales generales (es decir, marcadores que no son específicos para un solo tipo tumoral) o, por otra parte, marcadores tumorales específicos (marcadores que son específicos para un único tipo tumoral). Los marcadores preferidos, por ejemplo, para la evaluación del cáncer son Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y complejo DPPIV/Seprasa soluble (= DPPIV/Seprasa). Estos marcadores se pueden utilizar individualmente o en cualquier combinación junto con FEN1.
- La presente invención también se refiere a un método para evaluar el cáncer in vitro por marcadores bioquímicos, que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de FEN1 y uno más de otros marcadores de cáncer y utilizando los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer. Se prefiere que el uno o más de otros marcadores se seleccionen de entre el grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa.
- La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos el marcador FEN1 y al menos uno de otros marcadores tumorales, seleccionados de entre el grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa, en la evaluación del cáncer.
- Preferentemente, la presente invención se refiere a un método de evaluación del cáncer in vitro por marcadores bioquímicos, que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de FEN1 y uno o más de otros marcadores del cáncer y utilizando los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer. Se prefiere que el uno o más de otros marcadores se seleccione de entre el grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa,
- La presente invención también se refiere al uso de la proteína FEN1 en la evaluación del cáncer, en el que un aumento de la concentración de FEN1 es indicativo de cáncer.
- La presente invención también se refiere al uso de la proteína FEN1 en la evaluación del cáncer in vitro, donde la muestra es suero o plasma.
- La presente invención también se refiere al uso de FEN1 en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, particularmente de EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC o NSCLC.
- La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra la proteína FEN1 en la evaluación del cáncer, donde un aumento de la concentración de FEN1 en una muestra de suero o plasma es indicativo de cáncer.
- Preferentemente se detecta la FEN1 en un formato de inmunoensayo tipo sándwich (=inmunoensayo sándwich).
- El término "medición" preferentemente comprende una medición cualitativa, semi-cuantitativa o cuantitativa de la proteína FEN1 en una muestra. En una realización preferida la medición es una medición semi-cuantitativa, es decir, se determina si la concentración de FEN1 está por encima o por debajo de un valor de corte. Como apreciará un experto en un ensayo Sí (presencia) o No (ausencia), el ensayo de sensibilidad se fija habitualmente para coincidir con el valor de corte. Un valor de corte puede determinarse por ejemplo, a partir del ensayo de un grupo de individuos sanos. Preferentemente el punto de corte se fija para dar un resultado en una especificidad del 90%, también se prefiere que el punto de corte se fije para dar un resultado en una especificidad del 95%, o también se prefiere que el punto de corte se fije para dar un resultado en una especificidad del 98%. Un valor por encima del

valor de corte por ejemplo será indicativo de la presencia de cáncer. En particular un valor por encima del valor de corte puede ser indicativo de la presencia de EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC y/o NSCLC. En una realización más preferida la medición de FEN1 es una medición cuantitativa. En más realizaciones la concentración de FEN1 se correlaciona con una pregunta diagnóstica subyacente como por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

En otra realización preferida, el punto de corte se ajusta para dar un resultado en una sensibilidad del 90%, también se prefiere que el punto de corte se fije para dar un resultado en una sensibilidad del 95%, o también se prefiere que el punto de corte se fije para dar un resultado en una sensibilidad del 98%.

Un valor por debajo del valor de corte puede por ejemplo ser indicativo de la ausencia de cáncer. En particular un valor por debajo del valor de corte por ejemplo puede ser indicativo de la ausencia de EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC y/o NSCLC.

En una realización más preferida la medición de FEN1 es una medición cuantitativa. En más realizaciones la concentración de FEN1 se correlaciona con una pregunta diagnóstica subyacente como por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

La proteína FLAP endonucleasa-1 (=FEN1), Swiss-PROT ID: P39748, es una proteína nuclear de 380 aminoácidos con un peso molecular de 42,6 kDa, que se caracteriza por la secuencia que se da en la SEC ID N° 1 (Fig. 14). La secuencia codificante de la FEN1 humana la predijo Murray en 1994 (Murray J.M. y col., Mol. Cell. Biol. 14 (1994) 4878-4888) a partir de una secuencia clonada de nuevo. Basándose en la función de la rad2 homóloga de levaduras se sugirió una función en la segregación cromosómica de alta fidelidad y en la reparación del daño en el ADN inducido por UV. Como estos procesos son fundamentales en la integridad cromosómica, los autores también propusieron la implicación de la proteína en evitar el cáncer. El locus del gen en el cromosoma 11 humano se identificó más tarde por Hiraoka y col. (Hiraoka L.R. y col., Genomics 25 (1995) 220-225) y Taylor y col. (Taylor T.D. y col., Nature 440 (2006) 497-500). Las funciones de FEN1 y sus interacciones con el ADN ha sido el foco de numerosos estudios (Robins P. y col., J. Biol. Chem. 269 (1994) 28535-28538), Shen B. y col., J. Biol. Chem. 271 (1996) 9173-9176, Hasan S. y col., Mol. Cell 7 (2001) 1221-1231, Qiu J. y col., J. Biol. Chem. 277 (2002) 24659-24666 y Sakurai S. y col., EMBO J. 24 (2005) 683-693). Se han demostrado varias funciones enzimáticas en el metabolismo de ADN incluyendo la actividad endonucleasa que escinde la estructura de solapa protuberante 5' generada por el desplazamiento en la síntesis cuando la ADN polimerasa encuentra el extremo 5' de un fragmento de Okazaki corriente abajo. Adicionalmente la FEN1 también posee una actividad exonucleasa 5' a 3' en ADN bicatenario con nicks y gaps, y muestra actividad RNasa H. Estas se han revisado en Shen y col (Shen B. y col. BioEssays 27 (2005) 717-729) or Liu y col. (Liu Y. y col., Annu. Rev. Biochem. 73 (2004) 589-615).

Se ha demostrado que solo las mutaciones recientes, la expresión sin regulación y los defectos funcionales de FEN1 están implicados en el desarrollo de enfermedades. Kucherlapati y col. (Kucherlapati M. y col., PNAS 99 (2002) 9924-9929) relacionó la FEN1 con la progresión tumoral. Sato y col (Sato M. y col., Oncogene 22 (2003) 7243-7246) ha demostrado un aumento de la expresión de FEN1 en el cáncer de pulmón mientras que Lam y col (Lam J.S. y col., BJU International 98 (2006) 445-451) encontró sobre-expresión en cáncer de próstata. Singh y col. (Singh P. y col., Mol. Cancer Res. 6 (2008) 1710-1717) encontró sobre-expresión de FEN1 en cáncer de mama y otros cánceres que estaban regulados por hipometilación. Una relación mucho más amplia con procesos de enfermedad fue publicado por Zheng y col. (Zheng L. y col., Nature medicine 13 (2007) 812-819) donde los autores pudieron demostrar que las mutaciones de la FEN1 pueden dar lugar a autoinmunidad, inflamación crónica y cáncer.

Aunque la implicación de FEN1 en enfermedades se ha establecido ahora claramente, no se han publicado estudios de la proteína FEN1 como biomarcador de estas enfermedades. Como mucho los estudios disponibles se enfocan en métodos basados en ADN o ARN. Esta es la línea de patentes sobre la FEN1 (documento WO 2008/089577: Matriz genética del cáncer de mama, documento WO 2008/151110: Diagnóstico molecular y tipado de variantes de cáncer de pulmón, documento WO2008/077165: Grupo de marcadores tumorales, documento WO 2007/073220: Predicción pronóstica del cáncer colorrectal, documento US 5.874.283: Endonucleasa específica de flap de mamíferos).

Como se utiliza en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tienen un significado asociado en esta sección

Los artículos "un" y "uno" como se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un marcador" significa un marcador o más de un marcador. La expresión "al menos" se usa para indicar que se pueden presentar opcionalmente uno o más objetos. A modo de ejemplo, un panel de marcadores comprende al menos (los marcadores) FEN1 y CYFRA 21-1 puede comprender opcionalmente uno o más de otros marcadores.

La expresión "uno o más" significa 1 a 50, preferentemente 1 a 20, también se prefieren 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15.

Las expresiones “chip”, “bio-chip”, “chip de polímero”, “chip de proteína” se utilizan de manera intercambiable y se refiere a la colección de un gran número de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos colocados en un sustrato compartido que podría ser una o parte de una placa de silicio, una tira de nylon, una tira de plástico, o un portaobjetos de cristal.

5 Una “matriz”, “macromatriz” o “micromatriz” es una colección de sustancias creada intencionadamente, tal como moléculas, marcadores, aperturas, microenrollados, detectores y/o sensores, fijados o fabricados sobre un sustrato o superficie sólida, tal como un cristal, plástico, chip de silicio u otros materiales que forman una matriz. Las matrices se pueden utilizar para medir los niveles de un gran número, por ejemplo, decenas, miles o millones, de reacciones o combinaciones simultáneamente. Una matriz también puede tener un pequeño número de sustancias, por ejemplo, una, unas pocas, una docena. Las sustancias en la matriz pueden ser idénticas o diferentes unas de otras. La matriz puede tomar una variedad de formatos, por ejemplo, bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de moléculas inmovilizadas, bibliotecas de anticuerpos inmovilizados, bibliotecas de compuestos unidos a perlas de resina, chips de sílice, u otros soportes sólidos. La matriz podría ser una macromatriz o una micromatriz, dependiendo del tamaño del elemento sobre la matriz. Una macromatriz generalmente contiene tamaños de elemento de aproximadamente 300 micras o mayores que se pueden visualizar por escáner de gel y transferencia. Una micromatriz generalmente contendría elementos de tamaños menores de 300 micras.

20 Un “soporte sólido” es un material insoluble, funcionalizado, polimérico al que se pueden fijar o unir covalentemente los miembros de la biblioteca o los reactivos (a menudo por medio de un enlazador) que se inmovilizan o que les permite separarse fácilmente (por filtración, centrifugación, lavado, etc.) de los reactivos excesivos, productos secundarios de reacción solubles, o disolventes.

25 El término “marcador” o “marcador bioquímico” como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula para usarse como una diana para analizar una muestra de ensayo de un paciente. Ejemplos de tales moléculas diana son proteínas y polipéptidos. Se contempla que las proteínas o polipéptidos utilizados como marcadores en la presente invención incluyen variantes de dichas proteínas que se encuentran naturalmente así como fragmentos de dichas proteínas o dichas variantes, en particular, fragmentos detectables inmunológicamente. Los fragmentos detectables inmunológicamente comprenden preferentemente al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15, o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la técnica reconocería qué proteínas que se liberan por las células o están presentes en la matriz extracelular se pueden dañar, por ejemplo, durante la inflamación, y podrían degradarse o escindirse en tales fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en forma inactiva, que puede posteriormente activarse por proteólisis. Como apreciará un experto en la técnica, las proteínas o fragmentos de las mismas pueden también ser parte de un complejo. Tal complejo también se puede utilizar como un marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador están codificadas por el mismo gen, pero pueden diferenciarse en su punto isoelectrónico (= PI) o el peso molecular (= MW), o ambos por ejemplo, como resultado de un proceso alternativo de ARNm o pre-ARNm. La secuencia de aminoácidos de una variante es idéntica en el 95% o más a la secuencia del marcador correspondiente. Además, o el polipéptido marcador alternativo o una variante del mismo puede conllevar una modificación post-traducciona. Ejemplos no limitantes de modificaciones post-traduccionales son la glucosilación, acilación y/o fosforilación.

45 Las proteínas FEN1, particularmente las formas solubles de proteínas FEN1 y/o los fragmentos de las mismas, se detectan en muestras apropiadas. Las muestras preferidas son muestras de tejidos, lisados de tejidos o fluidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, orina, lavado bronquialveolar (= BAL; preferido en el caso de sospecha de cáncer de pulmón (LC)) o fluido de revestimiento epitelial (= ELF; preferido en el caso de sospecha de LC). Preferentemente, la muestra se deriva de un sujeto humano, por ejemplo un paciente con un tumor o una persona en riesgo de tener un tumor o una persona de la que se sospecha que tiene un tumor. También una FEN1 preferida se detecta en una muestra de suero o plasma.

50 En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, se determina la concentración de FEN1. En una realización, el marcador FEN1 se mide específicamente a partir de una muestra por medio del uso de un agente de unión específica

55 Un agente de unión específica es, por ejemplo, un receptor para la FEN1, una lectina que se une a FEN1 o un anticuerpo reactivo con FEN1. Un agente de unión específica tiene al menos una afinidad de  $10^7$  l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específica tiene preferentemente una afinidad de  $10^8$  l/mol para su molécula diana.

60 Como apreciará un experto en la técnica el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unirán significativamente al agente específico para la FEN1. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana da un resultado de una afinidad de unión que es como mucho solamente del 10% o menos, solo del 5% o menos, solo del 2% o menos o solo del 1% o menos de la afinidad a la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico cumplirá ambos criterios mínimos anteriores para la afinidad, así como para la especificidad.

65

Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo reactivo con FEN1. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión al antígeno de tales anticuerpos, una cadena de anticuerpo única, así como construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

5 Se puede utilizar cualquier fragmento de anticuerpo que mantenga los criterios anteriores de un agente de unión específica. Los anticuerpos se generan por procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo, los que se describen en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, el libro entero, especialmente las páginas 43-78). Además, el experto es bien consciente de  
10 métodos basados en inmunoabsorbentes que se pueden utilizar para el aislamiento específico de anticuerpos. Por estos medios la calidad de los anticuerpos policlonales y por tanto su rendimiento en inmunoensayos pueden aumentar (Tijssen, P., supra, páginas 108-115).

