

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 644**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2010 E 10722311 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2435830**

54 Título: **Secernina-1 como marcador de cáncer**

30 Prioridad:

29.05.2009 EP 09161524

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

30.03.2015

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 2 532 644 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

Secernina-1 como marcador de cáncer

5 La presente invención se refiere a un método de ayuda en la evaluación del cáncer. Da a conocer la utilización de la proteína Secernina-1 (=SCRN1) como marcador universal de diferentes tipos de cáncer. Además, se refiere especialmente a un método para evaluar el cáncer a partir de una muestra de suero o plasma, derivado de un individuo mediante la medición de SCRN1 en dicha muestra, en la que una concentración incrementada de proteína SCRN1 y/o fragmento de la misma es indicativa de cáncer, y en la que dicho método es un inmunoensayo de tipo
10 sándwich. La medición de SCRN1 puede utilizarse, por ejemplo, en la detección precoz del cáncer o en la vigilancia de pacientes que se someten a cirugía.

15 El cancer sigue siendo un importante reto para la salud pública a pesar de los avances en la detección y terapia. Las células de cáncer se caracterizan por la producción de proteínas marcadoras asociadas al cáncer. Las proteínas asociadas al cáncer se observan tanto en los tejidos como en los líquidos corporales de individuos que portan células de cáncer. Los niveles de las mismas habitualmente son bajos en los estadios tempranos del progreso carcinogénico y se incrementan a medida que progresa la enfermedad y sólo en raros casos se observa un nivel reducido de las proteínas durante el curso de la enfermedad. La detección sensible de estas proteínas es un enfoque ventajoso y prometedor al diagnóstico del cáncer, en particular en un diagnóstico precoz del cáncer. Los
20 tipos de cáncer más prevalentes son el cáncer de mama (CM), el cáncer de pulmón (CP) y el cáncer colorrectal (CCR).

Los enfoques terapéuticos más importantes para los tumores sólidos son:

- 25 a) resección quirúrgica del tumor,
b) quimioterapia,
c) terapia de radiación,
d) tratamiento con compuestos biológicos, como anticuerpos antitumorales o anticuerpos antiangiogénicos, y
e) una combinación de los métodos anteriormente indicados.

30 La resección quirúrgica de los tumores se acepta ampliamente como tratamiento de primera línea para los tumores sólidos de estadio temprano. Sin embargo, la mayoría de cánceres se detecta sólo cuando se vuelven sintomáticos, es decir, cuando los pacientes ya se encuentran en un estadio bastante tardío de progresión de la enfermedad.

35 La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión y gravedad. Agrupa los pacientes de cáncer de manera que puedan realizarse generalizaciones sobre el pronóstico y la elección de terapia.

40 Los diferentes estadios del CCR se clasificaban según los estadios de Duke A a D. Actualmente el sistema TNM es la clasificación más ampliamente utilizada de extensión anatómica del cáncer. Representa un sistema de estadificación uniforme e internacionalmente aceptado. Existen tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estado de los nódulos linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis distantes). Los criterios del TNM han sido publicados por el UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer), Sobin L.H., Wittekind Ch. (editores), TNM Classification of Malignant Tumours, sexta edición. 2002. Tras determinar el estatus de TNM, los
45 pacientes se agrupan en estadios de enfermedad indicados por los números de Roman, comprendidos entre I y IV, siendo IV el estadio de enfermedad más avanzado. La estadificación de TNM y los estadios de enfermedad de la UICC se corresponden tal como se muestra en la tabla a continuación, obtenida de Sobin y Witteking (editores), supra.

Tabla 1: interrelación entre la estadificación del TNM y los estadios de enfermedad de la UICC

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

50 Lo que resulta especialmente importante es que el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del CCR, se traduce en un pronóstico mucho mejor. En el CCR, los tumores malignos del tracto colorrectal surgen de tumores benignos, es decir del adenoma. Por lo tanto, los pacientes diagnosticados en el estadio de adenoma presentan el mejor pronóstico. Los pacientes diagnosticados incluso ya en el estadio Tis, N0, M0 ó T1-3, N0, M0, en caso de que reciban el tratamiento correcto, presentan una probabilidad de supervivencia a 5 años tras el diagnóstico superior al

90% en comparación con una tasa de supervivencia a 5 años de sólo 10% para los pacientes diagnosticados cuando ya se encuentran presentes metástasis distantes.

5 Los métodos de detección actuales, incluyendo los métodos de obtención de imágenes, tales como las imágenes de rayos X o de resonancia nuclear, en teoría podrían resultar apropiados, por lo menos parcialmente, para la utilización como herramienta de cribado general. Sin embargo, resultan muy costosos y no asequibles para los sistemas sanitarios para un uso general y amplio en cribados en masa de un gran número de sujetos, en particular para sujetos sin ningún síntoma de tumor.

10 De esta manera, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento simple y de buena relación coste/eficacia para la evaluación de tumores, por ejemplo para identificar los individuos que se sospecha que portan cáncer. Con este fin resultaría deseable un marcador tumoral general que fuese detectable en los líquidos corporales, por ejemplo en sangre, suero o plasma, o un panel de este tipo de marcadores.

15 Ya se utilizan clínicamente varios marcadores tumorales séricos. Por ejemplo, el fragmento soluble de 30 kDa de la citoqueratina-19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembrionario (ACE), la enolasa específica neuronal (EEN) y el antígeno del carcinoma de células escamosas (AnCE) son los marcadores de CP más conocidos. Sin embargo, ninguno de ellos satisface los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos de una herramienta de cribado (Thomas L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, Alemania, 2000).

20 Con el fin de que resulte de utilidad, un nuevo marcador diagnóstico como marcador único debe ser comparable a otros marcadores conocidos de la técnica, o mejor. Alternativamente, un nuevo marcador debe conducir a un avance en la sensibilidad o especificidad diagnóstica, o ambas, tanto en el caso de que se utilice solo como en el caso de que se utilice en combinación con uno o más marcadores diferentes, respectivamente. La sensibilidad o especificidad diagnóstica, o ambas, de un ensayo se evalúan mejor a partir de sus características de funcionamiento de receptor, las cuales se describen en mayor detalle posteriormente.

25 La sangre completa, el suero o el plasma son las fuentes de muestra utilizadas más ampliamente en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral precoz que ayudaría en la detección fiable del cáncer o que proporcionaría información pronóstica temprana podría conducir a un método que ayudaría mucho en el diagnóstico y en el control de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejorar la evaluación *in vitro* del cáncer y en particular del CP. Resulta especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del CP, ya que para los pacientes diagnosticados precozmente las tasas de supervivencia son mucho más altas que para los diagnosticados en un estadio más avanzado de la enfermedad.

30 La utilidad clínica de los marcadores bioquímicos en el cáncer de pulmón ha sido revisada recientemente (Duffy M.J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38:225-262, 2001).

35 En la actualidad CYFRA 21-1 se considera actualmente el mejor marcador tumoral conocido actualmente para el cáncer de pulmón. Aunque no es específico de un órgano se encuentra predominantemente en tejido pulmonar. La sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón está descrita en 46% a 61% a una especificidad de 95% hacia otras enfermedades pulmonares benignas. Los niveles séricos incrementados de CYFRA 21-1 también se asocian a enfermedad hepáticas benignas pronunciadas, a insuficiencia renal y a cáncer de vejiga invasivo. El ensayo para CYFRA 21-1 está recomendado para el control postoperatorio de la terapia.

40 El ACE pertenece al grupo de los antígenos carcinofoetales, habitualmente producidos durante la embriogénesis. El CEA no es específico de un órgano y se utiliza predominantemente para el control del cáncer colorrectal. Aparte de las malignidades, también varias enfermedades benignas tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis y las enfermedades autoinmunitarias se asocian a niveles séricos de CEA incrementados. A una especificidad de 95% para las enfermedades pulmonares benignas, se informa de que su especificidad para el cáncer de pulmón es de entre 29% y 44%. La utilización principal del ACE es en el seguimiento del cáncer de colon, especialmente cuando la enfermedad se ha metastazado. Sin embargo, una diversidad de cánceres puede producir niveles elevados de ACE, incluyendo el cáncer de mama. Un uso preferente del ACE es la vigilancia de la terapia del cáncer de pulmón.

