

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 209**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2008 E 08730378 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2126562**

54 Título: **Métodos diagnósticos dirigidos a intervención clínica**

30 Prioridad:

23.02.2007 US 903038 P
17.08.2007 US 840777

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

27.02.2015

73 Titular/es:

**PHYSICIANS CHOICE LABORATORY SERVICES,
LLC (100.0%)**
854 Paragon Way
Rock Hill, SC 29730 , US

72 Inventor/es:

SHUBER, ANTHONY P. y
CHIU, EUGENE

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 530 209 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

Métodos diagnósticos dirigidos a intervención clínica

Solicitud de prioridad

5 Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud de EE.UU. nº 11/840.777, presentada el 17 de agosto de 2007 y reivindica beneficio sobre la Patente de EE.UU. con nº de serie 60/903.038, presentada en 23 de febrero de 2007.

Antecedentes de la invención

Los médicos emplean ensayos de escrutinio estándares para determinar el estado de salud actual de los pacientes y para proporcionar información sobre los riesgos de un paciente de padecer una enfermedad o afección particular. Los ensayos de escrutinio generalmente emplean un valor umbral por encima del cual un paciente es considerado en el escrutinio como "positivo" para la enfermedad indicada, y por debajo del cual el paciente es considerado en el escrutinio como "negativo" para la enfermedad indicada. Los umbrales de los ensayos de escrutinio generalmente se eligen con el objetivo de maximizar el número de pacientes que recibirán una intervención adicional en forma de monitorización diagnóstica o terapia. Sin embargo, todos los ensayos de escrutinio dan lugar a determinaciones de falsos positivos y falsos negativos. Esto significa que hay una porción de la población de pacientes sometidos al escrutinio que son considerados positivos y se les prescribe una intervención adicional, los cuales, en realidad, son negativos y no necesitan dicha intervención adicional. También existen pacientes que son considerados negativos en el escrutinio pero que en realidad son positivos y requieren una intervención acelerada o más significativa (es decir, respecto a los cuidados estándar). En los ensayos de escrutinio estándar, los pacientes no pueden ser ubicados de forma no ambigua en ninguna categoría clínica. Por tanto, siempre hay una población de pacientes (falsos negativos y falsos positivos) que están destinados a un seguimiento impropio debido a la ambigüedad inherente al escrutinio.

Un área en la que esta ambigüedad es particularmente significativa para los pacientes es la de monitorización de recurrencia en cáncer. Los pacientes de cáncer que han sido tratados con éxito deben estar preocupados por si el tumor volverá a aparecer o por si se desarrollará un tumor secundario como resultado de la quimioterapia y la radiación usada para erradicar el cáncer original. Someter a dichos pacientes a un escrutinio para determinar la recurrencia es importante, ya que muchos cánceres recurrentes pueden ser tratados con una intervención mínima si son cogidos suficientemente pronto. Por tanto, la mayoría de los supervivientes de cáncer son monitorizados en intervalos que dependen principalmente del tipo de cáncer para que el fueron tratados originalmente y del tipo de tratamiento original que recibieron. Los ensayos de escrutinio para cáncer recurrente aplican los mismos criterios estadísticos que el escrutinio para colesterol y otros ensayos comunes. Por tanto, existe un número significativo de pacientes cuyas puntuaciones en los ensayos son ambiguas debido a que están en el límite, o cerca, de un rango de muestras "normales". Habitualmente, se requiere que dichos pacientes continúen con el escrutinio y quizás incluso que sean sometidos a una profilaxis que puede ser innecesaria pero que es prescrita según los estándares de cuidados prevalentes. Además, los pacientes que se encuentran en riesgo elevado de recurrencia a menudo no son identificados como tales y, por tanto, no se les proporciona una vigilancia adicional que puede ser necesaria para efectuar una detección temprana de la recurrencia. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica para proporcionar ensayos de escrutinio que eliminen tantos resultados ambiguos como sea posible, limitando de este modo el número de pacientes que deben someterse a procedimientos innecesarios y optimizando la identificación de los pacientes que con seguridad se beneficiarían de una monitorización y/o intervención continua.

40 Compendio de la invención

La invención proporciona métodos para determinar el estatus clínico de un paciente. En particular, la invención proporciona métodos para identificar la presencia, o la probabilidad, de un cáncer o de recurrencia de cáncer. En la práctica, los métodos de la invención proporcionan la capacidad para realizar un escrutinio de pacientes en una de tres categorías clínicas distintas. En base a la medición de biomarcadores clínicamente relevantes en una muestra obtenida de un paciente, la invención permite la identificación inequívoca de pacientes que no están en riesgo o que no tienen el cáncer relevante, la identificación inequívoca de pacientes que tienen riesgo o que tienen el cáncer; y la identificación de pacientes que deberían recibir el tratamiento de cuidados y/o la monitorización estándares. El uso de la invención maximiza el número de pacientes que recibirán una intervención o una monitorización aceleradas y minimiza aquellos pacientes que recibirán un estándar de cuidados innecesario o una intervención o monitorización aceleradas.