15 Para los logros que se desvelan en la presente invención se pueden utilizar los anticuerpos policlonales producidos en conejos. Sin embargo se pueden utilizar claramente anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, ovejas o cabras, así como anticuerpos monoclonales. Como los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cualquier cantidad que se necesite con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para rutina clínica. La generación y uso de los anticuerpos monoclonales para FEN1 en un método de acuerdo con la presente invención, respectivamente, representa además otras realizaciones preferidas.

20 Los inmunoensayos son bien conocidos por los expertos. Los métodos para llevar a cabo tales ensayos así como las aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en los libros de consulta relacionados. Ejemplos de libros de consulta relacionados son Tijssen, P., Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, En: Practice and theory of enzyme immunoassays, pp. 221-278, Burdon, R.H. y v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990), y varios volúmenes de Methods in Enzymology, Colowick, S.P., y Caplan, N.O. (eds.), Academic Press), que trata de métodos inmunológicos de detección, especialmente en los volúmenes 70, 73, 74, 84,  
25 92 y 121.

30 Como apreciará un experto en la técnica ahora que se ha identificado la FEN1 como un marcador que es útil en la evaluación del cáncer, preferentemente el cáncer de pulmón, se pueden utilizar varios procedimientos de inmunodiagnóstico para conseguir un resultado comparable al éxito de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Tales estrategias comprenden entre otras el uso de péptidos sintéticos, que representan un epítipo de FEN1 para la inmunización. De manera alternativa se puede utilizar la inmunización de ADN también conocida como vacunación de ADN.

35 Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específica para FEN1 bajo condiciones apropiadas para formar un complejo de agente de unión FEN1. Tales condiciones no se tienen que especificar, ya que un experto sin ningún esfuerzo inventivo puede fácilmente identificar tales condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo agente de unión FEN1 se mide y se usa en la evaluación del  
40 cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón. Como apreciará el experto en la técnica hay numerosos métodos para medir la cantidad del complejo agente de unión específica FEN1 como se describe en detalle en los libros de consulta relevantes (como figura, por ejemplo, en Tijssen P., supra, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

45 Preferentemente se detecta la FEN1 en un ensayo con formato tipo sándwich (= inmunoensayo sándwich). En tal inmunoensayo sándwich, un primer agente de unión específica fijado en un soporte sólido se utiliza para capturar la FEN1 en un lado y un segundo agente de unión específica, que está marcado para ser detectable directa o indirectamente, se usa en el otro lado. Los agentes de unión específica utilizados en un ensayo de formato tipo sándwich puede ser una combinación de anticuerpos dirigidos específicamente contra FEN1.

50 Un "marcador de cáncer" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que si se combina con el marcador FEN1, añade una 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 de EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC o NSCLC. La información se considera relevante o de valor aditivo si a una determinada especificidad, la sensibilidad, o si a una sensibilidad dada, la especificidad, respectivamente,  
55 es estadísticamente significativa con un nivel de significación  $p = 0,05$ ,  $0,02$ ,  $0,01$  o menor. Preferentemente, el uno o más de otros marcadores tumorales se seleccionan de entre el grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa.

60 El término "muestra" como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra biológica obtenida con el fin de su evaluación in vitro. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestra del paciente preferentemente puede comprender cualquier fluido corporal. Las muestras preferidas son muestras de tejidos, lisados tisulares o fluidos corporales, tales como sangre completa, suero, plasma, orina, lavado bronquioalveolar (= BAL; preferida en el caso de sospecha de cáncer de pulmón (LC)) o fluido del revestimiento epitelial (= ELF; preferido en sospecha de LC), siendo el suero o el plasma las más preferidas.  
65

La expresión “muestra de tejido” y/o “sección de tejido” como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra biológica que se toma de un paciente durante una cirugía, resecciones terapéuticas o una biopsia (por ejemplo, una biopsia incisional, una biopsia escisional, una biopsia de centro o una biopsia por aspiración con aguja) que implica retirar células o tejidos con el fin de su evaluación in vitro. Cuando se lleva a cabo un análisis de acuerdo con la presente invención, el material de la muestra tisular se consigue habitualmente por medio del uso de un microtomo. En cualquier método de realización desvelado que implica una muestra biológica, tal muestra biológica puede estar (aunque no es necesario) montada en un portaobjetos de microscopio, es una sección de tejido (tal como una sección de tejido fijada en formalina y embebida en parafina), y/o es un tejido neoplásico (tal como, un cáncer de pulmón, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer gástrico, o un glioblastoma).

Un “lisado de tejido”, “lisado”, “muestra de lisado”, “extracto de tejido” o “extracto celular” como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra o un material de muestra biológica que comprende tejido o células lisados, es decir, en los que la integridad estructural del tejido o las células se ha alterado. Para liberar los contenidos de las células o una muestra de tejido, el material se trata habitualmente con enzimas y/o con productos químicos para disolver, degradar o alterar las paredes celulares y las membranas celulares de tales tejidos o células. El experto en la técnica está totalmente familiarizado con métodos apropiados para obtener los lisados. Este proceso se engloba en el término “lisis”.

La expresión “evaluación de un cáncer” y en particular “evaluación de un cáncer como el cáncer de endometrio (EM), melanoma maligno (MM), cáncer de cérvix (CC), cáncer de cabeza y cuello (H/NC), cáncer ovárico (OC), cáncer de colon (CRC), cáncer de vejiga (BLC), cáncer de páncreas (PAC), cáncer de mama (BC), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC), cáncer de próstata (PC), cáncer de riñón (KC) o cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)” se utiliza para indicar que el método de acuerdo con la presente invención ayudará (solo o junto con otros marcadores o variables, por ejemplo, en el criterio expuesto por la UICC (véase anteriormente), por ejemplo, al médico para establecer o confirmar la ausencia o la presencia de cáncer o para ayudar al médico en el pronóstico, la detección de recurrencias (seguimiento de los pacientes tras la cirugía) y/o el control del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

Como apreciará un experto en la técnica, cualquiera de tales evaluaciones se hace in vitro. La muestra del paciente se desecha después. La muestra del paciente solamente se utiliza para el método de diagnóstico in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de nuevo al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo sangre completa, suero o plasma.

A menos de que se señale otra cosa, los términos técnicos se utilizan de acuerdo al uso convencional. Las definiciones de términos comunes en biología celular y molecular se pueden encontrar en Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287 9); Kendrew, J. y col. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9); y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicada por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8).

En una realización preferida de la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer in vitro por marcadores bioquímicos, que comprenden la medición en una muestra de la concentración de FEN1 y el uso de la concentración determinada en la evaluación del cáncer.

Los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar sorprendentemente un aumento de concentración del marcador FEN1 en un porcentaje significativo de pacientes con cáncer en particular con EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC o NSCLC. Más sorprendentemente los inventores han sido capaces de demostrar que el aumento de la concentración de FEN1 en tal muestra obtenida de un individuo se puede utilizar en la evaluación del cáncer, en particular de las enfermedades de cáncer mencionadas anteriormente.

El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un solo acontecimiento o proceso causara la enfermedad respectiva, por ejemplo como en las enfermedades infecciosas. En todos los otros casos el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende completamente como es el caso de muchos tipos de cáncer. Como apreciará un experto, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con el 100% de especificidad y que al mismo tiempo tenga un 100% de sensibilidad para una enfermedad multifactorial determinada. Por supuesto, los marcadores bioquímicos, por ejemplo, Cyfra 21-1, CEA, NSE, o como se muestra en el presente documento, FEN1, se pueden utilizar para evaluar con cierta probabilidad o valor predictivo por ejemplo, la presencia, ausencia o la gravedad de una enfermedad. Por lo tanto, en los diagnósticos clínicos de rutina, generalmente se consideran juntos varios síntomas clínicos y marcadores biológicos en el diagnóstico, tratamiento y manejo de la enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos pueden o bien determinarse individualmente o en una realización preferida de la invención pueden medirse simultáneamente utilizando un chip o una tecnología de matriz basada en perlas. Las concentraciones de los biomarcadores son entonces o bien interpretados independientemente, por ejemplo utilizando un punto de corte para cada marcador o se pueden combinar para la interpretación.

En una realización preferida más la evaluación del cáncer de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo por un método que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de a) proteína FEN1, b) uno o más de otros marcadores de cáncer, y c) utilizar los resultados medidos, por ejemplo la concentración determinada en la etapa (a) y la etapa (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer.

5 En la evaluación del cáncer el marcador FEN1 es ventajoso en uno o más de los siguientes aspectos: exploración; ayuda al diagnóstico; pronóstico; control de la terapia tal como la quimioterapia, radioterapia, e inmunoterapia.

Exploración:

10 La exploración se define como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar individuos, por ejemplo, individuos en riesgo, por medio de indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de un cáncer. Por ejemplo, una población de exploración para cáncer de pulmón está compuesta de individuos de los que se sabe que tienen una media más alta de riesgo de cáncer de pulmón, como fumadores, exfumadores, y trabajadores expuestos a uranio, cuarzo, o asbestos.

15 En la realización preferida cualquier fluido corporal tal como sangre completa, plasma o suero se utiliza como una muestra en la exploración del cáncer.

20 En muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico único en la circulación cumplirá los criterios de sensibilidad y especificidad que se necesitan para los fines de exploración. Esto parece ser cierto también para el cáncer y en particular para el cáncer de pulmón. Se espera que un panel de marcadores que comprenda una pluralidad de marcadores se tenga que utilizar en la exploración del cáncer. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador FEN1 formará parte integral de un panel de marcadores apropiado con fines de exploración.

25 La presente invención por lo tanto se refiere al uso de FEN1 como un marcador de un panel de marcadores, es decir un panel de marcadores que comprende la FEN1 y uno o más marcadores adicionales con fines de exploración del cáncer. En particular, la presente invención se refiere al uso de FEN1 como un marcador de un panel de marcadores generales de cáncer. Tal panel de marcadores comprende el marcador FEN1 y uno o más marcadores adicionales, por ejemplo marcadores generales de cáncer y/o marcadores para los tipos de cáncer mencionados anteriormente.

30 Una combinación de marcadores mejora significativamente el valor del ensayo molecular. Primero, la sensibilidad del ensayo se mejora significativamente utilizando el panel de marcadores. Segundo, modelos estadísticos sofisticados permiten el análisis de la curva ROC del ensayo multimarcador, y los resultados confirman que la precisión del diagnóstico aumenta significativamente en comparación con el mejor marcador individual.

35 La FEN1 probablemente también contribuye a los paneles de marcadores para ciertos tipos específicos de cáncer, por ejemplo, EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC o NSCLC.

40 Los presentes datos indican además que ciertas combinaciones de marcadores son ventajosas en la exploración del cáncer.

45 Por ejemplo, en referencia a la realización preferida de exploración de cáncer, la presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende FEN1 y al menos uno o más marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa.

Ayuda al diagnóstico:

50 Los marcadores pueden ayudar al diagnóstico diferencial entre la enfermedad benigna frente a la maligna en un órgano en particular, ayuda a distinguir entre diferentes tipos histológicos de tumor, o a establecer los valores de marcador base antes de la cirugía.

55 Hoy día, métodos importantes que se utilizan en la detección del cáncer de pulmón son la radiología y/o la tomografía computarizada (CT). Se pueden visualizar con estos métodos pequeños nódulos, es decir, pequeñas regiones de tejido sospechoso. Sin embargo, muchos de estos nódulos – más del 90% con CT – representan cambios tisulares benignos, y solamente una minoría de nódulos representan un tejido canceroso. El uso del marcador FEN1 puede ayudar para diferenciar la enfermedad benigna frente a la maligna.

60 En una realización preferida el marcador FEN1 se utiliza como un método inmunohistoquímico con el fin de establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de cáncer.

65 Como la FEN1 como marcador único puede ser superior a otros marcadores, por ejemplo otros marcadores como CEA o NSE, se tiene que esperar que FEN1 se usara como ayuda al diagnóstico, especialmente para el establecimiento de un valor base antes de la cirugía. La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de FEN1 para el establecimiento de un valor de base antes de la cirugía.

## Pronóstico:

Los indicadores pronósticos se pueden definir como características clínicas, patológicas o bioquímicas de los pacientes de cáncer y sus tumores que predicen con una cierta probabilidad el desenlace de la enfermedad. Su uso principal es ayudar a un plan racional de manejo del paciente, es decir, evitar el tratamiento débil de una enfermedad agresiva o el sobre tratamiento de enfermedades indolentes, respectivamente. Molina, R. y col., Tumor Biol. 24 (2003) 209-218 evaluó el valor pronóstico de CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SSC y NSE en NSCLC. En su estudio los niveles anormales en el suero de los marcadores NSE, CEA y LDH (lactato deshidrogenasa) parecen indicar una supervivencia más corta.

Como la FEN1 sola contribuye significativamente a la diferenciación de pacientes de cáncer de controles sanos, se tiene que esperar que ayudara en la evaluación del pronóstico en pacientes que padecen cáncer. El nivel preoperatorio de FEN1 probablemente se combinará con uno o más de otros marcadores para el cáncer y/o el sistema de estadificación TNM.