45 La EEN es un marcador tumoral del CPCP. Generalmente, los niveles séricos incrementados de EEN se observan asociados a tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. También se observan niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades pulmonares y cerebrales benignas, tales como meningitis u otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y en lesiones traumáticas de la cabeza. Aunque se informa de que la sensibilidad para el CPCP a una especificidad de 95% es de entre 60% y 87%, el rendimiento del ensayo de EEN para el CPCNP es pobre (de entre 7% y 25%). La EEN está recomendada para el control de la terapia del CPCP.

50 AC 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9, un antígeno sialilado de Lewis (a)) en un glucolípido es un marcador tumoral de los cánceres gastrointestinales. Se observa en los epitelios gástrico, intestinal y pancreático. También pueden observarse concentraciones bajas en tejido adulto en el hígado, los pulmones y el páncreas. No existe correlación entre la masa tumoral y los valores de ensayo de CA 19-9. Por lo tanto, la determinación de AC 19-9 no puede utilizarse para la detección precoz del carcinoma pancreático. Debido a que la mucina es excretada exclusivamente

a través del hígado, incluso una colestasis leve puede conducir a niveles séricos de AC 19-9 claramente elevados en algunos casos. El marcador se utiliza principalmente como ayuda en el seguimiento del estado de la enfermedad en aquellos pacientes en los que se ha confirmado cáncer pancreático (sensibilidad de 70% a 87%). El 3% a 7% de la población presenta una configuración de grupo sanguíneo Lewis a-negativo/b-negativo y no pueden expresar la mucina con el determinante reactivo AC 19-9. Esto debe tomarse en consideración al interpretar los resultados.

El AC 125 se observa en un elevado porcentaje de tumores ováricos no mucinosos de origen epitelial y puede detectarse en el suero. El carcinoma ovárico constituye aproximadamente 20% de los tumores ginecológicos. Aunque los valores más altos del AC 125 se observan en pacientes que sufren de carcinoma ovárico, también se observan valores claramente elevados en tumores malignos del endometrio, mama, tracto gastrointestinal y diversos otros tumores malignos. En ocasiones se observan valores incrementados en diversas enfermedades ginecológicas benignas tales como quistes ováricos, metaplasia ovárica, endometriosis, útero miomatoso o cervicitis. También pueden observarse ligeras elevaciones de dicho marcadores al inicio del embarazo y en diversas enfermedades benignas (por ejemplo en la pancreatitis aguda y crónica, en enfermedades gastrointestinales benignas, en la insuficiencia renal, en enfermedades autoinmunitarias y en otros). Se han observado niveles marcadamente elevados en enfermedades hepáticas benignas tales como la cirrosis y la hepatitis. Pueden observarse elevaciones extremas en cualquier tipo de ascites debido a enfermedades malignas y benignas. Aunque el AC 125 es un marcador relativamente no específico, actualmente es el marcador tumoral más importante para el seguimiento de la terapia y el progreso de pacientes con carcinoma ovárico seroso. Se informa de una sensibilidad de 69% a 79% para una especificidad de 82% a 93%.

El APE ("antígeno prostático específico") es un marcador tumoral comúnmente analizado que se utiliza en los análisis de sangre. El APE aparentemente presenta una elevada especificidad de tejido; la glucoproteína se observa en epitelio prostático normal y en secreciones, pero no en otros tejidos. El APE es altamente sensible a la presencia del cáncer prostático. La elevación se correlacionaba con el estadio y volumen tumorales. Es predictivo de recurrencia y respuesta al tratamiento. Finalmente, el antígeno presenta valor pronóstico; los pacientes con valores muy elevados antes de la cirugía es más probable que recaigan.

La NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa, Swiss-PROT: P40261) presenta 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 de otras piridinas. Esta actividad resulta importante para la biotransformación de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. Se ha informado de que la proteína se expresa predominantemente en el hígado y que se localiza en el citoplasma. La NNMT ha sido clonada a partir de ADNc de hígado humano y contiene un marco de lectura abierto de 792 nucleótidos codificante de una proteína de 264 aminoácidos con una masa molecular calculada de 29,6 kDa (Aksoy S. *et al.*, J. Biol. Chem. 269:14835-14840, 1994). Se conoce poco en la literatura sobre un papel potencial del enzima en el cáncer humano. En un papel, se ha informado de la actividad enzimática incrementada de la NNMT hepática como marcador de la caquexia del cáncer en ratones (Okamura A. *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 89:649-656, 1998). En un informe reciente, se ha demostrado la regulación negativa del gen de NNMT en respuesta a la radiación en líneas celulares sensibles a la radiación (Kassem H.S. *et al.*, Int. J. Cancer 101:454-460, 2002). Recientemente se ha encontrado (documento nº WO 2004/057336) que la NNMT resulta de interés en la evaluación de la CCR.

PLProG es un marcador tumoral que resulta útil en la detección y seguimiento del CPCP. También se observan niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades pulmonares/pleurales no malignas, tales como la fibrosis pulmonar idiopática o la sarcoidosis. Aunque se informa de que la sensibilidad para PLProG en el campo del CPCP (a una especificidad del 95%) es de entre 47% y 86%, el rendimiento del ensayo de PLProG en el campo del CPCP es pobre, con una sensibilidad informada inferior al 10%.

El CCE se identificó originalmente en el CA de células escamosas del cérvix. La sensibilidad de CCE para el CP en general es baja (entre 18% y 27%). Por lo tanto, se considera que el ensayo de CCE no resulta adecuado para el cribado. Sin embargo, debido a la mayor sensibilidad para el CA de células escamosas, un uso preferente del CCE es el seguimiento de terapia, aunque CYFRA 21-1 generalmente funciona mejor. p53 (TP53, antígeno tumoral celular p53, supresor tumoral p53 ó fosfoproteína p53) es un factor de transcripción que induce la parada del crecimiento celular o la apoptosis (Appella E. *et al.*, Pathol. Biol. 48:227-245, 2000). p53 actúa como supresor tumoral en muchos tipos celulares y las mutaciones inactivadoras en su gen son los sucesos genéticos más comunes que inducen el desarrollo del cáncer en el ser humano (revisados en Oliver M. y Petitjean A., Cancer Gene Ther. 16:1-12, 2009; Petitjean A. *et al.*, Oncogene 26:2157-2165, 2007). Se observa la mutación de p53 en 40% a 50% de los carcinomas colorrectales y se asocia con la agresividad del carcinoma (Soussi T., Cancer Res. 60:1777-1788, 2000). Las mutaciones en el gen p53 conducen no sólo a la alteración de la función de la proteína sino también a la expresión de antígenos asociados a tumor (AAT) y al inicio de la respuesta autoinmunitaria y la generación de autoanticuerpos anti-p53 específicos en el suero de los pacientes de cáncer (Zhang J.Y. *et al.*, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 12:136-143, 2003; Soussi T., Cancer Res. 60:1777-1788, 2000). La detección de los autoanticuerpos anti-p53 en suero humano es una herramienta emergente para el diagnóstico y seguimiento del cáncer. Según el tipo de cáncer, la frecuencia de los autoanticuerpos anti-p53 en el suero es de entre 17,8% (CCR) y 16,1% (CP) y 7,8% (cáncer de mama) (Tan E.M. y Zhang J., Immunological Reviews 222:328-340, 2008; Zhang J.Y. *et al.*, Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 12:136-143, 2003).