Los métodos de la invención son particularmente útiles en la determinación clínica de recurrencia de cáncer. La práctica de la invención permite la identificación inequívoca de pacientes que no están en riesgo de recurrencia de cáncer o que no tienen un cáncer recurrente, y de aquellos que tienen un riesgo elevado de recurrencia o que tienen cáncer recurrente. Por tanto, la práctica de la invención permite a un médico estratificar pacientes de forma diferencial con el objetivo de reducir o eliminar la monitorización/tratamiento de un grupo entero de pacientes. La invención también proporciona los medios para identificar a aquellos pacientes que requieran de monitorización y/o intervención. Los pacientes que no se ajusten a ninguna de dichas categorías reciben los cuidados estándar de monitorización y/o intervención. La práctica de la invención permite a un médico eliminar pacientes de una

intervención diagnóstica o terapéutica adicional que no están en riesgo de cáncer e incrementar la intervención para pacientes que tienen un riesgo elevado. Los métodos de la invención pueden repetirse longitudinalmente a fin de proporcionar una determinación continua de la salud del paciente. En cada momento del ensayo, se ubica al paciente en una de las tres categorías mencionadas anteriormente - los que no están en riesgo actualmente, los que

5 tienen un riesgo elevado y los que están entre medias.

Según la invención, se mide una cantidad de biomarcador en una muestra de un paciente y a continuación se compara con uno o más niveles umbral del mismo biomarcador. En base a la comparación del nivel de biomarcador del paciente y los valores umbral, se asigna al paciente a uno de los tres grupos. El primer grupo consiste en pacientes que tienen niveles de biomarcador que están por debajo de un nivel umbral que se asocia de forma inequívoca a no recurrencia de un cáncer al cual está asociado el biomarcador. El segundo grupo consiste en

10 pacientes que tienen niveles de biomarcador que se asocian de forma inequívoca a recurrencia del cáncer. El grupo final de pacientes presenta niveles de biomarcador que están entre medias de los dos umbrales y por tanto son sometidos a la incertidumbre estándar del ensayo de escrutinio en su diagnosis. Según los métodos de la invención, los pacientes del primer grupo pueden recibir una intervención terapéutica, profiláctica, de monitorización actual adicional en relación a la enfermedad. El segundo grupo debería recibir una mayor monitorización que el estándar de cuidados; y el tercer grupo se propone para ser sometido al estándar de cuidados para monitorización de recurrencia para la enfermedad en cuestión.

Por tanto, la invención proporciona un modo de estratificar pacientes de tal modo que se proporcione una mejor vigilancia a aquellos que lo necesiten, que se evite para los que no necesitan monitorización adicional en un momento dado, y que se aplique el estándar de cuidados para el resto de pacientes. Además de proporcionar una mayor certeza con respecto a porciones significativas de la población, la invención permite ahorrar costes y reducir el riesgo de un diagnóstico erróneo debido a las ambigüedades asociadas a los ensayos de escrutinio típicos.

20

En otra realización que no forma parte de la invención, se usa un único umbral a fin de identificar un subconjunto de pacientes que de forma inequívoca no tienen enfermedad recurrente. Por ejemplo, se obtiene un biomarcador indicativo de enfermedad recurrente a partir del paciente. La cantidad de biomarcador en la muestra del paciente se compara con un umbral por debajo del cual no se espera recurrencia. A continuación, los pacientes son informados de forma inequívoca de que, en ese momento, no necesitan una monitorización, terapia o escrutinio adicionales bajo el estándar de cuidados normales para enfermedades recurrentes. Al resto de pacientes se les proporciona un estándar de cuidados de escrutinio, monitorización y/o terapia. El procedimiento de seguimiento de monitorización puede ser un procedimiento de obtención de imágenes o un procedimiento invasivo. Los ejemplos de procedimientos de imagen incluyen, aunque sin limitación, escáner PET, IRM, escáner CT, ultrasonografía, estudio Doppler, escáner nuclear y rayos-X. El procedimiento invasivo puede ser quirúrgico o médico. Los ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, aunque sin limitación, biopsia, resección, escisión o aspiración. Los ejemplos de procedimientos médicos incluyen, aunque sin limitación, cistoscopia, broncoscopia, laparoscopia, colonoscopia, sigmoidoscopia, laringoscopia, angiografía o cateterización. Los procedimientos terapéuticos de seguimiento pueden ser quimioterapia, cirugía, radiación o terapia hormonal.