## Control de la quimioterapia:

Merle, P. y col., Int. J. of Biological Markers 19 (2004) 310-315 han evaluado las variaciones del nivel de CYFRA 21-1 en el suero de pacientes con NSCLC avanzado tratado localmente con quimioterapia de inducción. Concluyen que el control de los niveles de CYFRA 21-1 puede ser una herramienta útil del pronóstico de la respuesta tumoral y la supervivencia en pacientes de NSCLC en estadio III. Además, hay informes que han descrito el uso de CEA en el control del tratamiento de pacientes con LC (Fukasawa, T. y col., Gan to Kagaku Ryoho 13 (1986) 1862-1867). La mayoría de estos eran retrospectivos, no aleatorizados y contenían pocos pacientes. Como en el caso de los estudios con CYFRA 21-1 los estudios con CEA sugieren: a) que los pacientes con una disminución de los niveles de CEA mientras reciben la quimioterapia tienen un mejor resultado que los pacientes en los que los niveles no disminuyen y b) para casi todos los pacientes, los aumentos de los niveles de CEA se asocian con progresión de la enfermedad.

Se espera que FEN1 sea al menos tan bueno como marcador para controlar la quimioterapia como CYFRA 21-1 o CEA, respectivamente. La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de FEN1 en el control de los pacientes de cáncer bajo terapia.

En el control de la terapia en una realización preferida las mediciones de FEN1 y de al menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa se combinarán y se usarán para la evaluación del cáncer.

## Seguimiento:

Una gran parte de los pacientes de LC que se someten a una resección quirúrgica con el fin de retirar el tejido canceroso, desarrollan más tarde una enfermedad recurrente o metastásica (Wagner, H. Jr., Chest 117 (2000) S110-S118; Buccheri, G. y col., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). La mayoría de estas recaídas se producen en los primeros 2-3 años después de la cirugía. Como la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente fatal si se detecta demasiado tarde, un número considerable de investigaciones se han enfocado a detección de la recaída del cáncer en un estado precoz y por lo tanto potencialmente tratable.

En consecuencia, muchos pacientes de cáncer se someten a un programa de vigilancia postoperatoria que incluye frecuentemente el control regular con CEA. El control seriado con CEA un año después de la resección quirúrgica ha demostrado que detecta una enfermedad recurrente/metastásica en el posoperatorio temprano con una sensibilidad del 97%, incluso en ausencia de síntomas o signos sospechosos (Buccheri, G. y col., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). Por lo tanto, el seguimiento de los pacientes con cáncer después de la cirugía es uno de los campos más importantes para un marcador bioquímico adecuado. Debido a la alta sensibilidad de FEN1 en los pacientes investigados con cáncer es probable que FEN1 sola o en combinación con uno o más de otros marcadores sea de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes de cáncer tras la cirugía. El uso de un panel de marcadores que comprende FEN1 y uno o más de otros marcadores de cáncer en el seguimiento de los pacientes de cáncer representa una realización más de la presente invención.

En una realización preferida más la presente invención se refiere al uso de FEN1 en el campo diagnóstico del cáncer.

En otra realización aún más preferida la presente invención se refiere al uso de FEN1 como una molécula marcadora para el cáncer, por ejemplo el cáncer en general o para tipos específicos de cáncer, tales como EC, MM, CC, H/NC, OC, CRC, BLC, PAC, BC, SCLC, PC, KC o NSCLC, en combinación además con una o más moléculas marcadoras para el cáncer. Las otras moléculas marcadoras pueden ser moléculas marcadoras inespecíficas del tipo de cáncer y/o moléculas marcadoras específicas del tipo de cáncer. FEN1 y el al menos un marcador más se utilizan en la evaluación del cáncer en una muestra líquida obtenida de un individuo. Los otros marcadores del

cáncer seleccionados con los que la medición de FEN1 se puede combinar son Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa.

- 5 Como apreciará un experto en la técnica hay muchas formas de utilizar las mediciones de dos o más marcadores con el fin de mejorar la pregunta diagnóstica que se investiga. En una estrategia bastante simple, pero no obstante a menudo eficaz, se asume que el resultado es positivo si una muestra es positiva para al menos uno de los marcadores investigados. Este puede ser el caso, por ejemplo cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como el SIDA.
- 10 Frecuentemente, sin embargo, se evalúa la combinación de marcadores. Preferentemente los valores medidos para los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo para FEN1 y CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor matemático se correlaciona con la pregunta diagnóstica subyacente. Los valores del marcador se pueden combinar por cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Los métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores para una enfermedad emplean métodos como,
- 15 análisis discriminante (DA) (es decir DA lineal, cuadrático, regularizado), Métodos de Kernel (es decir, SVM), Métodos no paramétricos (es decir, Clasificadores del vecino k más cercano), PLS (Mínimos cuadrados parciales), Métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, Método random Forest, Métodos de Boosting/Baggins), Modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), Métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), Modelos aditivos generalizados, Métodos basados en lógica difusa, Redes Neuronales y Métodos basados en Algoritmos Genéticos. Un experto en la técnica no tendrá problemas en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente el método utilizado en correlacionar la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo para la ausencia o presencia de LC se selecciona de entre DA (es decir, Análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), Métodos de Kernel (es decir, SVM), Métodos no paramétricos (es decir, Clasificadores del vecino k más cercano), PLS (Mínimos Cuadrados parciales), Métodos basados en árboles (es decir, regresión lógica, CART, Métodos random forest, Métodos de Boosting), o Modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relativos a estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., y col., J. of Computational and Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, T. y col., The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics (2001); Breiman, L., y col., Classification and regression trees, California: Wadsworth (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. y col., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2ª edición (2001).
- 20
- 25
- 30
- 35 Es una realización preferida de la invención el uso de un punto de corte multivariado optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo la enfermedad de la salud. En este tipo de análisis los marcadores no son independientes sino que forman un panel de marcadores.
- 40 La precisión de un método de diagnóstico se describe mejor por sus características operativas de receptor (ROC) (véase especialmente Zweig, M.H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). La curva ROC es una gráfica de todos los pares resultantes de la sensibilidad/especificidad de la variación continua de los umbrales de decisión sobre el intervalo completo de los datos observados.
- 45 El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o de la capacidad de clasificar los sujetos correctamente en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la capacidad del ensayo para distinguir correctamente dos condiciones diferentes. Tales condiciones son por ejemplo salud o enfermedad o enfermedad benigna frente a enfermedad maligna.
- 50 En cada caso, la curva ROC representa el solapamiento entre las dos funciones trazando la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de los umbrales de decisión. En el eje Y está la sensibilidad, o la fracción positiva verdadera [que se define como (número de resultados positivos verdaderos del ensayo) / (número de positivos verdaderos + número de resultados falsos negativos del ensayo)]. Esto también se ha referido como positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje X está la fracción de falsos positivos, o 1 – especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de la especificidad y se calcula enteramente del subgrupo que no está afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas, falsos positivos se calculan totalmente por separado, utilizando los resultados de los ensayos de dos subgrupos diferentes, la curva ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la curva ROC representa un sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene un gráfico ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción positiva verdadera es 1,0, o el 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción falso positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda a la línea superior derecha. La mayoría de los gráficos caen entre estos dos extremos. (Si la curva ROC cae completamente debajo de la diagonal de 45°, se remedia fácilmente invirtiendo el criterio de
- 55
- 60
- 65

“positividad” de “mayor que” a “menor que” o viceversa). Cualitativamente, cuanto más cerca esté el gráfico de la esquina superior izquierda mayor es la precisión total del ensayo.

5 Una manera preferida para cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento por un único número. Tal parámetro general, por ejemplo, es el denominado “error total” o alternativamente el “área bajo la curva = AUC”. La medida global más común es el área bajo la curva ROC. Por convención, este área es siempre  $\geq 0,5$  (si no, se puede invertir la regla de decisión para conseguirlo). Los valores varían entre 1,0 (separación perfecta de los valores de los ensayos de los dos grupos) y 0,5 (no hay una diferencia de distribución de valores del ensayo entre los dos grupos). El área no depende solo de una porción particular de la gráfica tal que el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90% de especificidad, sino del gráfico entero. Esto es una expresión cuantitativa, descriptiva de cómo se ajusta la curva ROC a la perfección (área = 1,0).

10 Las mediciones de combinación de FEN1 con otros marcadores como CYFRA 21-1 o CEA, o con otros marcadores de cáncer aún no se han descubierto, FEN1 da lugar y dará lugar, respectivamente, a mayores mejoras en la evaluación del cáncer.

15 En una realización preferida la presente invención se refiere a un método para mejorar la precisión diagnóstica de un cáncer frente a controles sanos midiendo en una muestra la concentración de al menos FEN1 y uno o más de otros marcadores tumorales seleccionados de entre el grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa, respectivamente y correlacionando las concentraciones determinadas a la presencia o ausencia de cáncer, la mejora resulta en más pacientes que se clasifican correctamente de que padecen un cáncer frente a controles sanos al compararse con una clasificación basada en cualquier marcador único investigado solo.

20 En una realización preferida más la presente invención se refiere a un método para mejorar la precisión del diagnóstico de cáncer frente a controles sanos midiendo en una muestra la concentración de al menos FEN1 y Cyfra 21-1, y opcionalmente CEA y/o NSE respectivamente, y correlacionando las concentraciones determinadas a la presencia o ausencia de cáncer, la mejora resulta en más pacientes que se clasifican correctamente como que padecen un cáncer frente a controles sanos al compararse con una clasificación basada en cualquier marcador único investigado solo.

25 Los siguientes ejemplos, figuras, y el listado de secuencias se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, de la cual se expone el verdadero ámbito en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que se pueden hacer modificaciones en los procedimientos expuestos sin alejarse del espíritu de la invención.

### 35 Descripción de la figuras

Figura 1 La Fig. 1 muestra los análisis de transferencia de Western de 20 lisados tisulares de cáncer de pulmón. Se analizaron 15  $\mu\text{g}$  de proteína total de lisados de tejido canceroso (CA) y lisados de tejidos control coincidentes como se describe en el ejemplo 3. M = peso molecular del marcador; T= lisado de tejido tumoral; N = lisado de tejido control coincidente; rec ag = flap endonucleasa-1 (=FEN1) producida recombinantemente; las flechas indican la posición de FEN1.

Figura 2 La Fig. 2 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de pulmón humano (LC) con un AUC de 0,87 para la evaluación de 365 muestras obtenidas de pacientes con LC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 3 La Fig. 3 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de cabeza y cuello humano (H/NC) con un AUC de 0,92 para la evaluación de 30 muestras obtenidas de pacientes con H/CN al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 4 La Fig. 4 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de endometrio humano (EC) con un AUC de 0,92 para la evaluación de 23 muestras obtenidas de pacientes con EC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 5 La Fig. 5 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer ovárico humano (OC) con un AUC de 0,79 para la evaluación de 41 muestras obtenidas de pacientes con OC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 6 La Fig. 6 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de melanoma maligno humano (MM) con un AUC de 0,95 para la evaluación de 16 muestras obtenidas de pacientes con MM al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 7 La Fig. 7 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de mama humano (BC) con un AUC de 0,79 para la evaluación de 47 muestras obtenidas de pacientes con BC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.

- Figura 8 La Fig. 8 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de cérvix humano (CC) con un AUC de 0,88 para la evaluación de 20 muestras obtenidas de pacientes con CC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.
- 5 Figura 9 La Fig. 9 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de páncreas humano (PAC) con un AUC de 0,84 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con PAC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.
- 10 Figura 10 La Fig. 10 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer colorrectal humano (CRC) con un AUC de 0,79 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con CRC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.
- Figura 11 La Fig. 11 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de vejiga humano (BLC) con un AUC de 0,76 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con BLC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.
- 15 Figura 12 La Fig. 12 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de riñón humano (KC) con un AUC de 0,65 para la evaluación de 25 muestras obtenidas de pacientes con KC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.
- 20 Figura 13 La Fig. 13 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (curva ROC) de FEN1 en muestras de cáncer de próstata humano (PC) con un AUC de 0,73 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con PC al compararse con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos.
- 25 Figura 14 La Fig. 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína FEN1 humana; número de registro de la base de datos SwissProt: P39748 (SEC ID Nº 1).

#### Descripción de las secuencias

- 30 SEC ID Nº 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana FEN1 de acuerdo con la Fig. 14; número de registro de la base de datos SwissProt: P39748.
- SEC ID Nº 2 muestra la extensión peptídico sintetizado.
- SEC ID Nº 3 muestra el cebador directo sintetizado.
- 35 SEC ID Nº 4 muestra el cebador indirecto sintetizado.

#### Ejemplo 1

Identificación de FEN1 como un marcador potencial de cáncer de pulmón

#### 40 Fuentes de tejidos

Con el fin de identificar proteínas específicas de tumor como marcadores diagnósticos potenciales para el cáncer de pulmón, se llevaron a cabo análisis de dos clases diferentes de tejido utilizando métodos proteómicos.

- 45 En total, se analizaron especímenes de 20 pacientes que padecían cáncer de pulmón (LC). De cada paciente se recolectaron dos tipos diferentes de tejidos a partir de resecciones terapéuticas: tejido tumoral (> 80% de tumor) (T) y tejido sano adyacente (N). Este último sirve como muestra coincidente de control sano. Los tejidos se congelaron inmediatamente tras la resección y se almacenaron a -80 °C antes de procesarlos. Los tumores se diagnosticaron por criterios histopatológicos.