La seprasa, también conocida como proteína de activación fibroblástica (=PAF), es una glucoproteína de 170 kDa que presenta actividad de gelatinasa y de dipeptidil-peptidasa que consiste de dos unidades de seprasa monoméricas idénticas (Pineiro-Sánchez M.L. *et al.*, J. Biol. Chem. 272:7595-7601, 1997; Park J.E. *et al.*, J. Biol. Chem. 274:36505-36512, 1999). El monómero de la proteína seprasa unida a membrana humana comprende 760 aminoácidos. Se predice que la seprasa humana presenta sus primeros 4 residuos N-terminales en el citoplasma de los fibroblastos, seguido de un dominio transmembranal de 21 residuos seguido de un dominio catalítico C-terminal extracelular de 734 residuos (Goldstein *et al.*, Biochim. Biophys. Acta 1361:11-19, 1997; Scanlan M.J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5657-5661, 1994). El experto en la materia conocerá una forma más corta de la proteína seprasa humana tan soluble como la seprasa o enzima circulante de corte de antiplasmina (=ECCA) (Lee K.N. *et al.*, Blood 103:3783-3788, 2004; Lee K.N. *et al.*, Blood 107:1397-1404, 2006), que comprende las posiciones aminoácidas 26 a 760 del número de acceso Q12884 de la base de datos Swissprot. El dímero de la seprasa soluble es una glucoproteína de 160 kDa que consiste de dos unidades monoméricas idénticas de la proteína seprasa soluble. Piñeiro-Sánchez *et al.* (supra) han encontrado que una expresión incrementada de la seprasa se correlaciona con el fenotipo invasivo de las células de melanoma y carcinoma humanas. Henry L.R. *et al.*, Clin. Cancer Res. 13:1736-1741, 2007, describen que los pacientes de tumor de colon humanos con niveles elevados de seprasa estromal es más probable que experimenten una progresión agresiva de la enfermedad y el potencial desarrollo de metástasis o recurrencia.

La dipeptidil-peptidasa IV (=DPPIV) humana, también conocida como CD26, es una molécula de superficie celular de 110 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana comprende 766 aminoácidos. Contiene actividad intrínseca de dipeptidil-peptidasa IV que elimina selectivamente el dipéptido N-terminal de los péptidos con prolina o alanina en la tercera posición aminoácida. Interactúa con diversas moléculas extracelular y también participa en cascadas intracelulares de transducción de señales. Las actividades multifuncionales de la DPPIV humana depende del tipo celular y de condiciones intracelulares o extracelulares que influyen sobre su papel como enzima proteolítico, receptor de superficie celular, proteína de interacción coestimuladora y mediador de la transducción de señales. La DPPIV humana presenta un dominio citoplasmático corto entre las posiciones aminoácidas 1 y 6, una región transmembranal entre las posiciones aminoácidas 7 y 28 y un dominio extracelular entre las posiciones aminoácidas 29 y 766 con actividad intrínseca de dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV). La dipeptidil-peptidasa V soluble (=DPPIV soluble) humana comprende las posiciones aminoácidas 29 a 766 del número de acceso P27487 de la base de datos Swissprot. El dímero de la DPPIV soluble es una glucoproteína de 170 kDa que consiste de dos unidades monoméricas solubles idénticas de la DPPIV.

El complejo soluble DPPIV/seprasa (=DPPIV/seprasa) se refiere al complejo soluble formado de un homodímero (170 kDa) de DPPIV soluble y un homodímero (160 kDa) de seprasa soluble con un peso molecular de 330 kDa. Bajo determinadas condiciones dicho complejo puede formar un doble complejo con un peso molecular de 660 kDa.

Con respecto a los perfiles de los marcadores y con el fin de coEENguir un diagnóstico mejorado del cáncer de pulmón, se ha publicado un método (Schneider J. *et al.*, Int. J. Clin. Oncol. 7:145-151, 2002) utilizando algoritmos de clasificación basados en lógica difusa para combinar los niveles séricos de CYFRA 21-1, de la EEN y de la proteína C-reactiva (CRP), la cual es un marcador general de inflamación. Los autores informan de una sensibilidad de 92% a una especificidad del 95%. Sin embargo, en dicho estudio, se informa de que la sensibilidad de CYFRA 21-1 como marcador tumoral único es del 72% a una especificidad del 95%, lo que es significativamente superior al valor proporcionado en muchos otros estudios informados. Duffy M.J., en: Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38:225-262, 2001, informa de una sensibilidad de entre 46% y 61%. Dicho inesperadamente alto rendimiento coEENguido por Schneider *et al.* plantea algunas dudas y podría deberse a varios hechos. En primer lugar, el colectivo de pacientes de control aparentemente es más joven que el colectivo de pacientes, es decir, los grupos no han sido correctamente emparejados por edades, y el colectivo de pacientes comprende muchos estadios tardíos. En segundo lugar, y un punto todavía más crítico, el rendimiento del algoritmo se comprueba sobre las muestras del conjunto de entrenamiento que se utilizaron para la determinación de los calificadores de lógica difusa. Por lo tanto, dichos calificadores se "adaptan", en sentido estricto, a dicho conjunto y no se aplican a un conjunto independiente, de validación. En condiciones normales, debe esperarse que el mismo algoritmo aplicado a un conjunto de validación independiente de mayor tamaño y bien balanceado conduzca un rendimiento global significativamente menor.

El objetivo de la presente invención es la identificación de un marcador bioquímico que pueda utilizarse en la evaluación de la enfermedad del cáncer. En particular, los inventores de la presente invención han investigado para identificar un marcador bioquímico para la evaluación de diferentes tipos de cáncer, tales como el cáncer de pulmón, mama, colon, próstata y riñón en líquidos corporales. En un aspecto muy preferente de la presente invención se ha investigado la identificación de un marcador bioquímico para la evaluación del cáncer de pulmón (CP).

Inesperadamente se ha encontrado que la utilización de la proteína secernina-1 (=SCRN1) puede superar por lo menos parcialmente algunos de los problemas de los marcadores conocidos actualmente del estado de la técnica.

Inesperadamente se ha encontrado que una concentración incrementada de SCRN1 en la muestra de ensayo se asocia a la incidencia de cáncer. Ha podido demostrarse que SCRN1 es un marcador que no es específico para un

único tipo de cáncer, sino un marcador de diferentes tipos de cáncer, es decir, un marcador tumoral general. Debido a que SCRN1 aparentemente es específico de procesos tumorigénicos, el nuevo marcador tumoral SCRN1 presenta un gran potencial de ser de utilidad clínica con diversas clases de tipos tumorales. Inesperadamente se ha encontrado en la presente invención que una determinación de la concentración de SCRN1 en una muestra de suero o plasma permite la evaluación del cáncer, por ejemplo de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón o próstata. Todavía más inesperadamente, se ha encontrado que una concentración incrementada de SCRN1 ó fragmentos del mismo en una muestra de suero o plasma en comparación con controles normales es indicativa del riesgo o incidencia de cáncer.

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de SCRN1 mediante un método de detección inmunológica y utilizar el resultado de la medición, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

Descripción resumida de la invención

En una realización, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en un muestra de suero o plasma la concentración de: a) la proteína secernina-1 (=SCRN1) y/o fragmentos de la misma, b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer, y c) utilizar el resultado de medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en el que una concentración incrementada de SCRN1 es indicativa de cáncer, y en el que dicho método es un inmunoensayo de tipo sándwich.

Además, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer *in vitro*, en el que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer y en la que la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se detecta en una muestra de suero o plasma.

Además, la presente invención se refiere a la utilización de una combinación de anticuerpos dirigidos contra la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer, en la que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer y en la que la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se detecta en una muestra de suero o plasma.

Además, la presente invención da a conocer la utilización de un panel de marcadores que comprende la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y opcionalmente otro u otros marcadores del cáncer en la evaluación del cáncer *in vitro*, en el que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer y en la que la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se detecta en una muestra de suero o plasma.

Ademas, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en un muestra de suero o plasma la concentración de: a) la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma, b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer, y c) utilizar el resultado de medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en el que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en la que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer, que comprende los reactivos requeridos para medir específicamente la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma, y opcionalmente los reactivos requeridos para medir específicamente otro u otros marcadores de cáncer.