25
30
35

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo con respecto a cualquier enfermedad, pero son especialmente aplicable a enfermedades que tengan una tasa de recurrencia elevada, tal como el cáncer. Los umbrales usados para clasificar pacientes para un escrutinio o monitorización adicional se pueden obtener a partir de bibliografía, a partir de indicaciones conocidas, o pueden derivarse empíricamente. El umbral particular elegido dependerá del biomarcador particular que esté siendo evaluado. Para determinados marcadores, se pueden establecer los umbrales en base a datos conocidos de sensibilidad y especificidad. Por ejemplo, los escrutinios basados en biomarcadores que usan unos valores de corte de alta especificidad (p.ej., 100%) para proporcionar un valor predictivo altamente positivo (p.ej., 100% PPV) se pueden usar para determinar con certeza si un paciente (p.ej., un paciente de cáncer) necesita someterse a procedimientos diagnósticos o terapéuticos adicionales. Los escrutinios basados en biomarcadores que usan unos valores de corte de alta sensibilidad (p.ej., 95-100%) para proporcionar un valor predictivo altamente negativo (p.ej., 95-100% NPV) se pueden usar para determinar con certeza si un paciente (p.ej., un paciente de cáncer) puede evitar someterse a procedimientos diagnósticos o terapéuticos adicionales. En determinadas circunstancias, los resultados pueden incorporar otra información relevante sobre el paciente para ajustar mejor el diagnóstico. La sensibilidad representa cómo de bien un ensayo identifica la proporción de positivos verdaderos para una enfermedad en el ensayo de escrutinio y se puede expresar como el número de positivos verdaderos divididos por la combinación de positivos verdaderos y negativos falsos. La especificidad representa la proporción de casos negativos verdaderos en la población y puede expresarse como el número de negativos verdaderos dividido por el número de negativos verdaderos más el número de positivos falsos.

40
45
50

Los métodos de la invención son útiles para mejorar las características de actuación de los ensayos clínicos y los algoritmos de escrutinio existentes. Por ejemplo, los ensayos de escrutinio estándares pueden transformarse para generar resultados inequívocos con respecto a poblaciones de pacientes que o bien no requieren una monitorización adicional o que requieren una mayor monitorización. Los métodos de la invención son aplicables a cualquier algoritmo de escrutinio clínico en el que existan umbrales que han sido, o que pueden ser, identificados como se describe en la presente memoria a fin de categorizar a los pacientes en relación a un biomarcador, o conjunto de biomarcadores, asociados a una enfermedad particular. En el contexto de la invención, son útiles múltiples

55
60

biomarcadores con el objetivo de proporcionar sensibilidad y especificidad adicionales a los valores umbral para categorizar pacientes.

Debido a los principios implicados, la invención es aplicable a la monitorización de la recurrencia de cualquier enfermedad, tanto en poblaciones de pacientes sintomáticas como asintomáticas. Por ejemplo, la invención se puede aplicar a pacientes que previamente han padecido cáncer, una enfermedad infecciosa, diabetes, enfermedad neurológica, enfermedad metabólica, y otras. Los ejemplos de biomarcadores asociados con el cáncer incluye la matriz de metaloproteinasas (MMP), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), el complejo MMP/NGAL, timosina β 15, timosina β 16, producto de gen de tipo colágeno (CLG), prohibitina, glutatión-S-transferasa, beta-5-tubulina, ubiquitina, tropomiosina, Cyr61, cistatina B, caperonina 10 y profilina. Los ejemplos de MMPs incluyen, aunque sin limitación, MMP-2, MMP-9, complejo MMP9/NGAL, complejo MMP/TIMP, complejo MMP/TIMP1, ADAMTS-7 ó ADAM-12, entre otros. Asimismo, la muestra de paciente a partir de la cual se obtiene un biomarcador es irrelevante para el funcionamiento de la invención. Las fuentes de muestra preferidas incluyen sangre, suero, esputo, heces, saliva, orina, fluido cerebroespinal, aspirado de pezón, y pus.

La invención también puede usarse para monitorizar el progreso del tratamiento terapéutico. En ese contexto, se obtiene un biomarcador indicativo de una enfermedad a partir de un paciente que es tratado para la enfermedad asociada. La cantidad del biomarcador se compara con un umbral predeterminado por debajo del cual un paciente puede identificarse inequívocamente como que no requiere una intervención terapéutica adicional en ese momento. En otra realización, se puede aplicar un segundo umbral para identificar pacientes que tengan niveles del biomarcador seleccionados que indiquen inequívocamente que la terapia debería aumentarse y/o intensificarse. Los pacientes entre ambos umbrales están indicados para recibir una terapia de continuación de cuidados estándar.

Los métodos de la invención pueden usarse en pacientes que se sabe que tienen una enfermedad, o pueden usarse para realizar escrutinios de sujetos sanos de un modo periódico. Se puede someter a escrutinio a un sujeto simultáneamente para una o más enfermedades. El escrutinio se puede realizar de forma regular (p.ej., semanalmente, mensualmente, anualmente, o en otro intervalo de tiempo); o como un evento puntual. El resultado del análisis puede usarse para alterar la frecuencia y/o el tipo de protocolos de escrutinio, diagnóstico y/o tratamiento. Se pueden escrutar diferentes condiciones a diferentes intervalos de tiempo y en función de diferentes factores de riesgo (p.ej., edad, peso, género, historial de fumador, historial familiar, riesgos genéticos, exposición a toxinas y/o carcinógenos, etc., o una combinación de los mismos). El régimen particular de escrutinio que se use en relación a la invención y los biomarcadores particulares que se seleccionen son determinados a discreción del médico o especialista.