#### 50 Preparación de tejidos:

- Se cortaron de 0,8-1,2 g de tejido congelado en pequeños trozos, se transfirieron al tarro helado de molienda de un molino mezclador de bolas y se congeló completamente en nitrógeno líquido. El tejido se pulverizó en el molino de bolas, se disolvió 10 veces en volumen (p/v) en tampón de lisis (40 mM de citrato Na, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1% de Genapol X-080, 0,02% de azida Na, Complete® libre de EDTA [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Nº de Catálogo 1 873 580]) y posteriormente se homogenizó en un homogeneizador de cristal Wheaton® (20 x ajuste flojo, 20 x ajuste hermético). El homogenado se sometió a centrifugación (10' a 5.000 x g), el sobrenadante se transfirió a otro vial y se sometió de nuevo a centrifugación (15' a 20.000 x g). El sobrenadante resultante contenía las proteínas solubles y se usaron para análisis posteriores.

#### Enfoque isoeléctrico (IEF) y SDS-PAGE:

- 65 Para el IEF, se mezclaron 3 ml de la suspensión con 12 ml de tampón de muestra (7 M de urea, 2 M de tiourea, 2% CHAPS, 0,4% de tampón IPG pH 4-7, 0,5% de DTT) y se incubó durante 1 h. Las muestras se concentraron en un dispositivo Amicon® Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y se determinó la concentración de proteínas

5 utilizando el ensayo de proteínas Bio-Rad® (Nº de Catálogo 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual del suministrador. A un volumen correspondiente con 1,5 mg de proteína se le añadió tampón de muestra hasta un volumen final de 350 µl. Esta solución se utilizó para rehidratar tiras IPG pH 4-7 (Amersham Biosciences, Friburgo, Alemania) durante una noche. Se llevó a cabo el IEF utilizando el siguiente protocolo de gradiente; 1) 1 minuto a 500 V; 2) 2 h a 3500 V; 3) 22 h a 3500 V constantes dando lugar a 82 kVh. Tras el IEF, las tiras se almacenaron a -80 °C o se utilizaron directamente para el SDS-PAGE.

10 Antes del SDS-PAGE se incubaron las tiras en tampón de equilibrio (6 M de urea, 50 mM de Tris/HCl, pH 8,8, 30% de glicerol, 2 % SDS), y se añadió DDT para la reducción (15 min + 50 mg DDT/10 ml), e IAA para la alquilación (15 min, + 235 mg iodacetamida/10 ml). Las tiras se pusieron en geles de poliacrilamida 12,5% y se sometieron a electroforesis a 1 W/gel durante una hora y luego a 17 W/gel. Posteriormente, los geles se fijaron (50% metanol, 10% de acetato) y se tiñeron una noche con el kit Novex™ Colloidal Blue Staining (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, Nº de Catálogo LC6025, 45-7101).

15 Detección de FEN1 como marcador potencial para el cáncer de pulmón humano

20 Cada paciente se analizó separadamente por análisis de imagen con el software ProteomeWeaver® (Definiens AG, Alemania, Munich). Además todas la manchas del gel se escindieron con un robot de punción y las proteínas presentes en las manchas se identificaron por espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex™ Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente, 3 geles de la muestra del tumor se compararon con 3 geles de cada tejido normal adyacente y se analizaron las manchas distintivas que correspondían con las proteínas expresadas diferencialmente. Se identificó la FEN1 en las muestras tumorales de 10 pacientes y solo en 1 muestra de control. Por este medio, se encontró que la proteína FEN1 se expresaba específicamente o se sobre-expresaba fuertemente en el tejido tumoral respectivo. Por tanto la califica como un marcador candidato para su uso en el diagnóstico de cáncer de pulmón. Se identificaron los siguientes péptidos tripsinizados derivados de FEN1:

Tabla 2: Péptidos tripsinizados identificados por MALDI-TOF

Péptido identificado	Tramo de aminoácidos de FEN1 ( SEC ID Nº 1)
LIADVAPSAIR	9-19
KVAIDASMSIQFLIAVR	30-47
VAIDASMSIQFLIAVR	31-47
QGGDVLQNEEGETTSHLMGMFYR	48-70
QLQQAQAAGAEQEVEK	110-125
KLPIQEFHLSR	201-211
LPIQEFHLSR	202-211
RAVDLIQK	245-252
LDPNKYPVPENWLHK	263-277
YPVPENWLHK	268-277
EAHQLFLEPEVLDPESVELK	278-297
WSEPNEEELIK	298-308
QFSEERIR	315-322

Ejemplo 2

30 Generación de anticuerpos contra el marcador de cáncer proteína FEN1

Se generaron anticuerpos policlonales contra el marcador de cáncer de pulmón proteína FEN1 para usar posteriormente el anticuerpo en la medición de los niveles de FEN1 en el suero o plasma o las concentraciones en otros fluidos corporales por ensayos de inmunodetección, por ejemplo, Transferencia de Western y ELISA.

35 Expresión de la proteína recombinante en *E. coli*:

40 Con el fin de generar anticuerpos contra FEN1, se produjo el antígeno recombinante en *E. coli*: Para ello, la región codificante de FEN1 se amplifica por PCR a partir del clon de ADNc de longitud completa obtenido en el Centro de Recursos Alemán para la Investigación del Genoma (RZPD, Berlín, Alemania) utilizando los siguientes cebadores:

Cebador directo (SEC ID N° 3)

5'-cacacacaattgattaagaggagaaattaactATGAGAGGATCGCATCACCAT  
CACCATCACATTGAAGGCCGTGGAATTCAAGGCCTGGCC-3'

5 (El sitio *HunI* está subrayado, los nucleótidos codificantes están en mayúscula).

Cebador inverso (SEC ID N° 4)

5'-acgtacgtaaaagcttTCATTATTTCCCTTTTAAACTTC-3' (El sitio *HindIII* está subrayado, los nucleótidos codificantes están en mayúsculas).

10 El cebador directo (aparte de los sitios de clonación *MunI* y de unión al ribosoma) codificaba una extensión peptídica MRGSHHHHHHIEGR en el extremo N (mostrado en la SEC ID N° 2) fusionada en fase con el extremo 5' del gen FEN1. El fragmento de PCR digerido *MunI/HindIII* se ligó en el vector pQE80L (Qiagen, Hilden, Alemania). Posteriormente, se transformaron las células competentes de *E. coli* XL1-blue con el plásmido generado. Después  
15 del análisis de secuencia, se transformaron células competentes de *E. coli* C600 con el plásmido generado para la expresión inducible por IPTG bajo el control del promotor T5 de la serie del vector pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-FEN1, se aglomeró por centrifugación 1 l de un cultivo bacteriano inducido de una noche y el aglomerado celular se resuspendió en tampón de lisis (20 mM de tampón sodio-fosfato, pH 7,4, 500 mM de cloruro sódico (NaCl)). Las células se destruyeron en una prensa French con una presión de 1.500 bares. El material insoluble se aglomeró por centrifugación (25.000 x g, 15 min, 4 °C) y el sobrenadante se aplicó a cromatografía de afinidad metálica de ácido Ni-nitrilotriacético (Ni-NTA): La columna se lavó con varios volúmenes de lecho de tampón de lavado (20 mM de tampón sodio-fosfato, pH 7,4, 500 mM de  
25 NaCl, 20 mM de imidazol). Finalmente, se eluyó el antígeno unido utilizando el tampón de lavado con un gradiente lineal de 20 mM-500 mM de imidazol, las fracciones que contenían el antígeno (de 7 ml cada una) se identificaron a una DO<sub>280</sub> en un detector UV. Las fracciones que contenían el antígeno se agruparon y se dializaron contra un tampón de almacenamiento (75 mM de HEPES, pH 7,5, 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 6,5 % (p/v) sacarosa) y se almacenaron a 4 °C o -80 °C, respectivamente.

30 Generación de péptidos inmunogénicos para la inmunización:

35 Para crear los anticuerpos policlonales específicos para FEN1, se identificaron las secuencias de péptidos que no mostraban una homología significativa con otras proteínas humanas conocidas. La secuencia de aminoácidos de FEN1 se procesó contra el banco de datos de proteínas humanas accesible en el Instituto de Bioinformática Suizo utilizando el software Blast. La secuencia de aminoácidos 260-273 mostró no tener una homología significativa con otras proteínas humanas y por lo tanto se seleccionó para crear los anticuerpos específicos de FEN1. La secuencia respectiva se sintetizó y se conjugó químicamente con KLH (hemocianina de lapa californiana) para obtener un  
40 inmunógeno para la inmunización.

Generación de anticuerpos policlonales:

a) Inmunización

45 Para la inmunización, se preparó una emulsión reciente de una solución de proteína (100 mg/ml proteína FEN1 o 500 mg/ml de KLH unidos con un péptido de los aminoácidos de FEN1 260 – 273) y adyuvante completo de Freund con una relación 1:1. Cada conejo se inmunizó con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60, y 90. Se extrajo la sangre y el suero anti- FEN1 resultante se utilizó para posteriores experimentos como se describe en los ejemplos 3  
50 y 4.

b) Purificación de IgG (Inmunoglobulina G) del suero de conejo por precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio

55 Se diluyó un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes de tampón de acetato (60 mM, pH 4,0). El pH se ajustó a 4,5 con Tris básico 2 M. Se añadió gota a gota ácido caprílico (25 µl/ml de muestra diluida) bajo agitación vigorosa. Después de 30 min se centrifugó la muestra (13.000 x g, 30 min 4 °C), el aglomerado se desechó y se recolectó el sobrenadante. Se ajustó el pH del sobrenadante a 7,5 por la adición de Tris básico 2 M y se filtró (0,2 µm).

60 La inmunoglobulina en el sobrenadante se precipitó bajo agitado vigoroso mediante la adición gota a gota de solución de sulfato amónico 4 M hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recolectaron por centrifugación (8.000 x g, 15 min, 4 °C).

El sobrenadante se desechó. El aglomerado se disolvió en 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl y se dializó exhaustivamente. El dializado se centrifugó (13.000 x g, 15 min, 4 °C) y se filtró (0,2 µm).

Biotinilación de la IgG policlonal de conejo:

La IgG policlonal de conejo se llevó a 10 mg/ml en 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl. Se añadieron, por ml de solución de IgG, 50 µl de Biotina-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Tras 30 min a temperatura ambiente, se llevó a cabo una cromatografía de la muestra en Superdex 200 (10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl). Se recolectó la fracción que contenía la IgG biotinilada. Los anticuerpos monoclonales se biotinilaron según el mismo procedimiento.

Digoxigenación de IgG policlonal de conejo:

La IgG policlonal de conejo se llevó a 10 mg/ml en 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl. Se añadieron, por ml de solución de IgG, 50 µl de éster de doxigenina-3-O-metilcarbonil-ε-ácido aminocaproico-N-hidroxisuccinimida (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, N° de Catálogo 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Tras 30 min a temperatura ambiente, se llevó a cabo una cromatografía de la muestra en Superdex 200 (10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH pH 7,5, 30 mM de NaCl). Se recolectaron las fracciones que contenían IgG digoxigenilada. Los anticuerpos monoclonales se marcaron con digoxigenina según el mismo procedimiento.

### Ejemplo 3

Transferencia de Western para la detección de FEN1 en tejido de cáncer de pulmón humano (LC) utilizando anticuerpos policlonales como se generaron en el Ejemplo 2

Los lisados tisulares de las muestras tumorales y las muestras de controles sanos se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, "preparación de tejidos".

Se llevaron a cabo el SDS-PAGE y la transferencia de Western utilizando reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido ensayada, se diluyeron 15 µg de lisado tisular en tampón reductor de muestras SDS NuPAGE® (Invitrogen) y se calentaron durante 10 min a 95 °C. Las muestras se procesaron sobre geles NuPAGE® al 4-12% (Tris-Glicina) en el sistema tampón de procesamiento MES. La mezcla separada de gel-proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando el módulo de transferencia XCellIII™ de Invitrogen y el sistema tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS/0,05% de Tween-20 y se bloquearon con tampón de bloqueo Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 h. El anticuerpo primario, suero policlonal de conejo anti- FEN1 (generado como se describe en el Ejemplo 2), se diluyó 1:10.000 en tampón de bloqueo Roti®-Block y se incubó con la membrana durante 1 h. Las membranas se lavaron 6 veces en PBS/0,05% de Tween-20. El anticuerpo primario de conejo unido específicamente se marcó con un anticuerpo IgG policlonal de oveja anti-conejo conjugado con POD, diluido a 10 mU/ml en 0,5 x de tampón de bloqueo Roti®-Block. Tras la incubación durante 1 h, se lavaron las membranas 6 veces en PBS/0,05% de Tween-20. Para la detección del conjugado anticuerpo anti-conejo con POD unido, la membrana se incubó con sustrato de transferencia de Western Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (pedido n° 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expuso a una película autorradiográfica.

La intensidad de la señal de FEN1 aumentó en 19 de los 20 lisados de tejido tumoral que se obtuvo de 20 pacientes diferentes con LC (Fig. 1). Por lo tanto, el aumento abundante de FEN1 en el tejido tumoral que se detectó por MALDI en el ejemplo 1, se confirma claramente con los análisis de transferencia de Western.