Inesperadamente se ha encontrado que una concentración incrementada de SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la muestra de ensayo se asocia a la incidencia de cáncer. Ha podido demostrarse que SCRN1 es un marcador que no es específico para un único tipo de cáncer, sino un marcador de diferentes tipos de cáncer, es decir, un marcador tumoral general. Debido a que SCRN1 aparentemente es específico de procesos tumorigénicos, el nuevo marcador tumoral SCRN1 presenta un gran potencial de ser de utilidad clínica con diversas clases de tipos tumorales.

Descripción detallada de la invención

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en una muestra la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y utilizar los resultados de la medición, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en un muestra de suero o plasma la concentración de: a) la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma, b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer, y c) utilizar el resultado de medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en el que una concentración incrementada de SCRN1 es indicativa de cáncer, y en el que dicho método es un inmunoensayo de tipo sándwich.

El método de la presente invención resulta adecuado para la evaluación de muchos tipos diferentes de cáncer. Se han encontrado concentraciones incrementadas de proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma en comparación con los controles normales en, por ejemplo, tipos de cáncer específicos como el

cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cervix, riñón o próstata, respectivamente.

5 Según una realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer *in vitro*.

10 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar tipos de cáncer específicos, tales como el cáncer de pulmón (CP), de ovario (CO), de endometrio (CE), melanoma (MM), de mama (CM), de cabeza y cuello (CC/C), de vejiga (CV), pancreático (CPa), de colon (CCR), de cervix (CC), de riñón (CR) o de próstata (CPr) *in vitro*.

15 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de pulmón, colon, próstata, vejiga, ovario o mama *in vitro*.

Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de pulmón (CP) *in vitro*.

20 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de ovario (CO) *in vitro*.

25 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de endometrio (CE) *in vitro*.

30 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer melanoma (MM) *in vitro*.

35 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de mama (CM) *in vitro*.

Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de cabeza y cuello (CC/C) *in vitro*.

40 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de vejiga (CV) *in vitro*.

45 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer pancreático (CPa) *in vitro*.

50 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer colorrectal (CCR) *in vitro*.

55 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de cervix (CV) *in vitro*.

Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de riñón (CR) *in vitro*.

60 Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o plasma con el fin de evaluar el cáncer, tal como el cáncer de próstata (CPr) *in vitro*.

65 Una realización de la presente invención se refiere al cribado en masa de una población con el fin de distinguir entre individuos que probablemente no presentan cáncer y los individuos que podrían clasificarse como casos

"sospechosos". A continuación el último grupo de individuos podría someterse a procedimientos diagnósticos adicionales, por ejemplo mediante métodos de obtención de imágenes u otros medios adecuados.

5 Una realización adicional de la presente invención se refiere a una mejora de los paneles de marcadores tumorales que resultan adecuados para el diagnóstico del cáncer en general o de los paneles de marcadores tumorales que resultan adecuados para el diagnóstico de un tipo tumoral específico, por ejemplo el cáncer de pulmón.

10 La presente invención se refiere además a un método para evaluar el cáncer *in vitro* con marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y otro u otros marcadores específicos de cáncer, y utilizar los resultados de medición, particularmente las concentraciones, en la evaluación del cáncer. Por otra parte, los marcadores preferentes para la utilización en combinación con SCRN1 son marcadores que son marcadores tumorales generales (es decir, marcadores que no son específicos de un único tipo tumoral) o, por otra parte, marcadores tumorales específicos (marcadores que son específicos de un único tipo tumoral). Los marcadores preferentes, por ejemplo para la evaluación del cáncer, tal como el cáncer de pulmón o el cáncer de colon, son Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y complejo soluble de DPPIV/seprasa (=DPPIV/seprasa). Cada uno de estos marcadores puede utilizarse individualmente o en cualquier combinación conjuntamente con SCRN1.

20 La presente invención se refiere además a un método para evaluar el cáncer *in vitro*, tal como el cáncer de pulmón o el cáncer de colon, con marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de DPPIV/seprasa y otro u otros marcadores del cáncer, por ejemplo otro u otros marcadores de cáncer de pulmón o colon y utilizar los resultados de medición, particularmente las concentraciones, en la evaluación del cáncer. Resulta preferente que otro u otros marcadores se seleccione de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa.

25 La presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos el marcador SCRN1 y por lo menos otro u otros marcadores tumorales, seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, en la evaluación del cáncer, por ejemplo del CP.

30 Preferentemente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro*, tal como el cáncer de pulmón o el cáncer de colon, con marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de SCRN1 y/o fragmentos del mismo y otro u otros marcadores del cáncer, por ejemplo otro u otros marcadores de cáncer de pulmón o colon y utilizar los resultados de medición, particularmente las concentraciones, en la evaluación del cáncer. Resulta preferente que otro u otros marcadores se seleccione de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa.

35 La presente invención se refiere además a la utilización de proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer, en la que una concentración incrementada de SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer.

La presente invención se refiere además a la utilización de proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer *in vitro*, en el que la muestra es de suero o plasma.

45 La presente invención se refiere además a la utilización de SCRN1 en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, particularmente cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cervix, riñón o próstata.

50 La presente invención se refiere además a la utilización de SCRN1 en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, particularmente cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas o colon.

55 La presente invención se refiere además a la utilización de SCRN1 en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, particularmente cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama o cabeza y cuello.

La presente invención se refiere además a la utilización de un anticuerpo dirigido contra la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer, en la que una concentración incrementada de SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer.

60 Preferentemente, SCRN1 se detecta en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich (=inmunoensayo tipo sándwich).

65 La presente invención proporciona además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos necesarios para medir específicamente la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y otro u otros marcadores del cáncer.

La presente invención proporciona además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y opcionalmente uno o más marcadores del cáncer, por ejemplo marcadores de cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón o próstata, tal como se ha indicado anteriormente, en el que cada uno de los demás marcadores pueden utilizarse individualmente o en cualquier combinación de los mismos.

La presente invención proporciona además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención que comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente SCRN1 y otro u otros marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición.

La presente invención proporciona además una matriz biochip para llevar a cabo el método según la presente invención para medir específicamente SCRN1 y otro u otros marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición. La presente invención proporciona además una matriz biochip para llevar a cabo el método según la presente invención para medir específicamente SCRN1 y otro u otros marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa en la evaluación del cáncer.

La presente invención proporciona además una matriz biochip para llevar a cabo el método según la presente invención para medir específicamente SCRN1 y otro u otros marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición en la evaluación del cáncer.

El término "medición" preferentemente comprende una medición cualitativa, semicualitativa o cuantitativa de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en una muestra. En una realización preferente, la medición es semicuantitativa, es decir, se determina si la concentración de una proteína de SCRN1 es superior o inferior a un valor de corte. Tal como apreciará el experto en la materia, en un ensayo de Sí (presencia) o No (ausencia), la sensibilidad del ensayo habitualmente se establece en el valor de corte. Puede determinarse un valor de corte, por ejemplo, a partir del ensayo de un grupo de individuos sanos. Preferentemente, el valor de corte se establece de manera que resulte en una especificidad del 90%; también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una especificidad del 95%, o también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una especificidad del 98%. Un valor superior al valor de corte puede ser, por ejemplo, indicativo de la presencia de cáncer. En particular, un valor superior al valor de corte puede ser indicativo, por ejemplo, de la presencia de cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cérvix, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conducto biliar. En una realización preferente adicional, la medición de SCRN1 es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales, se correlaciona la concentración de SCRN1 con una pregunta diagnóstica subyacente, tal como, por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

En otra realización preferente, el valor de corte se establece de manera que resulte en una sensibilidad del 90%; también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una sensibilidad del 95%, o también resulta preferente establecer el valor de corte para resultar en una sensibilidad del 98%.

Un valor inferior al valor de corte puede ser, por ejemplo, indicativo de la ausencia de cáncer. En particular, un valor inferior al valor de corte puede ser indicativo, por ejemplo, de la presencia de cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cérvix, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conducto biliar.