Los valores de umbral para cualquier biomarcador particular y la enfermedad asociada son determinados en referencia a bibliografía o a criterios de estándares de cuidados, o pueden determinarse empíricamente. En una realización preferida de la invención, los umbrales para uso en la invención son determinados como los niveles de un biomarcador particular usado en relación con la invención por debajo de los cuales existe aproximadamente un 100% de valor predictivo negativo. En otras palabras, no es de esperar que los pacientes con valores por debajo del umbral tengan la enfermedad para la cual se está llevando a cabo el escrutinio, y se puede determinar inequívocamente que no necesitan una intervención adicional en ese momento. En la realización de umbral dual, se determina un segundo umbral que tiene aproximadamente un 100% de valor predictivo positivo. Los niveles de biomarcador por encima de dicho umbral se asocian inequívocamente a la necesidad de una intervención adicional. Obviamente, en determinados estados de enfermedad, los valores predictivos negativos y positivos se invierten, de tal modo que un nivel por debajo del umbral más bajo indica la necesidad de monitorización adicional y un valor por encima del umbral más alto señala una determinación inequívoca de que el paciente no necesita seguir siendo monitorizado. Además, con determinados biomarcadores, los valores predictivos positivos y negativos no tienen que ser del 100%, si no que pueden ser algo menores que eso dependiendo de otros factores, tales como el historial genético del paciente o su predisposición, la salud general, la presencia o la ausencia de otros marcadores de enfermedades, etc. Aunque la clasificación inequívoca según la invención idealmente significa un valor predictivo del 100%, existe un rango aceptable por debajo de 100%, idealmente entre 95% y 100%. Según la invención, la clasificación inequívoca también puede basarse en el reconocimiento de una asociación de un estado de enfermedad con un nivel, niveles o rango de niveles, particulares del biomarcador. Finalmente, la clasificación inequívoca se puede basar en un nivel predeterminado de un marcador por encima o por debajo del cual se encuentran todos los pacientes afectados o no afectados. Por ejemplo, en una realización, la invención contempla la determinación del nivel de un biomarcador en un paciente y clasificando al paciente como que tiene una enfermedad si el nivel de biomarcador del paciente está por encima de un nivel presente en todos los pacientes que tengan la enfermedad.

Otros aspectos y características de la invención serán evidentes tras inspección de la siguiente descripción detallada de la misma.

Descripción de las Figuras

Figura 1: es una curva que muestra los niveles de MMP-9 obtenidos de pacientes de cáncer y de controles.

Figura 2: es una superposición que muestra los datos de MMP-9 discutidos más adelante en las curvas solapantes que son ejemplos de cortes para identificar recurrencia de enfermedad según los métodos de la invención.

5 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona la capacidad de clasificar inequívocamente pacientes en poblaciones diferentes para el escrutinio de cáncer recurrente. Según la invención, los pacientes que tienen un biomarcador asociado a cáncer recurrente que entran dentro de un primer umbral predeterminado son clasificados de forma inequívoca en un grupo que no necesita terapia, monitorización u otra intervención de estándares de cuidados. Los pacientes que tienen niveles de biomarcador que exceden un segundo umbral predeterminado son clasificados en un grupo que recibe una terapia, monitorización u otra intervención, aceleradas o incrementadas. A los pacientes entre ambos umbrales se les proporciona una terapia, monitorización u otra intervención, de estándar de cuidados. En un aspecto, se usa un único umbral con el objetivo de descartar a un subconjunto de pacientes que no necesitan someterse a continuación de terapia, monitorización u otra intervención.

La invención incorpora la noción de que existen niveles relevantes de biomarcadores asociados a enfermedad que permiten predecir la recurrencia o la no recurrencia de forma inequívoca. Con ello se pretende indicar que los subconjuntos de pacientes pueden ser excluidos de seguir siendo monitorizados o se les puede asignar una mayor vigilancia con una certeza de entre aproximadamente el 95% y aproximadamente el 100% con respecto al resultado.

Los pacientes que hayan sido tratados para un cáncer para el cual existe un biomarcador predictivo entrarán dentro de un continuo de valores con respecto a la recurrencia. En los extremos de dicho continuo, uno puede predecir con certeza, o cerca de la certeza, si el paciente desarrollará un cáncer recurrente. Por tanto, se puede determinar que los pacientes que están por debajo de un primer umbral no han desarrollado cáncer recurrente con una probabilidad predictiva negativa del 100%; mientras que se puede determinar que los pacientes que presentan valores superiores a un segundo umbral tienen cáncer recurrente con una probabilidad predictiva positiva del 100%. Se pueden seleccionar las dos líneas de umbral para reflejar cualquier porcentaje de sensibilidad y especificidad que se desee, pero idealmente los umbrales se fijan de tal modo que el valor predictivo negativo del umbral más bajo sea superior a aproximadamente el 95% y el valor predictivo positivo del umbral más alto sea superior a aproximadamente el 95%. El valor predictivo negativo es la proporción de negativos verdaderos respecto a los negativos verdaderos más los negativos falsos. El valor predictivo positivo es la proporción de positivos verdaderos respecto a los positivos verdaderos más los positivos falsos.

Existen otros métodos para determinar umbrales para uso en la invención, que incluyen referencia a los valores estándares de la bibliografía o estándares de cuidados asociados. Sin embargo, los valores exactos seleccionados son irrelevantes ya que lo que importa es la asociación del umbral a un valor altamente predictivo con respecto a los pacientes que quedan fuera de los umbrales.