### Ejemplo 4

ELISA para la medición de FEN1 en muestras de suero y plasma humanos u otros fluidos corporales

Para la detección de FEN1 en suero o plasma humano, se desarrolló un ELISA sándwich utilizando los anticuerpos del ejemplo 2. Para la captura del antígeno, se conjugó el anticuerpo contra el péptido 398-413 con biotina mientras que los anticuerpos contra la secuencia completa de FEN1 se conjugaron con digoxigenina.

Para la calibración del ensayo, se propagaron células HT-29, una línea celular de cáncer de colon humano incluida en las líneas celulares NCI60 del instituto nacional del cáncer de EE. UU., y se utilizó un lisado de las células para la calibración. Se diluyó un lisado con 10,0 mg/ml a 40 µg/ml y se fijó arbitrariamente a 100 U/ml.

Se incubaron durante una noche, 50 µl de una dilución seriada del lisado de HT-29 como antígeno de referencia o muestras de suero/plasma/ELF de pacientes, con 200 µl de una mezcla de anticuerpos en 10 mM de fosfato, pH 7,4, 1% de BSA, 0,9% NaCl y 0,1% de Tween 20 que contenía 1,25 µg/ml de anti- FEN1 biotinilado, aa 260-273 y 2,5 µg/ml de anticuerpos anti- FEN1 digoxigenilados, respectivamente. Posteriormente se transfirieron alícuotas de 100 µl a placas microtiter de 96 pocillos revestidas de estreptavidina y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20. En una etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 100 mU/ml de conjugados anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Catálogo 1633716) durante 60 min en 10 mM de fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9%

NaCl y 0,1% Tween 20. Las placas se lavaron posteriormente tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 µl de solución TMB (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Catálogo 11484281001) y tras 60 min se midió la DO a 450 nm con un lector ELISA.

5 Ejemplo 5

FEN1 como marcador en el suero para el cáncer de pulmón humano (LC)

10 Se utilizaron muestras derivadas de 365 pacientes de cáncer de pulmón bien caracterizados (146 adeno-CA, 87 CA de células escamosas, 44 con CA de células pequeñas, 88 de otros CA de pulmón) con la clasificación UICC que se da en la Tabla 3.

Tabla 3: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	182
UICC III	118
UICC IV	62
estadificación desconocida	3
donantes de sangre obviamente sanos	50

15 El nivel de FEN1 en las muestras de LC de la Tabla 3 se evaluó en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), con un AUC de 0,87 (Fig. 2).

Ejemplo 6

20 FEN1 como marcador en el suero para el cáncer de cabeza / cuello humano (H/NC)

Se utilizaron muestras derivadas de 30 pacientes con cáncer de cabeza / cuello bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 4.

Tabla 4: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	4
UICC III	3
UICC IV	21
estadificación desconocida	2
donantes de sangre obviamente sanos	50

25 El nivel de FEN1 en las muestras de H/NC de la Tabla 4 se evaluó en comparación con 50 muestras obtenidas de individuos obviamente sanos (= cohorte control), que resultaba en un AUC de 0,92 (Fig. 3).

Ejemplo 7

30 FEN1 como un marcador en el suero del cáncer de endometrio humano (EC)

Se utilizaron muestras derivadas de 23 pacientes con cáncer de endometrio bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 5.

Tabla 5: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	12
UICC III	3

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC IV	3
estadificación desconocida	5
donantes de sangre obviamente sanos	50

5 El nivel de FEN1 en las muestras de EC de la Tabla 5 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,92 (Fig. 4).

Ejemplo 8

10 FEN1 como un marcador en el suero del cáncer ovárico humano (OC)

Se utilizaron muestras derivadas de 42 pacientes con cáncer ovárico (OC) bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 6.

Tabla 6: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	7
UICC III	14
UICC IV	8
estadificación desconocida	12
donantes de sangre obviamente sanos	50

15 El nivel de FEN1 en las muestras de OC de la Tabla 6 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,79 (Fig. 5).

Ejemplo 9

20 FEN1 como un marcador en el suero del melanoma maligno (MM)

Se utilizaron muestras derivadas de 16 pacientes con melanoma maligno bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 7.

Tabla 7: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	3
UICC III	1
UICC IV	0
estadificación desconocida	12
donantes de sangre obviamente sanos	50

25 El nivel de FEN1 en las muestras de MM de la Tabla 7 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,95 (Fig. 6).

Ejemplo 10

- 5 FEN1 como un marcador en el suero del cáncer de mama humano (BC)  
 Se utilizaron muestras derivadas de 47 pacientes con cáncer de mama bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 8.

Tabla 8: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	26
UICC III	9
UICC IV	12
donantes de sangre obviamente sanos	50

- 10 El nivel de FEN1 en las muestras de BC de la Tabla 8 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,79 (Fig. 7).

Ejemplo 11

- 15 FEN1 como un marcador en el suero del cáncer de cérvix humano (CC)  
 Se utilizaron muestras derivadas de 20 pacientes con cáncer de cérvix bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 9.

Tabla 9: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC is/I/II	11
UICC III	7
UICC IV	2
estadificación desconocida	0
donantes de sangre obviamente sanos	50

- 20 El nivel de FEN1 en las muestras de CC de la Tabla 9 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,88 (Fig. 8).

Ejemplo 12

- 25 FEN1 como un marcador en el suero del cáncer pancreático humano (PAC)  
 Se utilizaron muestras derivadas de 49 pacientes con cáncer de páncreas bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 10.

- 30

Tabla 10: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	26
UICC III	5
UICC IV	15
estadificación desconocida	4
donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de FEN1 en las muestras de PAC de la Tabla 10 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,84 (Fig. 9).

5 Ejemplo 13

FEN1 como un marcador en el suero del cáncer de colon humano (CRC)

10 Se utilizaron muestras derivadas de 50 pacientes con cáncer de páncreas bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 11.

Tabla 11: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	25
UICC III	13
UICC IV	6
estadificación desconocida	6
donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de FEN1 en las muestras de CRC de la Tabla 11 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,79 (Fig. 10).

15 Ejemplo 14

FEN1 como un marcador en el suero del cáncer de vejiga humano (BLC)

20 Se utilizaron muestras derivadas de 50 pacientes con cáncer de vejiga bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 12.

Tabla 12: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC 0/I/II	41
UICC III	1
UICC IV	3
estadificación desconocida	4
donantes de sangre obviamente sanos	50

25 El nivel de FEN1 en las muestras de BLC de la Tabla 12 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,76 (Fig. 11).

Ejemplo 15

30 FEN1 como un marcador en el suero del cáncer renal humano (KC)

Se utilizaron muestras derivadas de 25 pacientes con cáncer renal bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 13.

Tabla 13: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	13
UICC III	4
UICC IV	3
estadificación desconocida	5
donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de FEN1 en las muestras de KC de la Tabla 13 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,65 (Fig. 12).

Ejemplo 16

FEN1 como un marcador en el suero del cáncer de próstata humano (PC)

Se utilizaron muestras derivadas de 50 pacientes con cáncer de páncreas bien caracterizadas con la clasificación UICC que se da en la Tabla 14.

Tabla 14: Población del Estudio

Estado según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	24
UICC III	4
UICC IV	6
estadificación desconocida	16
donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de FEN1 en las muestras de PC de la Tabla 14 se evaluó en comparación con 50 muestras de control que se obtuvieron de individuos obviamente sanos (= cohorte de control), dando como resultado un AUC de 0,73 (Fig. 13).

Ejemplo 17

FEN1 en el fluido de revestimiento epitelial (ELF) – micromuestreo broncoscópico

El micromuestreo broncoscópico (BMS) ofrece la posibilidad de recolectar fluido del revestimiento epitelial (ELF) cerca de nódulos pulmonares pequeños de una manera muy poco invasiva. Posteriormente, es posible medir las concentraciones de los marcadores en el ELF con el fin de identificar un nódulo maligno. Una concentración de base específica del paciente del marcador tumoral respectivo se obtiene por muestreo del ELF en el pulmón contralateral.

Se inserta la sonda BMS (Olympus Medical Systems Corp. Tokyo, Japón, Cat.-No.: BC-402C) en los pulmones por medio de un broncoscopio que consiste en un tubo externo de polietileno y una sonda interna de algodón fijada en una guía de acero inoxidable. La sonda interna avanza hacia la proximidad del nódulo y se realiza la BMS durante unos segundos. Después de esto, la sonda interna se retrae en el tubo externo y ambos dispositivos se retraen simultáneamente. La punta de algodón se corta y se congela directamente a -80 °C. Para la determinación, el ELF se eluye de la punta de algodón y se puede analizar posteriormente. La concentración de FEN1 en el ELF se determina con ELISA como se ha descrito en el Ejemplo 4.

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> Flap endonucleasa-1 como marcador para el cáncer

ES 2 493 070 T3

<130> 26208 WO

<150> EP09165636.3

<151> 16-07-2009

5

<160>4

<170> PatentIn versión 3.3

10

<210> 1

<211> 380

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

```

Met Gly Ile Gln Gly Leu Ala Lys Leu Ile Ala Asp Val Ala Pro Ser
1           5           10           15

Ala Ile Arg Glu Asn Asp Ile Lys Ser Tyr Phe Gly Arg Lys Val Ala
20           25           30

Ile Asp Ala Ser Met Ser Ile Tyr Gln Phe Leu Ile Ala Val Arg Gln
35           40           45

Gly Gly Asp Val Leu Gln Asn Glu Glu Gly Glu Thr Thr Ser His Leu
50           55           60

Met Gly Met Phe Tyr Arg Thr Ile Arg Met Met Glu Asn Gly Ile Lys
65           70           75           80

Pro Val Tyr Val Phe Asp Gly Lys Pro Pro Gln Leu Lys Ser Gly Glu
85           90           95

Leu Ala Lys Arg Ser Glu Arg Arg Ala Glu Ala Glu Lys Gln Leu Gln
100          105          110

Gln Ala Gln Ala Ala Gly Ala Glu Gln Glu Val Glu Lys Phe Thr Lys
115          120          125

Arg Leu Val Lys Val Thr Lys Gln His Asn Asp Glu Cys Lys His Leu
130          135          140
    
```

ES 2 493 070 T3

Leu Ser Leu Met Gly Ile Pro Tyr Leu Asp Ala Pro Ser Glu Ala Glu  
 145 150 155 160  
 Ala Ser Cys Ala Ala Leu Val Lys Ala Gly Lys Val Tyr Ala Ala Ala  
 165 170 175  
 Thr Glu Asp Met Asp Cys Leu Thr Phe Gly Ser Pro Val Leu Met Arg  
 180 185 190  
 His Leu Thr Ala Ser Glu Ala Lys Lys Leu Pro Ile Gln Glu Phe His  
 195 200 205  
 Leu Ser Arg Ile Leu Gln Glu Leu Gly Leu Asn Gln Glu Gln Phe Val  
 210 215 220  
 Asp Leu Cys Ile Leu Leu Gly Ser Asp Tyr Cys Glu Ser Ile Arg Gly  
 225 230 235 240  
 Ile Gly Pro Lys Arg Ala Val Asp Leu Ile Gln Lys His Lys Ser Ile  
 245 250 255  
 Glu Glu Ile Val Arg Arg Leu Asp Pro Asn Lys Tyr Pro Val Pro Glu  
 260 265 270  
 Asn Trp Leu His Lys Glu Ala His Gln Leu Phe Leu Glu Pro Glu Val  
 275 280 285  
 Leu Asp Pro Glu Ser Val Glu Leu Lys Trp Ser Glu Pro Asn Glu Glu  
 290 295 300  
 Glu Leu Ile Lys Phe Met Cys Gly Glu Lys Gln Phe Ser Glu Glu Arg  
 305 310 315 320  
 Ile Arg Ser Gly Val Lys Arg Leu Ser Lys Ser Arg Gln Gly Ser Thr  
 325 330 335  
 Gln Gly Arg Leu Asp Asp Phe Phe Lys Val Thr Gly Ser Leu Ser Ser  
 340 345 350  
 Ala Lys Arg Lys Glu Pro Glu Pro Lys Gly Ser Thr Lys Lys Lys Ala  
 355 360 365  
 Lys Thr Gly Ala Ala Gly Lys Phe Lys Arg Gly Lys  
 370 375 380

<210>2  
 <211> 14  
 <212> PRT

ES 2 493 070 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Extensión peptídica sintetizada