En una realización preferente adicional, la medición de SCRN1 es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales, se correlaciona la concentración de SCRN1 con una pregunta diagnóstica subyacente, tal como, por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

La proteína secernina-1 (=SCRN1), Swiss-PROT ID: Q12765 es una proteína citosólica de 414 aminoácidos con un peso molecular de 46,4 kDa caracterizada por la secuencia proporcionada en SEC ID nº 1 (fig. 14). La secuencia codificante de SCRN1 fue predicha en 1996 por Nagase T. *et al.* a partir del análisis de clones de ADNc derivados de médula ósea (Nagase T. *et al.*, DNA Res. 3:17-24, 1996). Más recientemente, el gen respectivo se ha localizado en el cromosoma 7 y se ha clarificado la estructura génica (Hillier L.N. *et al.*, Nature 424:157-164, 2003). Aunque el gen ya ha sido bien caracterizado, sólo se entienden parcialmente el papel y función biológicos de SCRN1. Regula la secreción de los mastocitos e incrementa la sensibilidad de las células a la estimulación con calcio (Way G. *et al.*, Mol. Biol. Cell 13:3344-3354, 2002). También se ha detectado SCRN1 en plaquetas mediante métodos de proteómica aunque sin definir una función de la proteína (O'Neill E.E. *et al.*, Proteomics 2:288-305, 2002). En publicaciones recientes se ha asociado el nivel de expresión de ARN al cáncer gástrico (Yamashita S. *et al.*, Cancer

Sci. 97:64-71, 2006; Suda T. *et al.*, Cancer Sci. 97:411-419, 2006). También se encontró una expresión incrementada en el esófago e Barrett, una condición premaligna, al aislar las células mediante microdissección por captura láser y el ADNc generado posteriormente se analizó utilizando micromatrices Affymetrix (Sabo E. *et al.*, Clin. Cancer Res. 14:6440-6448, 2008). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha presentado una confirmación al nivel de las proteínas. El documento n° US2007/0077556 (Nelson *et al.*) da a conocer un método para diagnosticar en cáncer en una muestra de un sujeto utilizando antígenos polipeptídicos asociados a tumor contra ZFP161, ubiquilina-1, HOX-B6, YB-1, osteonectina o ILF3. Hasta el momento la detección de la proteína SCR1 en líquidos corporales como marcador diagnóstico del cáncer no ha sido descrita en la literatura.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado respectivamente en la presente sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un marcador" se refiere a un marcador o a más de un marcador. El término "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente puede encontrarse presente uno o más objetos adicionales. A título de ejemplo, un panel de marcadores que comprenda por lo menos (los marcadores) SCR1 y CYFRA 21-1 opcionalmente puede comprender otro u otros marcadores.

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

Los términos "chip", "biochip", "chip de polímero" o "chip de proteína" se utilizan intercambiamente y se refieren a una colección de un gran número de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos dispuestos sobre un sustrato compartido que podría ser una parte de una oblea de silicio, una tira de nilón, una tira de plástico o un portaobjetos de vidrio.

Una "matriz", "macromatriz" o "micromatriz" es una colección deliberadamente creada de sustancias, tales como moléculas, marcadores, aberturas, microbobinas, detectores y/o sensores, unidos o fabricados en un sustrato o superficie sólida, tal como vidrio, plástico, chip de silicio u otro material que forma una matriz. Las matrices pueden utilizarse para medir los niveles de gran número, por ejemplo decenas, miles o millones, de reacciones o combinaciones simultáneamente. Una matriz puede contener además un número reducido de sustancias, por ejemplo una, unas cuantas o una docena. Las sustancias en la matriz pueden ser idénticas o diferentes. La matriz puede adoptar una diversidad de formatos, por ejemplo bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de moléculas inmovilizadas, bibliotecas de anticuerpos inmovilizados, bibliotecas de compuestos anclados en perlas de resina, chips de sílice u otros soportes sólidos. La matriz puede ser una macromatriz o una micromatriz, según el tamaño de las almohadillas en la matriz. Una macromatriz generalmente contiene tamaños de almohadilla de aproximadamente 300 micrómetros o mayores y puede obtenerse una imagen fácilmente mediante escáners de gel y de filtro. Una micromatriz generalmente contendría tamaños de almohadilla inferiores a 300 micrómetros.

Un "soporte sólido" es material polimérico insoluble funcionalizado al que pueden engancharse o unirse covalentemente elementos de biblioteca o reactivos (con frecuencia mediante un conector) para inmovilizarse o dejar que se separen fácilmente (mediante filtración, centrifugación, lavado, etc.) de los reactivos en exceso, productos secundarios de reacción solubles, o solventes.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula que debe utilizarse como diana para el análisis de una muestra de ensayo de un paciente. Son ejemplos de dichas dianas moleculares las proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contempla que incluyan variantes naturales de dichas proteínas, así como fragmentos de dichas proteínas o de dichas variantes, en particular fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables preferentemente comprenden por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. El experto en la materia reconocerá que las proteínas liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo durante la inflamación, y que podrían resultar degradadas o cortadas formando dichos fragmentos. Determinados marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que puede ser activada posteriormente mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, también pueden encontrarse presentes proteínas o fragmentos de las mismas como parte de un complejo. Dicho complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador se encuentran codificadas por el mismo gen, aunque pueden diferir en su punto isoelectrico (=PI) o peso molecular (=PM), o en ambos, por ejemplo como resultado del procesamiento alternativo de ARNm o de pre-ARNm. La secuencia de aminoácidos de una variante es 95% o más idéntica a la secuencia marcadora correspondiente. Además, o alternativamente, un polipéptido marcador o una variante del mismo puede portar una modificación post-traduccional. Son ejemplos no limitativos de modificaciones post-traduccionales, la glucosilación, la acilación y/o la fosforilación.

Las proteínas SCR1, en particular las formas solubles de las proteínas SCR1 y/o fragmentos de las mismas, se detectan en muestras apropiadas. Son muestras preferentes, las muestras de tejido, los lisados de tejido o los líquidos corporales, tales como sangre, plasma, suero, orina, lavado bronquialveolar (=LBA, preferente en el caso de

sospecha de CP) o líquido de revestimiento epitelial (=LRE, preferente en el caso de sospecha de CP). Preferentemente, la muestra se deriva de un sujeto humano, por ejemplo un paciente de tumor o una persona en riesgo de sufrir un tumor o una persona que se sospecha que presenta un tumor. También preferentemente, se detecta SCR_{N1} en una muestra de suero o plasma.

5 En una realización preferente según la presente invención, se determina la concentración de proteína SCR_{N1} y/o fragmentos de la misma. En una realización, el marcador SCR_{N1} se mide específicamente a partir de una muestra de suero o plasma mediante la utilización de un agente de unión específico.

10 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor de SCR_{N1}, una lectina de unión a SCR_{N1} o un anticuerpo reactivo con SCR_{N1}. Un agente de unión específica presenta una afinidad de por lo menos 10^7 l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específica preferentemente presenta una afinidad de 10^8 l/mol, o también preferentemente, 10^9 l/mol, para su molécula diana.

15 El experto en la materia apreciará que el término "específico" se utiliza para indicar que otras moléculas biológicas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para SCR_{N1}. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula biológica diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es, como máximo, de sólo 10% o inferior, de sólo 5% o inferior, de sólo 2% o inferior o de sólo 1% o inferior de la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica preferente satisfará ambos criterios de mínimo anteriormente indicados, para la afinidad y para la especificidad.

20 Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo reactivo con SCR_{N1}. El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo policlonal, a un anticuerpo monoclonal, a fragmentos de unión a anticuerpo de dichos anticuerpos, a anticuerpos de una cadena, así como a constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

25 Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que satisfaga los criterios anteriormente indicados para un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo tal como se describen en Tijssen (Tijssen P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, la totalidad de la obra, especialmente las páginas 43 a 78). Además, el experto en la materia conoce perfectamente los métodos basados en inmunosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante dichos métodos puede mejorarse la calidad de los anticuerpos policlonales y por lo tanto su rendimiento en inmunoensayos (Tijssen P., supra, páginas 108 a 115).