De forma similar, el biomarcador elegido es irrelevante para la operación de la invención, siempre que el marcador esté asociado a la enfermedad para la cual se está llevando a cabo el escrutinio. Algunos biomarcadores que han sido asociados a enfermedades incluyen los marcadores de ácido nucleico (que incluyen, aunque sin limitación, K-ras, K-ras2, APC, DCC, TP53, PRC1, NUSAP1, CAPZ, PFKP, EVER1, FLT1, ESPL1, AKAP2, CDC45L, RAMP, SYNGR2, NDRG1, ZNF533 y ácido nucleico hipermetilado), proteínas y péptidos, carbohidratos, azúcares, glucanos, lípidos, hormonas (p.ej., hormona antidiurética (ADH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona del crecimiento (GH), hormona estimulante de foliculo (FSH), hormona luteinizante (LH), estrógeno (estradiol, estrona, estriol), progesterona, testosterona, dihidrotestosterona (DHT), inhibina, somatotropina, dehidroepiandrosterona (DHEA), somatostatina, glucagón, insulina, tirotropina, hormona estimulante de tiroide (TSH), tirosina, hormona paratiroide, corticotropina, cortisol, corticosterona, aldosterona, epinefrina, norepinefrina, prolactina, vasopresina, oxitocina, itocina, hormona estimulante de melanocito (MSH)), factores de crecimiento (p.ej., factor estimulante de colonia de melanocitos (G-CSF), factor estimulante de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), factor de crecimiento de nervio (NGF), neurofoninas, factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), eritropoietina (EPO), trombopoietina (TPO), miostatina (GDF-8), factor de diferenciación de crecimiento (GDF-9), factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF ó FGF2), factor de crecimiento de fibroblasto ácido, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de hepatocito (HGF), factor de célula madre humana (SCF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor- β de necrosis tumoral (TNF- β), factor- α de necrosis tumoral (TNF- α), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor- β de crecimiento de transformación (TGF- β), factor- α de crecimiento de transformación (TGF- α), factor-I de crecimiento de tipo insulina (IGF-I), factor-II de crecimiento de tipo insulina (IGF-II), y factor estimulante de colonia (CSF)), citocinas (p.ej., IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IFN- α , IFN- β e IFN- γ), proteínas (p.ej., metaloproteinasas de matriz (MMPs) tales como MMP2, MMP9, lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), complejo MMP/NGAL, timosina β 15, timosina β 16, producto de gen de tipo colágeno (CLG), prohibitina, glutathion-S-transferasa, beta-5-tubulina, ubiquitina, tropomiosina, Cyr61, cistatina B, chaperonina 10, profilina, Alfa-fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, receptor de factor de crecimiento epidermal, Kallikreína 3 (antígeno específico de próstata), factor A de crecimiento endotelial