5

<400>2

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg  
1 5 10

10

<210>3

<211> 93

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador directo sintetizado

<400> 3

cacacacaat tgattaaaga ggagaaatta actatgagag gatcgcacatca  
ccatcaccat 60

20

cacattgaag gccgtggaat tcaaggcctg gcc  
93

<210>4

<211> 39

<212> ADN

<213> Artificial

25

<220>

<223> Cebador inverso sintetizado

30

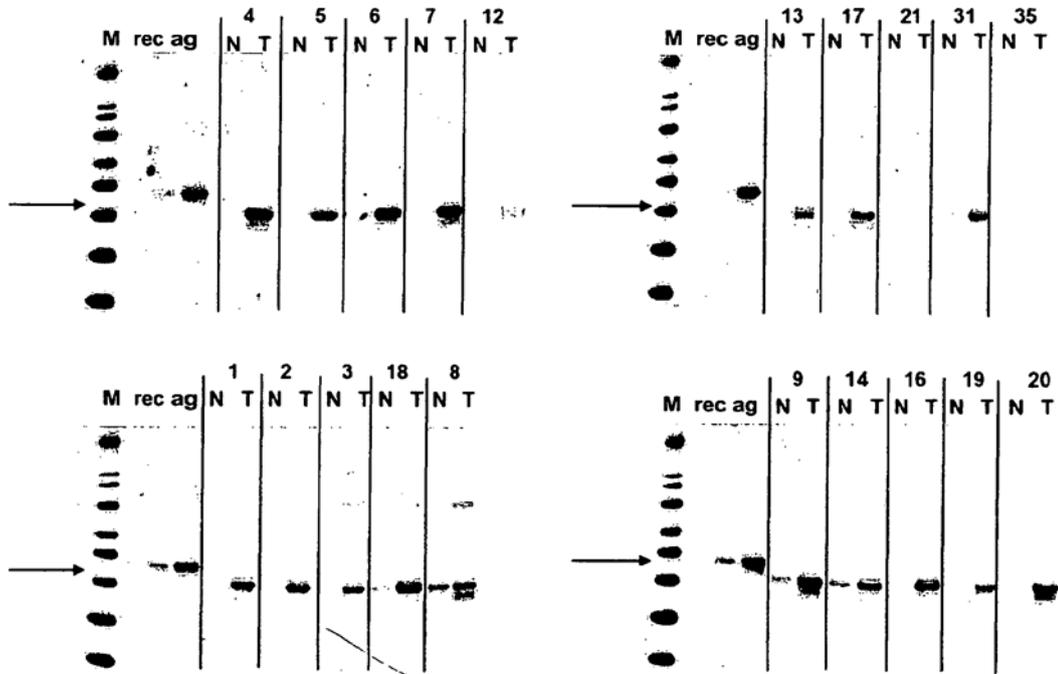
<400> 4

acgtacgtaa gctttcatta ttttcccctt ttaaacttc  
39

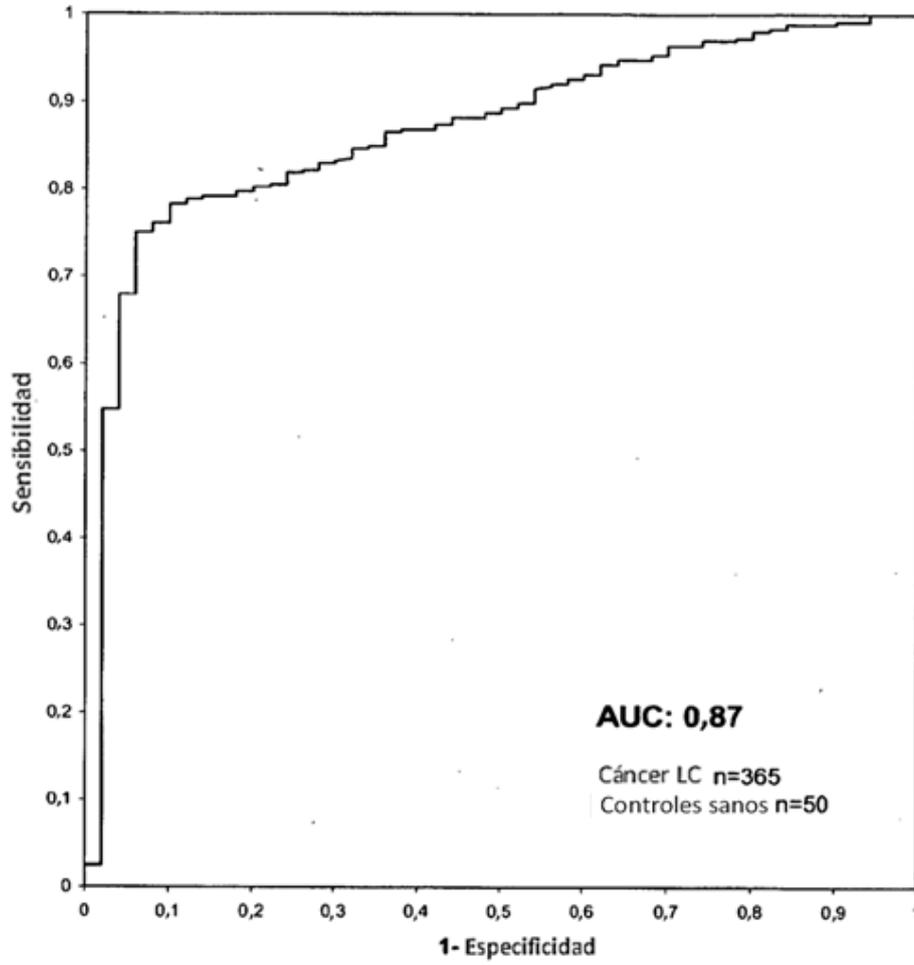
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para evaluar el cáncer in vitro que comprende la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de
- (a) proteína Flap endonucleasa-1 (= FEN1),  
(b) opcionalmente uno o más de otros marcadores de cáncer, y  
(c) utilizar el resultado de la medición de la etapa (a) y opcionalmente la etapa (b) en la evaluación del cáncer, donde un aumento de la concentración de una proteína FEN1 es indicativo de cáncer.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho método es un inmunoensayo sándwich.
- 15 3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 2, que además **se caracteriza por que** el método es para evaluar cánceres como el cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de cérvix, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que además **se caracteriza por que** dicho uno o más de otros marcadores de la etapa (b) se selecciona de entre el grupo que consiste en CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa.
- 25 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que además **se caracteriza por que** la concentración se mide por un método inmunológico.
- 30 6. El uso de la proteína FEN1 en la evaluación in vitro del cáncer, donde un aumento de la concentración de la proteína FEN1 es indicativo de cáncer, y donde la proteína FEN1 se detecta en una muestra de suero o plasma.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 en la evaluación de un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de cérvix, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de pulmón de células no pequeñas.
- 35 8. El uso de un anticuerpo dirigido contra la proteína FEN1 en la evaluación in vitro del cáncer, donde un aumento de la concentración de la proteína FEN1 en una muestra de suero o plasma es indicativo de cáncer.
- 40 9. El uso de un panel de marcadores que comprende la proteína FEN1 y opcionalmente uno o más de otros marcadores del cáncer en la evaluación in vitro del cáncer, donde un aumento de la proteína FEN1 en una muestra de suero o plasma es indicativo de cáncer.
- 45 10. El uso de un panel de marcadores de acuerdo con la reivindicación 9, que además **se caracteriza por que** el opcionalmente uno o más de otros marcadores se selecciona de entre el grupo que consiste en CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, proGRP, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa y DPPIV/Seprasa.
11. El uso del panel de marcadores de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10 en la evaluación del cáncer de endometrio, melanoma maligno, cáncer de cérvix, cáncer de cabeza y cuello, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