30 Para obtener los resultados dados a conocer en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos policlonales cultivados en conejos. Sin embargo, claramente también pueden utilizarse anticuerpos policlonales procedentes de especies diferentes, por ejemplo ovejas o cabras, así como anticuerpos monoclonales. Debido a que pueden producirse anticuerpos monoclonales en cualquier cantidad necesaria que presenten propiedades constantes, representan herramientas ideales para desarrollar un ensayo para la utilización clínica rutinaria. La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales contra SCR_{N1} en un método según la presente invención representan todavía otras realizaciones preferentes.

35 Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones y procedimientos prácticos se resumen en manuales relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., Preparation of enzyme antibody or other enzyme-macromolecule conjugates, en: Practice and theory of enzyme immunoassays, páginas 221 a 278, Burdon R.H. y v. Knippenberg P.H. (editores), Elsevier, Amsterdam, 1990, y diversos volúmenes de Methods in Enzymology, Colowick, S.P., y Caplan, N.O. (editores), Academic Press), referidos a los métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

40 Tal como apreciará el experto en la materia ahora que SCR_{N1} ha sido identificado como marcador útil en la evaluación del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón, pueden utilizarse diversos procedimientos inmunodiagnósticos para coEENguir un resultado comparable a los resultados de la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden, entre otros, la utilización de péptidos sintéticos, los cuales representan un epítipo de SCR_{N1} para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con ADN, también conocida como vacunación de ADN.

45 Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específica para SCR_{N1} bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión-SCR_{N1}. Dichas condiciones no necesitan especificarse ya que el experto en la materia sin esfuerzo inventivo podrá identificar fácilmente dichas condiciones de incubación apropiadas. Se mide la cantidad de complejo de agente de unión-SCR_{N1} y se utiliza en la evaluación del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón. Tal como apreciará el experto en la materia, existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo de agente de unión específica-SCR_{N1}, la totalidad de los cuales se describe en libros de texto relevantes (ver, por ejemplo, Tijssen P., supra, o Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores), Immunoassay, Academic Press, Boston, 1996).

Preferentemente, SCRN1 se detecta en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich (=inmunoensayo tipo sándwich). En dicho inmunoensayo de tipo sándwich, se utiliza un primer agente de unión específica unido a un soporte sólido para capturar SCRN1 en una cara y se utiliza un segundo agente de unión específica, que se marca para que resulte directa o indirectamente detectable, en la otra cara. Los agentes de unión específicos utilizados en un formato de ensayo de tipo sándwich pueden ser una combinación de anticuerpos dirigidos específicamente contra SCRN1.

Un "marcador de cáncer" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que, combinado con el marcador SCRN1, añade información relevante en la evaluación de la enfermedad del cáncer en general o en la evaluación de determinados tipos de cáncer, por ejemplo en la evaluación de CP, PRO, CV, CO, CS o CCR. La información se considera relevante o de valor aditivo en el caso de que, a una especificidad dada, la sensibilidad, o la especificidad a una sensibilidad dada, respectivamente, en la evaluación del CP, pueda mejorarse mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador SCRN1. En la realización preferente de la evaluación del cáncer, la mejora de la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de $p=0,05$, $0,02$, $0,01$ ó inferior. Preferentemente, el otro u otros marcadores tumorales se seleccionan de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa.

El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de la evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra, o muestra procedente de un paciente, preferentemente puede comprender cualquier líquido corporal. Son muestras preferentes las muestras de tejido, los lisados de tejido o los líquidos corporales, tales como sangre completa, suero, plasma, orina, lavado bronquialveolar (=LBA, preferente en el caso de sospecha de CP) o líquido de revestimiento epitelial (=LRE, preferente en el caso de sospecha de CP).

La expresión "muestra de tejido" y/o "sección de tejido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida de un paciente durante la cirugía, resecciones terapéuticas o una biopsia (por ejemplo biopsia por incisión, biopsia por excisión, biopsia de core o biopsia por aspiración con aguja) que implica la extracción de células o tejidos para el propósito de la evaluación *in vitro*. Al llevar a cabo un análisis según la presente invención, el material de muestra de tejido se utiliza directamente o como un "lisado de tejido". Una "muestra de tejido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere además a secciones delgadas de tejido obtenidas mediante la utilización de un micrótopo. En cualquier realización de método dado a conocer que incuya una muestra biológica, dicha muestra biológica puede montarse (aunque no necesariamente) sobre un portaobjetos de microscopía, es una sección de tejido (tal como una sección de tejido fijada en formalina e incluida en parafina) y/o es un tejido neoplásico (tal como, cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico o glioblastoma).

Un "lisado de tejidos", "lisado celular", "lisado", "muestra lisada", "extracto de tejidos" o "extracto celular" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra y/o material de muestra biológica que comprende tejido o células lisadas, es decir, en la que se ha alterado la integridad estructural del tejido o de las células. Para liberar el contenido de las células o de una muestra de tejido, el material habitualmente se trata con enzimas y/o con compuestos químicos para disolver, degradar o alterar las paredes celulares y membranas celulares de dichos tejidos o células. Al experto en la materia la resultarán totalmente familiares los métodos apropiados para obtener lisados. Este procedimiento se encuentra comprendido en el término "lisis".

La expresión "evaluación del cáncer" y en particular "evaluar cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cervix, riñón o próstata" se utiliza para indicar que el método según la presente invención (solo o combinado con otros marcadores o variables, por ejemplo los criterios establecidos por el UICC (ver anteriormente)), por ejemplo ayuda al médico a establecer o a confirmar la ausencia o presencia de cáncer, en particular de CP o CCR o ayuda al médico en el pronóstico, en la detección de la recurrencia (durante el seguimiento postquirúrgico de los pacientes) y/o en el seguimiento del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza *in vitro*. Posteriormente se descarta la muestra del paciente. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere nuevamente al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo sangre completa, suero o plasma.

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

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer, por ejemplo el CP, *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de SCRN1 y utilizar la concentración determinada en la evaluación del cáncer, por ejemplo CP.

- 5 En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el CP *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y utilizar la concentración determinada en la evaluación del CP.

10 Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido detectar una concentración incrementada del marcador SCRN1 en un porcentaje significativo de muestras de suero o plasma derivadas de pacientes con cáncer, en particular con cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón o próstata. Todavía más inesperado es que han podido demostrar que la concentración incrementada de SCRN1 en dicha muestra de suero o plasma obtenida de un individuo puede utilizarse en la evaluación del cáncer, en particular de las enfermedades de cáncer anteriormente indicadas.

15 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un suceso o un proceso individual causaría la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente en el caso de que la etiología de la enfermedad no se comprenda completamente, tal como es el caso para muchos tipos de cáncer, por ejemplo para el CP. Tal como apreciará el experto en la materia, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad de 100% y simultáneamente con una sensibilidad de 100% para una enfermedad multifactorial dada, por ejemplo el LC. Por el contrario, los marcadores bioquímicos, por ejemplo Cyfra 21-1, ACE, EEN, o tal como se muestra en la presente memoria, SCRN1, pueden utilizarse para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, la ausencia o la gravedad de una enfermedad. Por lo tanto, en el diagnóstico clínico rutinario, generalmente se consideran diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos conjuntamente en el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad subyacente.

20 Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o, en una realización preferente de la invención, pueden medirse simultáneamente utilizando un chip o una tecnología de matrices basada en perlas. Las concentraciones de los marcadores biológicos seguidamente se interpretan de modo independiente, por ejemplo utilizando un valor de corte individual para cada marcador, o se combinan para la interpretación.

25 En una realización preferente adicional, la evaluación del cáncer según la presente invención se lleva a cabo en un método que comprende medir en un muestra de suero o plasma la concentración de: a) la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma, b) otro u otros marcadores de cáncer, y c) utilizar el resultado de medición, por ejemplo la concentración determinada en las etapas (a) y (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer, en el que una concentración incrementada de SCRN1 es indicativa de cáncer, y en el que dicho método es un inmunoensayo de tipo sándwich.