vascular, VEGF, albúmina, CA 125, calcitonina, cromogranina A (proteína secretora paratiroide 1), ACTH que contiene corticotropina-lipoproteína, receptor 1 de estrógeno, gastrina, receptor de progesterona, prolactina, cadena alfa S100, somatostatina, tiroglobulina, V-erb-b2, Her2/neu, antígeno identificado por anticuerpo monoclonal Ki-67, CLU-linfoma 2 de célula B, proteína X asociada a BCL2, beta-2-microglobulina, cáncer de mama 1 de inicio temprano, BRCA1, CA 15.3, CA 19.9, caderina 1 de tipo 1 de E-caderina (epitelial), caspasa 3, antígeno CD44, antígeno p53 de tumor celular, factor II de coagulación, protrombina, factor 2 de estimulación de colonia (granulocito-macrófago), factor 3 de estimulación de colonia (granulocito), proteína C-reactiva, ciclina D1, inhibidor 1 de quinasa dependiente de ciclina, p21, eritropoietina, cadena de fibrinógeno, alfa/alfa E, hormona estimulante de foliculo, enolasa gamma, insulina, interferón gamma, interleucina 2, interleucina 6, k-ras, neprilisina, CD 10, transferrina, tripsina, factor de necrosis tumoral (TNF-alfa), miembro 6 de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral, fas, factor de Von Willebrand, Chimiocina, proteína 1 de tipo quitinasa-3, YKL-40, cadena beta de coriagonadotropina, factor 1 de estimulación de colonia (macrófago), haptoglobina-1, factor de crecimiento de hepatocito, inhibina, cadena alfa de receptor de interferón alfa/beta, cadena beta de receptor de interferón alfa/beta, Kallikreína 10, Kallikreína 11, Kallikreína 6, metaloproteinasas de matriz 3, ADAM-12, citocina A21 inducible pequeña (CCL21) soluble IL-2R alfa, factor de crecimiento de somatotropina, hormona de crecimiento, inicio temprano de cáncer de mama 2, BRCA2, catenina beta 1, catepsina D, CD15, desmina, liasa de ADN-(sitio apurínico o apirimidínico), APEX, cadena beta de lutropina, hormona luteinizante, hormona paratiroide, antígeno nuclear de célula proliferante, miembro 8 de la superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral (ligando CD30), homólogo de oncogén vírico de mielocitomatosis V-myc (avian), miembro 8 de la superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral (CD30), 17-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17HSD1), fosfatasa ácida de próstata, adrenomedulina, aldolasa A, fosfatasa alcalina específica de hueso, fosfatasa alcalina, tipo placentar, alfa-1-ácido glicoproteína 1, orosomucoide, alfa-1-antitripsina, alfa-2-H S-glicoproteína, alfa-2-macroglobulina, alfa-lactalbúmina, angiogenina ribonucleasa ARNasa A familia 5, angiopoietina 1, angiopoietina 2, antileucoproteinasas 1, SLPI, apolipoproteína AI, apolipoproteína A-II, apolipoproteína C-1, apolipoproteína C-III, sialoproteína ósea II, factor neurotrófico derivado de cerebro, supresor de metástasis de cáncer de mama 1, CA 27.29, CA 72-4, catepsina B, CC quimiocina 4, HCC-4, CD44 variante V5 soluble, ceruloplasmina, proteína p40 de protooncogén de cáncer cervical 1, quimiocina (estructura C-C) ligando 4 citocina inducible pequeña A4 (CCL4), MIP-1-beta, claudina-3, claudina-4, clusterina, factor de coagulación III, cadena A de factor de coagulación XIII, cadena B de factor de coagulación XIII, telopéptido C-terminal de colágeno, componente de complemento 3, componente de complemento 4, componente de complemento 7, proteína relacionada con factor H de complemento, quinasa 6 dependiente de ciclina, ciclooxigenasa-2, cistatina A, cistatina B, cistatina C, citoqueratina 8, inhibidor de unión de diazepam, endoglina, endotelina 1, factor de crecimiento epidermal, E-selectina, ferritina H, factor 2 de crecimiento de fibroblasto (básico), fibronectina 1, ligando de Flt-3, quinasa 1 de tirosina relacionada a Fms, VEGFR1, follistatina, aldolasa B de bifosfato de fructosa, aldolasa C de bifosfato de fructosa, geminina, isomerasa de glucosa-6-fosfato, glipicano-3, N-terminal, arresto de crecimiento y alfa inducible por daño a ADN, proteína ácida inmunosupresora, factor 1 de crecimiento de tipo insulina (somatomedina C), factor 2 de crecimiento de tipo insulina (somatomedina A), proteína 1 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, proteína 2 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, proteína 3 de unión a factor de crecimiento de tipo insulina, molécula 1 de adhesión intercelular, interferón alfa 1, interleucina 1 alfa, interleucina 1 beta, interleucina 10, interleucina 12A, interleucina 16, interleucina 5, receptor de interleucina 6, transductor de señal de interleucina 6, interleucina 7, interleucina 8, interleucina 9, proteína antagonista de receptor de interleucina 1, IRAP, Kallikreína 14 (hK14), Kallikreína 2 prostática, Kallikreína 5, Kallikreína 7, Kallikreína 8, Kallikreína 18, Kallikreína 8, queratina 18, queratina, tipo I citoesquelético 19, citoqueratina 19, ligando Kit, lactotransferrina, leptina, L-selectina, receptor de hormona liberadora de hormona luteinizante, proteína de unión Mac-2 90K, mammaglobina B, suero mamario, antígeno, receptor de factor de crecimiento de células madre/mastocitos, actividad de inhibición de melanoma, proteína de cofactor de membrana, antígeno CD46, mesotelina, midkina, proteína MK-1, Ep-CAM, proteína 1 de determinación de mioblasto, factor beta de crecimiento de nervio, netrina-1, proteína 55 secretora de neuroendocrino, defensina 1 de neutrófilo, defensina 3 de neutrófilo, Nm23-H 1, OVX1, OX40, proteína oncofetal p65, inhibidor de tripsina secretora pancreática, TATI, proteína relacionada con hormona paratiroide, Pcaf, factor asociado a P300/CBP, pepsinógeno-1, proteína 12 de tejido específico placentar, proteína de unión a retinol de plasmático, plasminógeno, plasminógeno (contiene angioestatina), molécula de adhesión celular endotelial de plaqueta, PECAM-1, factor 4 de plaquetas, polipéptido de factor beta de crecimiento derivado de plaqueta, polipéptido alfa de receptor de factor de crecimiento derivado de plaqueta, proteína de zona de embarazo, proteína-A plasmática asociada al embarazo, proteína PSP94 secretora de próstata, P-selectina, proteína de unión de PSP94, piruvato quinasa, isozimas M1/M2, proteína portadora de riboflavina, cadena beta 100, fosfoproteína 1 secretada, osteopontina, inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa clade B, maspina, inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa clade E, PAI-1, suero amiloide alfa-1, suero paraoxonasa/arilesterasa 1, citocina inducible pequeña A14 CCL14, citocina inducible pequeña A18(CCL18), MIP-4, citocina inducible pequeña A2(CCL2), citocina inducible pequeña A3(CCL3), proteína 1-alfa inflamatoria de macrófago, citocina inducible pequeña B5(CXCL5), antígeno 1 de carcinoma de células escamosas, antígeno 2 de carcinoma de células escamosas, survivina, sindecano-1, sinucleína-gamma, tirosina quinasa TEK endotelial, Tie-2, tenascina, tetranectina, receptor de TGF-beta tipo III, tirredoxina reductasa 1, trombopoietina, trombopoietina 1, timidina quinasa, inhibidor de tejido de metaloproteinasas 1, inhibidor de tejido de metaloproteinasas 2, activador de plasminógeno de tipo tejido, tPA, receptor de transferrina (p90 CD71), factor alfa de crecimiento de transformación, factor beta 1 de crecimiento de transformación, transtiretina, cadena alfa de tropomiosina 1 (alfa-tropomiosina), miembro 5 de superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, CD 154, miembro 6 de superfamilia (ligando) de factor de necrosis tumoral, ligando Fas, miembro 13B de superfamilia de ligando de factor de necrosis tumoral,