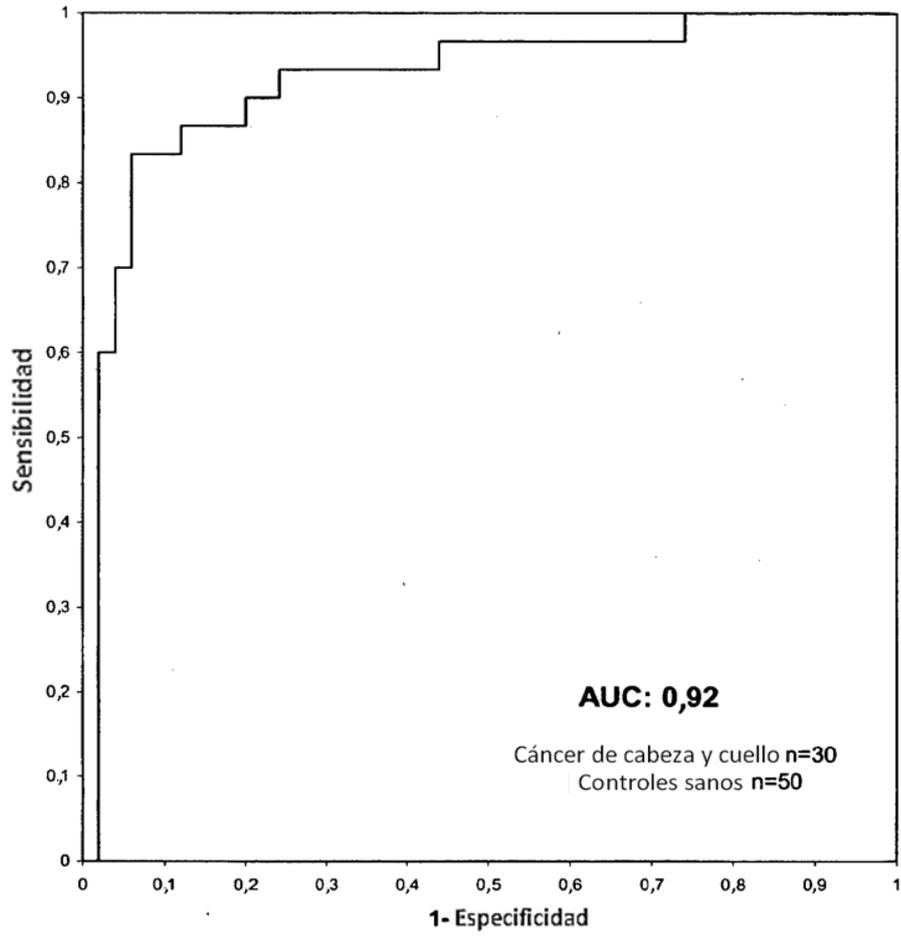
Fig. 1



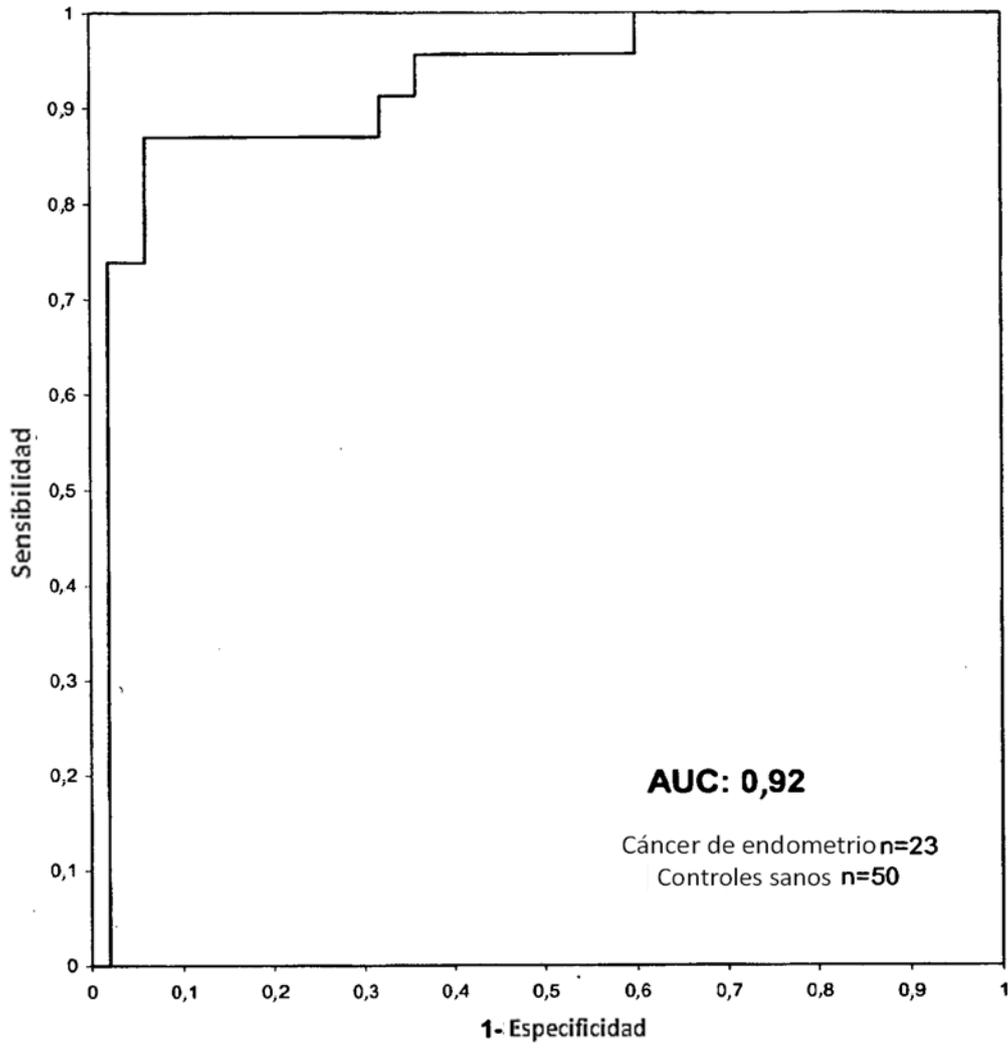
**Fig. 2**



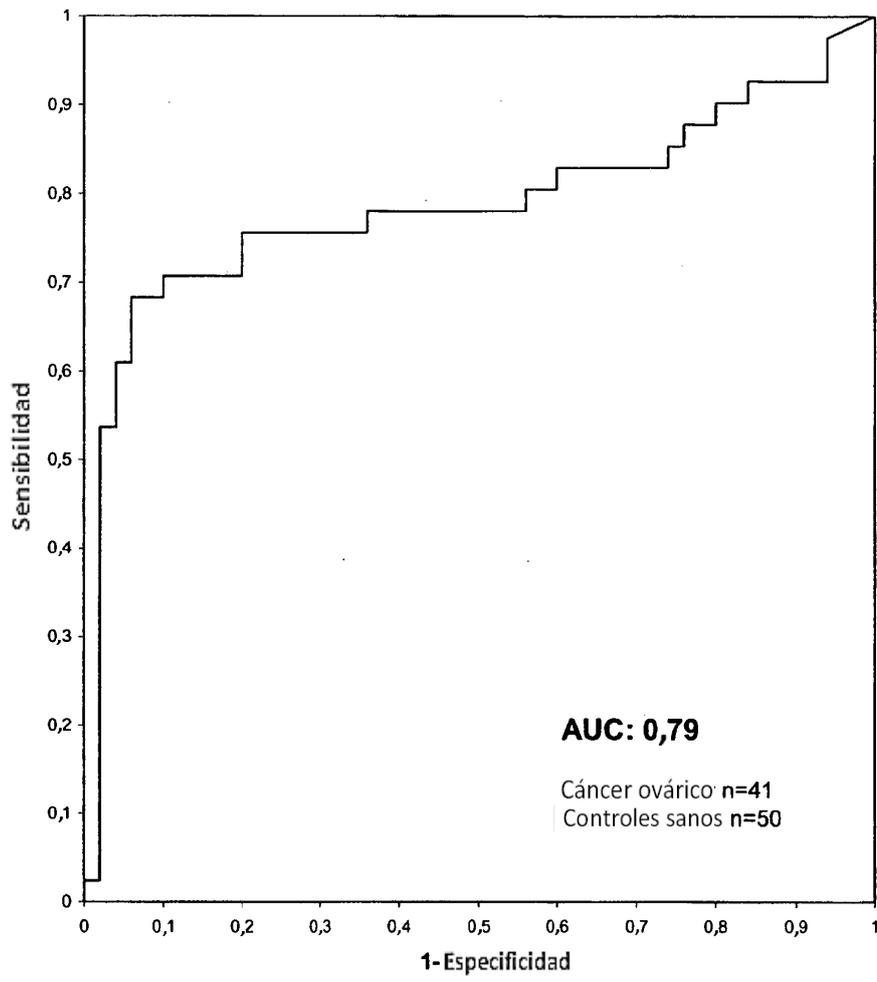
**Fig. 3**



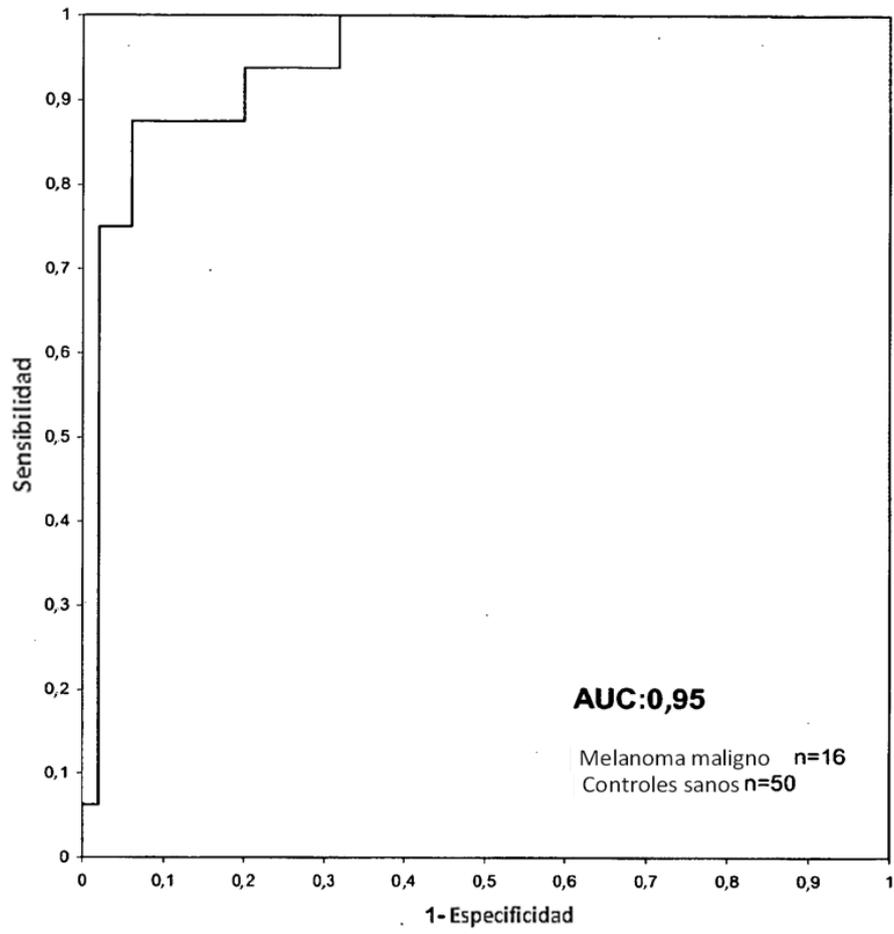
**Fig. 4**



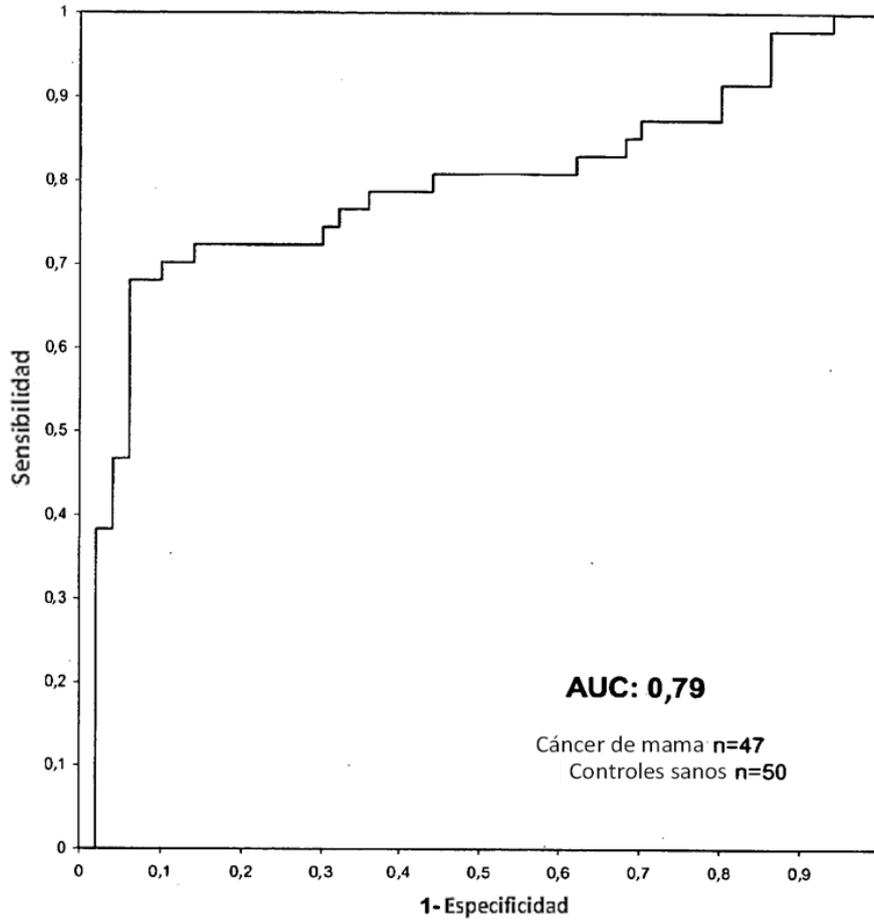
**Fig. 5**



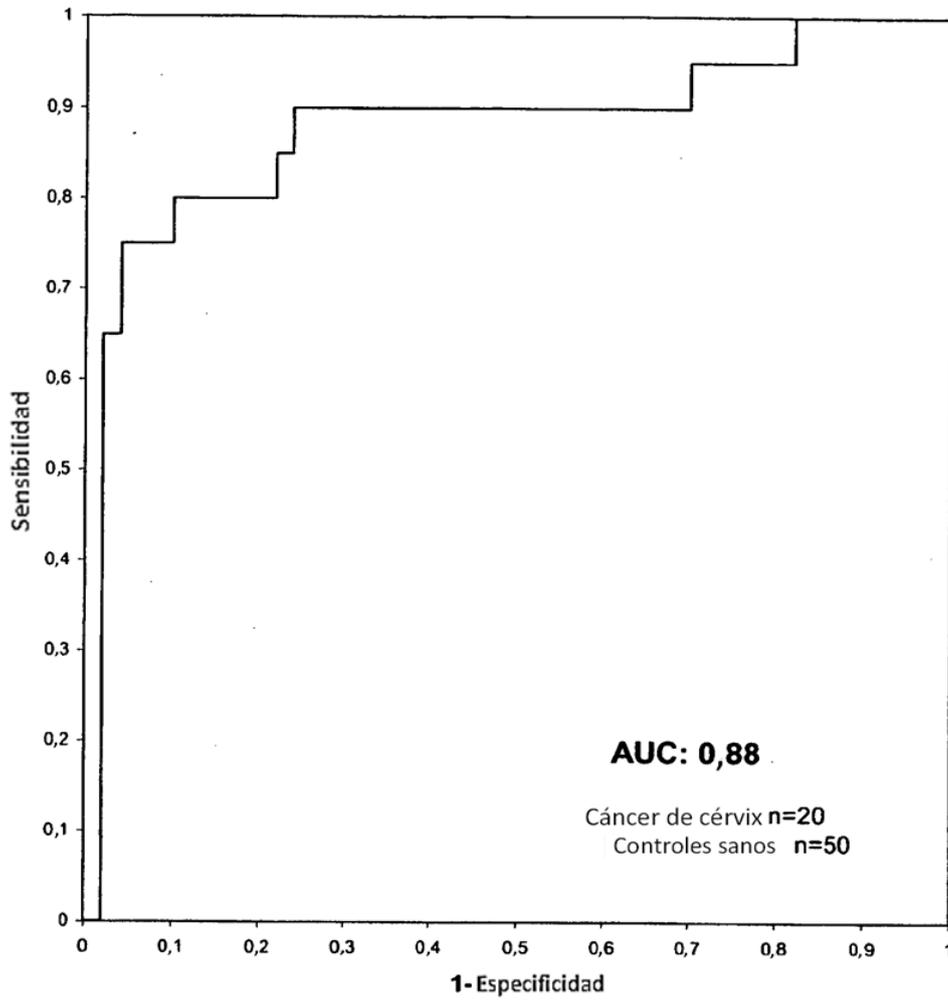
**Fig. 6**



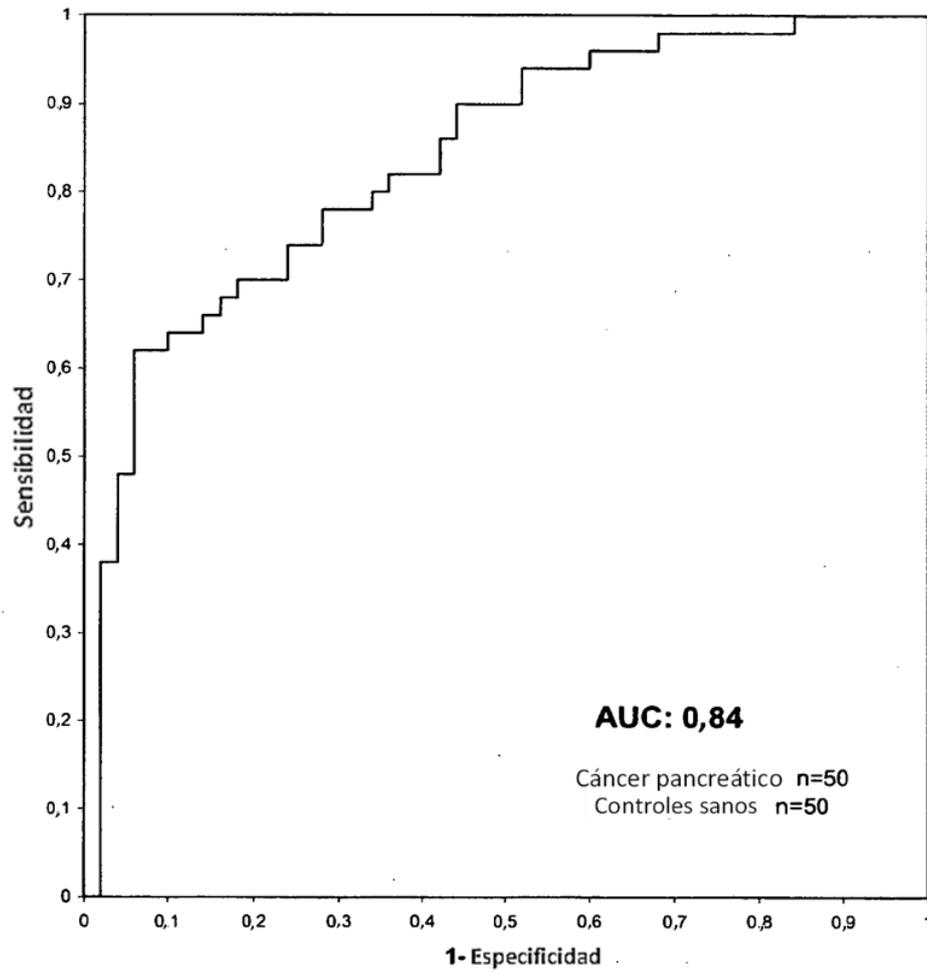
**Fig. 7**



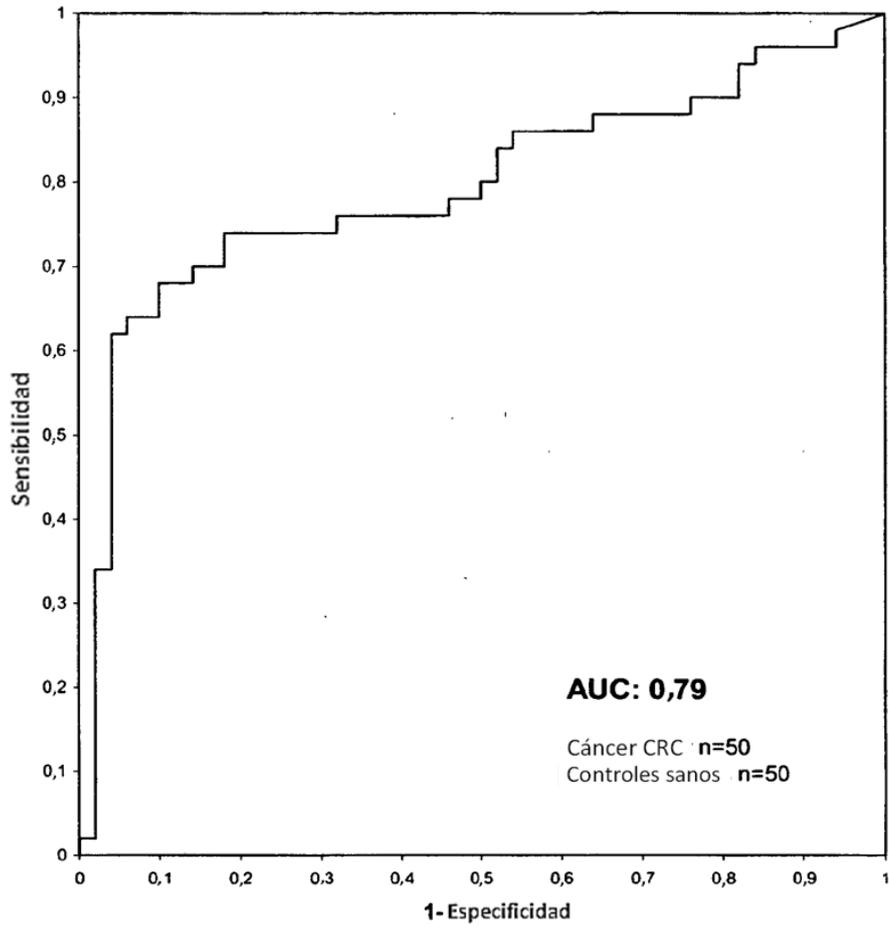
**Fig. 8**



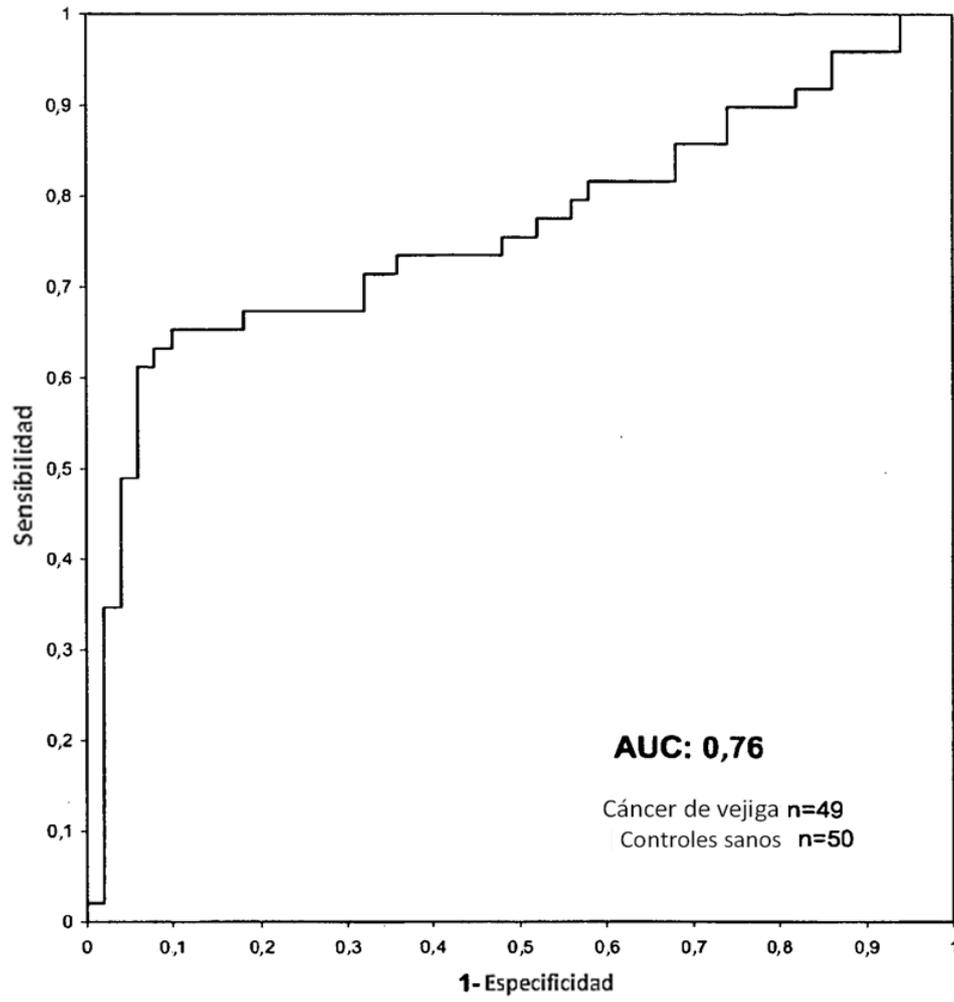
**Fig. 9**



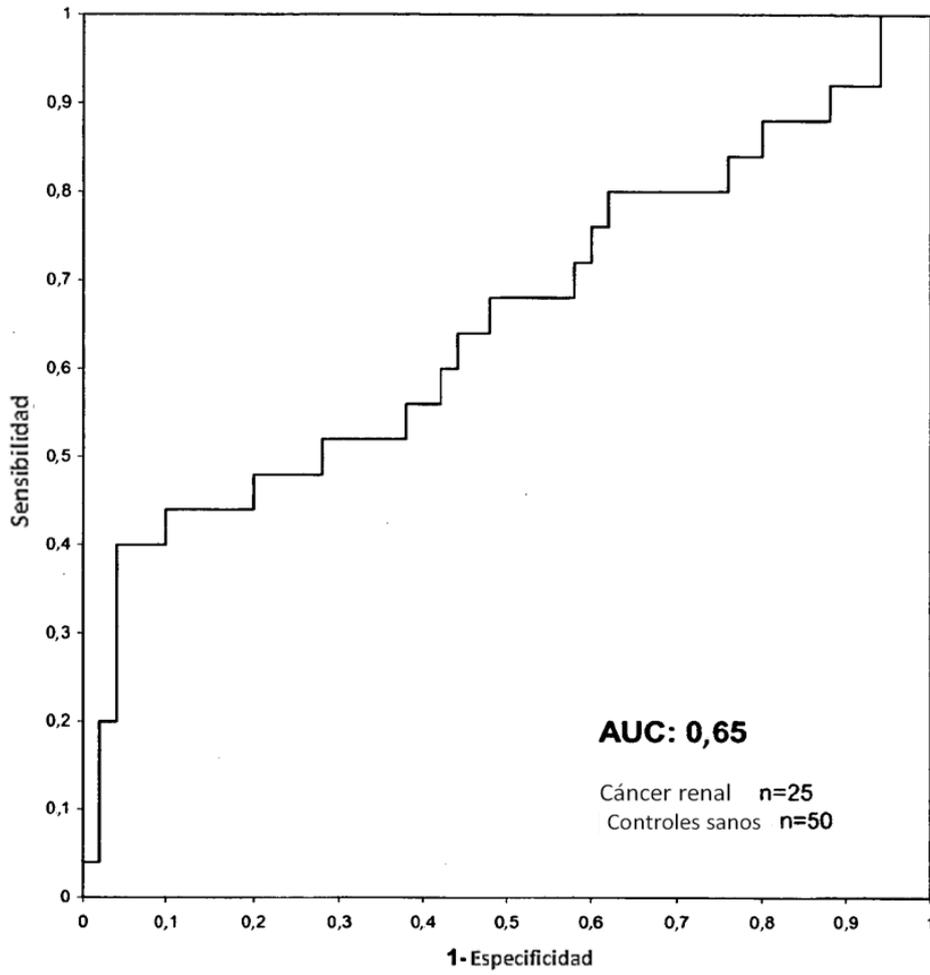