30 En la evaluación del cáncer, el marcador SCRN1 resultará ventajoso en uno o más de los aspectos siguientes: cribado, ayuda diagnóstica, pronóstico, seguimiento de la terapia, tal como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

35 Cribado:

40 Se define "cribado" como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar individuos, por ejemplo individuos de riesgo, para indicadores de una enfermedad, por ejemplo la presencia de cáncer. Preferentemente, la población de cribado está compuesta de individuos que es conocido que presentan un riesgo superior al medio de sufrir cáncer. Por ejemplo, una población de cribado para cáncer de pulmón está compuesta de individuos que es conocido que presentan un riesgo mayor que el medio de presentar cáncer de pulmón, tales como fumadores, ex-fumadores y trabajadores expuestos a uranio, cuarzo o amianto.

45 En la realización preferente, se utiliza una muestra de tejido, lisado de tejido o cualquier líquido corporal, tal como sangre completa, plasma, suero, orina, lavado bronquialveolar (=LBA, preferente en el caso de sospecha de CP) o líquido de revestimiento epitelial (=LRE, preferente en el caso de sospecha de CP), como muestra en el cribado para cáncer, por ejemplo cáncer de pulmón.

50 Para muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico individual presente en la circulación podrá satisfacer los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para los fines de cribado. Lo anterior aparentemente también es cierto para el cáncer y en particular para el cáncer de pulmón. Debe esperarse que resultará necesario utilizar para el cribado del cáncer un panel de marcadores que comprenda una pluralidad de marcadores. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador SCRN1 formarán una parte integral de un panel de marcadores apropiados para los fines de cribado. Por lo tanto, la presente invención se refiere a la utilización de SCRN1 como un marcador de un panel de marcadores de cáncer, es decir, un panel de marcadores que comprende SCRN1 y uno o más marcadores adicionales con fines de cribado de cáncer. En particular, la presente invención se refiere a la utilización de SCRN1 como un marcador de un panel de marcadores general de cáncer. Dicho panel de marcadores

comprende el marcador SCRN1 y uno o más marcadores adicionales, por ejemplo marcadores generales de cáncer y/o marcadores para el tipo de cáncer anteriormente indicado.

5 Una combinación de marcadores mejora significativamente el valor del ensayo molecular. En primer lugar, se mejora significativamente la sensibilidad del ensayo utilizando un panel de marcadores. En segundo lugar, unos modelos estadísticos sofisticados permiten el análisis de curva ROC del ensayo multimarcador y los resultados confirman que la exactitud diagnóstica se encuentra significativamente incrementada en comparación con el mejor marcador individual.

10 También resulta probable que SCRN1 contribuya a paneles de marcadores para determinados tipos específicos de cáncer, por ejemplo cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón o próstata.

15 Otros tipos preferentes de cáncer que deben evaluarse con un panel de marcadores que comprende SCRN1 son el cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas o colon.

20 Otros tipos preferentes de cáncer que deben evaluarse con un panel de marcadores que comprende SCRN1 son el cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama o cabeza y cuello. Otros tipos preferentes de cáncer que deben evaluarse con un panel de marcadores que comprende SCRN1 son el cáncer de pulmón (CP) o el cáncer de colon (CCR).

Un tipo preferente de cáncer que debe evaluarse con un panel de marcadores que comprende es el cáncer de pulmón (CP).

25 Los presentes datos indican además que determinadas combinaciones de marcadores resultarán ventajosas en el cribado del cáncer.

30 Por ejemplo, en referencia a la realización preferente de cribado del cáncer, la presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende SCRN1 y por lo menos uno o más marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, SCC, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa.

Ayuda diagnóstica:

35 Los marcadores pueden ayudar en el diagnóstico diferencial de enfermedades benignas y malignas en un órgano particular, ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o a establecer valores de línea base de un marcador antes de una cirugía.

40 En la actualidad, son métodos importantes utilizados en la detección del cáncer de pulmón la radiología y/o los análisis de tomografía computerizada (TC). Pueden visualizarse nódulos pequeños, es decir, pequeñas regiones de tejido sospechoso, mediante dichos métodos. Sin embargo, muchos de dichos nódulos (más de 90% en la TC) representan cambios benignos de los tejidos, y sólo una minoría de los nódulos representan tejido canceroso. La utilización del marcador SCRN1 podría ayudar en la diferenciación de la enfermedad benigna y maligna.

45 En una realización preferente, se utiliza el marcador SCRN1 en un método inmunohistológico con el fin de establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de cáncer.

50 Debido a que SCRN1 como marcador único podría ser superior a otros marcadores, por ejemplo en el caso del CP, tales como ACE o EEN, debe esperarse que SCRN1 se utilice como ayuda diagnóstica, especialmente en el establecimiento de un valor de línea base previo a la cirugía. De esta manera, la presente invención también se refiere a la utilización de SCRN1 para establecer un valor de línea base antes de la cirugía para el cáncer.

Pronóstico:

55 Los indicadores pronósticos pueden definirse como características clínicas, patológicas o bioquímicas de los pacientes de cáncer y de sus tumores que predicen con una determinada probabilidad el resultado de una enfermedad. Su utilización principal es en la ayuda a la planificación racional del control de un paciente, es decir, para evitar el infratratamiento de una enfermedad agresiva o el sobretatamiento de una enfermedad indolente, respectivamente. Molina R. *et al.*, Tumor Biol. 24:209-218, 2003, han evaluado el valor pronóstico de ACE, CA 125, CYFRA 21-1, SSC y EEN en el CPCNP. En su estudio, unos niveles en suero anormales de los marcadores EEN, CEA y LDH (lactato deshidrogenasa) aparentemente indicaban un tiempo de supervivencia más corto.

65 Debido a que SCRN1 por sí solo contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes de cáncer, por ejemplo los pacientes de CP, respecto de los controles sanos, debe esperarse que ayudará en la evaluación del pronóstico de los pacientes que sufren de cáncer, preferentemente de CP. El nivel de SCRN1 preoperatorio muy

probablemente se combinará con otro u otros marcadores de cáncer y/o en el sistema de estadificación de TNM. En una realización preferente se utiliza SCR1 en el pronóstico de los pacientes con CP.

Seguimiento de la quimioterapia:

Merle P. *et al.*, Int. J. of Biological Markers 19:310-315, 2004, han evaluado las variaciones del nivel sérico de CYFRA 21-1 en pacientes con CPCNP localmente avanzado bajo tratamiento con quimioterapia de inducción. Concluyeron que el seguimiento temprano de los niveles séricos de CYFRA 21-1 podría ser una herramienta pronóstica útil para la respuesta tumoral y la supervivencia en pacientes de NCPCP de estadio III. Además, algunos informes han descrito la utilización de ACE en el seguimiento del tratamiento de pacientes con CP (Fukasawa T. *et al.*, Cancer & Chemotherapy 13:1862-1867, 1986). La mayoría de ellos han sido retrospectivos, no aleatorizados y contenían un número reducido de pacientes. Tal como en el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios de CEA sugieren: a) que los pacientes con una reducción de los niveles de CEA observada durante el tratamiento de quimioterapia generalmente presentaron un mejor resultado que los pacientes cuyos niveles de CEA no habían bajado, y (b) que prácticamente para todos los pacientes, el incremento del nivel de ACE se asoció a progresión de la enfermedad.

Se espera que SCR1 será un marcador por lo menos tan bueno para el seguimiento de la quimioterapia como CYFRA 21-1 ó ACE, respectivamente. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la utilización de SCR1 en el seguimiento de los pacientes de cáncer y preferentemente de cáncer de pulmón (CP) bajo terapia.

En el seguimiento de la terapia, en una realización preferente se combinarán las mediciones de SCR1 y por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, AnCE, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, y se utilizarán en la evaluación del cáncer de pulmón (CP).