5 TALL-1, miembro 11B de superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral, osteoprotegerina, miembro 1A de superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral p60 TNF-RI p55 CD120a, TNFR1, miembro 1 B de superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral, TNFR2, receptor de superficie activador de plasminógeno de uroquinasa, U-PAR, molécula 1 de adhesión de célula vascular, receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular, péptido intestinal vasoactivo, VEGF(165)b, proteína C dependiente de vitamina K, vitronectina, y proteína-1 de unión a X box), anticuerpos, o cualquier combinación de los mismos.

Ejemplo

10 Los métodos de la invención se aplicaron a una cohorte de pacientes sanos, pacientes de cáncer y pacientes sin cáncer que presentaban una variedad de síntomas. Se evaluaron veintiocho pacientes con cáncer, 124 pacientes sanos y 78 pacientes que presentaban otros síntomas usando los métodos de la invención en un estudio ciego. La siguiente tabla muestra los diversos grupos de pacientes clasificados para el estudio.

| Indicación de enfermedad (N) |
|----------------------------------|
| Cáncer (28) |
| Sano (124) |
| Infertilidad (6) |
| Hernia (6) |
| Disfunción eréctil (14) |
| Infección de tracto urinario (2) |
| Piedras en el riñón (20) |
| Incontinencia urinaria (11) |
| Hematuria (7) |
| Diabetes (5) |
| Obstrucción de la vejiga (7) |

15 Se tomaron muestras de sangre de todos los pacientes y se obtuvieron los niveles de la matriz de metaloproteinasa, MMP-9, usando un ELISA estándar. Tal como se muestra a continuación en la Figura 1, las diferencias en MMP-9 entre los pacientes con cáncer y los que no tenían cáncer fueron estadísticamente significativas. Dichas diferencias permitieron la adquisición de los umbrales mostrados en la Figura 2, en los que los pacientes sin cáncer fueron identificados inequívocamente con un valor predictivo negativo del 99%. Eso permitió la exclusión del 73% de los pacientes que, en una monitorización diagnóstica estándar, habrían sido prescritos para recibir un escrutinio y/o tratamiento adicional (e innecesario). El umbral superior de la Figura 2 permitió identificar inequívocamente a los

20 pacientes con cáncer que requerían un seguimiento con un valor predictivo positivo del 100%. Esto dio como resultado un 43% de los pacientes que, en una monitorización diagnóstica estándar, habrían recibido solo los cuidados estándares de monitorización y/o terapia, pero que, como resultado de la aplicación de la invención, recibirán una monitorización y/o terapia más agresiva. Los pacientes entre ambos umbrales recibirán el tratamiento "cuidados estándar". El "corte óptimo" mostrado en la Figura 2 es el corte aplicado bajo los cuidados estándar

25 actuales para escrutinio, que habría dado como resultado que a un 16% de la población de pacientes no enfermos se les habría diagnosticado cáncer y habrían sido tratados innecesariamente; y un 14% de los pacientes con cáncer habrían sido diagnosticados como sanos y habrían recibido una intervención inadecuada. Por tanto, la aplicación de la invención con el objetivo de identificar umbrales inequívocos dio como resultado una diagnosis más precisa y la capacidad de prescribir una intervención más efectiva.

30 Según la invención, los umbrales determinados para MMP-9 se usan para hacer un escrutinio de pacientes con cáncer de vejiga y clasificarlos en uno de los tres siguientes grupos: aquellos que han sido identificados inequívocamente como que no están en riesgo de enfermedad recurrente, aquellos que tienen un riesgo elevado de enfermedad recurrente, y aquellos cuyos resultados de escrutinio son ambiguos y deberían recibir cuidados estándar de monitorización y/o terapia.