**Fig. 10**



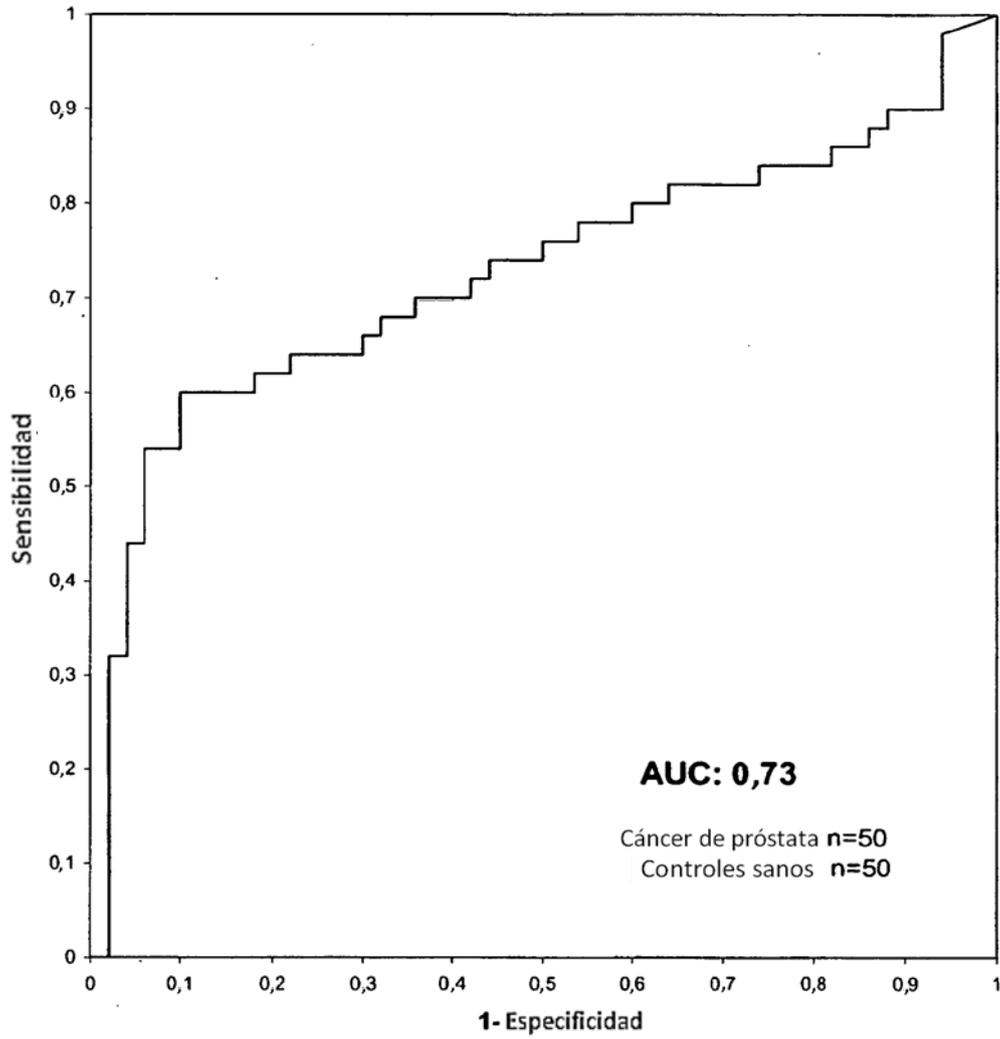
**Fig. 11**



**Fig. 12**



**Fig. 13**



**Fig. 14**

1 MGIQGLAKLI ADVAPSAIRE NDIKSYFGRK VAIDASMSIY QFLIAVRQGG  
51 DVLQNEEGET TSHLMGMFYR TIRMMENGIK PVYVFDGKPP QLKSGELAKR  
101 SERRAEAEKQ LQQAQAAGAE QEVEKFTKRL VKVTKQHND E CKHLLSLMGI  
151 PYLDAPSEAE ASCAALVKAG KVYAAATEDM DCLTFGSPVL MRHLTASEAK  
201 KLPIQEFHLS RILQELGLNQ EQFV DLCILL GSDYCESIRG IGPKRAVDLI  
251 QKHKSIEEIV RRLDPNKYPV PENWLHKEAH QLFLEPEVLD PESVELKWSE  
301 PNEEELIKFM CGEKQFSEER IRSGVKRLSK SRQGSTQGRL DDFPKVTGSL  
351 SSAKRKEPEP KGSTKKKAKT GAAGKFKRGK