35

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para llevar a cabo una determinación clínica en un paciente que ha sido tratado previamente de cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de:

5 Establecer un primer valor umbral de un biomarcador determinado en base a un rango de niveles de dicho biomarcador obtenidos de una primera población de pacientes que tienen un cáncer primario y un cáncer recurrente, y de una segunda población de pacientes que tienen un cáncer pero no un cáncer recurrente, y por debajo del cual es de esperar que entre el 95% y el 100% de los pacientes estén en dicha segunda población de pacientes;

10 Establecer un segundo valor umbral de dicho biomarcador determinado en base a un rango de niveles de dicho biomarcador obtenidos de una primera población de pacientes que tienen un cáncer primario y un cáncer recurrente, y de una segunda población de pacientes que tienen un cáncer pero no un cáncer recurrente, y por encima del cual es de esperar que entre el 95% y el 100% de los pacientes estén en dicha primera población de pacientes;

Obtener un nivel de un biomarcador en un paciente que ha sido tratado previamente de cáncer midiendo el nivel de dicho biomarcador en una muestra procedente del paciente;

15 Aplicar dicho nivel para determinar si dicho nivel está por debajo de dicho primer umbral, lo que indicaría que no se requiere una intervención diagnóstica actualmente, o si dicho nivel está por encima de dicho segundo umbral, lo que indicaría que se requiere incrementar la intervención diagnóstica; y

Determinar que dicho paciente necesita de un régimen diagnóstico de cuidados estándar si dicho nivel está entre dicho primer umbral y dicho segundo umbral.

20 **2.** El método de la reivindicación 1, donde dicho biomarcador se selecciona del grupo que consiste en metaloproteinasas de matriz (MMP), lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL), complejo MMP/NGAL, timosina β 15, timosina β 16, producto de gen de tipo colágeno (CLG), prohibitina, glutationa-S-transferasa, beta-5-tubulina, ubiquitina, tropomiosina, Cyr61, cistatina B, chaperonina 10, TIMP, y profilina.

3. El método de la reivindicación 2, donde dicha MMP se selecciona del grupo que consiste en MMP- 2, MMP-9, complejo MMP9/NGAL, complejo MMP/TIMP, complejo MMP/TIMP1, ADAMTS-7 ó ADAM-12.

25

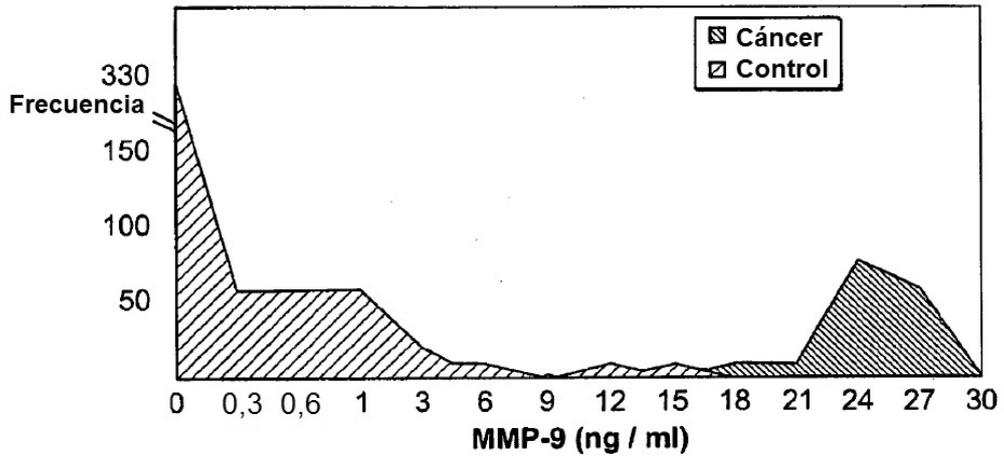


FIG. 1

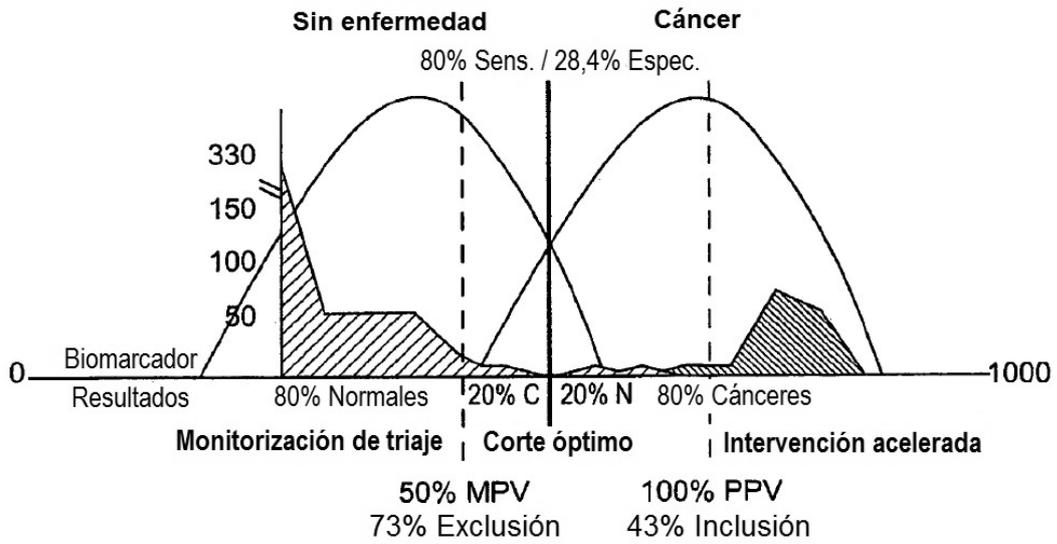


FIG. 2