Seguimiento:

Una gran parte de los pacientes de CP sometidos a resección quirúrgica destinada a la eliminación completa del tejido canceroso desarrollaron posteriormente una enfermedad recurrente o metastásica (Wagner H., Chest 117:110-118, 2000; Buccheri G. *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 75:973-980, 2003). La mayoría de dichas recaídas se produjeron en los primeros 2-3 años posteriores a la cirugía. Debido a que la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente fatal en el caso de que se detecte tarde, se ha dedicado un considerable esfuerzo de investigación a la recaída del cáncer en un estadio precoz y, de esta manera, potencialmente tratable.

En coEENcuencia, muchos pacientes de cáncer, por ejemplo de CP, se someten a un programa de vigilancia postoperatoria que frecuentemente incluye el seguimiento periódico del ACE. El seguimiento seriado del ACE un año después de la resección quirúrgica se ha demostrado que detecta una enfermedad recurrente/metastásica postoperatoria temprana con una sensibilidad de aproximadamente 29%, a una especificidad de aproximadamente 97%, incluso en ausencia de síntomas o signos sospechosos (Buccheri G. *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 75:973-980, 2003). De esta manera, el seguimiento de los pacientes con LC tras la cirugía es uno de los campos más importantes de utilización de un marcador bioquímico apropiado. Debido a la elevada sensibilidad de SCR1 en los pacientes de CP investigados, es probable que SCR1 solo o en combinación con otro u otros marcadores resultará de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes de CP, especialmente en el caso de pacientes de CP después de la cirugía. La utilización de un panel de marcadores que comprende SCR1 y otro u otros marcadores de CP en el seguimiento de los pacientes de CP representa una realización preferente adicional de la presente invención.

La presente invención en una realización preferente se refiere a la utilización de SCR1 en el campo del diagnóstico del cáncer. Preferentemente se utiliza SCR1 en la evaluación del cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón o próstata, respectivamente.

En todavía una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de SCR1 como molécula marcadora del cáncer, por ejemplo del cáncer en general o de tipos específicos de cáncer, tales como el cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón o próstata en combinación con una o más moléculas marcadoras adicionales del cáncer. Las moléculas marcadoras adicionales pueden ser moléculas marcadores generales inespecíficas de tipo cáncer y/o moléculas marcadores específicas de tipo cáncer, por ejemplo moléculas marcadoras del cáncer de pulmón. Se utiliza SCR1 y por lo menos un marcador adicional en la evaluación del cáncer, por ejemplo el cáncer de pulmón, en una muestra líquida obtenida de un individuo. Otros marcadores de cáncer seleccionados preferentes con los que puede combinarse la medición de SCR1 son Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, AnCE, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa. En particular, otros marcadores de CP seleccionados preferentes con los que puede combinarse la medición de SCR1 son CYFRA 21-1, ACE, CA 19-9, EEN, CA 125, PLProG y/o AnCE. Todavía más preferentemente, el panel de marcadores utilizado en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP, comprende SCR1 y por lo menos otra molécula marcadora seleccionada de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1 y ACE.

Tal como apreciará el experto en la materia, existen muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la respuesta a la cuestión diagnóstica investigada. En un enfoque bastante simple, aunque con frecuencia efectivo, se considera que el resultado es positivo si una muestra obtiene un resultado positivo en por lo menos uno de los marcadores investigados. Éste puede ser el caso, por ejemplo, al diagnosticar una enfermedad infecciosa, por ejemplo el SIDA.

Sin embargo, con frecuencia se evalúa la combinación de marcadores. Preferentemente, los valores medidos de los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo de SCRN1 y CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Pueden combinarse valores de marcadores mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Algunos métodos matemáticos bien conocidos de correlación de una combinación de marcadores con una enfermedad aplican métodos tales como el análisis discriminante (AD) (por ejemplo el AD lineal, cuadrático o regularizado), los métodos de núcleo (por ejemplo SVM), los métodos no paramétricos (por ejemplo los clasificadores del vecino k más próximo), PLS (es decir, los cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (por ejemplo la regresión lógica, CART, los métodos Random Forest y los métodos de boosting/bagging), los modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística), los métodos basados en los componentes principales (por ejemplo el SIMCA), los modelos aditivos generalizados, los métodos basados en lógica difusa, y los métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Resultará fácil para el experto en la materia seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo con la ausencia o presencia de CP se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático o regularizado), métodos de núcleo (es decir, MVS), métodos no paramétricos (por ejemplo clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (por ejemplo regresión lógica, CART, métodos Random Forest, métodos Boosting) o modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística). Pueden encontrarse detalles referentes a dichos métodos estadísticos en las referencias siguientes: Ruczinski I. et al, J. of Computational and Graphical Statistics, 12:475-511, 2003; Friedman J. H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989; Hastie T. *et al.*, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman L. *et al.*, Classification and regression trees, California: Wadsworth, 1984; Breiman L., Random Forests, Machine Learning, 45:5-32, 2001; Pepe M.S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, 2003; y Duda R. O. *et al.*, Pattern Classification, Wiley Interscience, 2a edición, 2001.

Es una realización preferente de la invención utilizar un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo pacientes enfermos de pacientes sanos. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que forman un panel de marcadores.

La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor a partir de sus características operativas del receptor (COR) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de COR es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados.

El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de un ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad benigna frente a maligna.

En cada caso, el gráfico de COR ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones a partir de un gráfico de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de positivos verdaderos + números de resultados de ensayo falsos negativos)]. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción falsa positiva, 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 por completo a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico de ROC representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de los resultados) presenta un gráfico de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, mientras que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentra entre ambos extremos (en el caso de que el gráfico de ROC se encuentre completamente debajo de la diagonal a 45°, se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad"

de "mayor que" a "menor que", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo.

5 Un modo preferente de cuantificar la exactitud diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. Dicho parámetro global se denomina, por ejemplo, "error total" o, alternativamente, "área bajo la curva = AUC". La medida global más común es el área bajo el gráfico de ROC. Convencionalmente este área en todos los casos es $\geq 0,5$ (en el caso de que no se cumpla esta condición, puede revertirse la regla de decisión para que sí se cumpla). Los valores comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin ninguna diferencia aparente entre las distribuciones de los dos grupos de valores de ensayo).
10 El área no sólo depende de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a una especificidad del 90%, sino del gráfico completo. Ésta es una expresión descriptiva cuantitativa de la proximidad del gráfico de ROC a un gráfico perfecto (área = 1,0).

15 La combinación de las mediciones de SCR1 con otros marcadores como CYFRA21-1 ó ACE, o con otros marcadores de CP todavía no identificados, conduce y conducirá, respectivamente, a mejoras adicionales en la evaluación del CP.

20 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para mejorar la exactitud diagnóstica del cáncer, por ejemplo el CP, frente a los controles sanos mediante la medición en una muestra de la concentración de por lo menos SCR1 y otro u otros marcadores tumorales seleccionados de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, AnCE, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, respetivamente, y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia del cáncer, por ejemplo el CP, resultando la mejora en que se clasifican correctamente más pacientes como pacientes con cáncer, por ejemplo CP, frente a los controles sanos en comparación con la clasificación basada en un único marcador cualquiera investigado solo.
25

30 En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a un método para mejorar la exactitud diagnóstica del cáncer, por ejemplo del CP, frente a los controles sanos mediante la medición en una muestra de la concentración de por lo menos SCR1 y CYFRA 21-1, y opcionalmente de ACE y/o EEN, respectivamente, y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo CP, resultando la mejora en la clasificación correcta de un mayor número de pacientes como sufriendo de cáncer, por ejemplo CP, frente a los controles sanos en comparación con la clasificación basada en un único marcador cualquiera investigado solo.

35 Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

40 Descripción de las figuras

Figura 1 Fig. 1 muestra un análisis de transferencia western de 20 lisados de tejido de cáncer pulmonar. se analizaron 15 mg de proteínas totales de lisados de tejido de cáncer (CA) y lisados de tejido de control emparejados, tal como se describe en el Ejemplo 3. M=marcador de peso molecular; T=lisado de tejido tumoral; N=lisado de tejido de control emparejado; rec ag=secernina-1 producida recombinantemente (=SCR1; las flechas indican la posición de la secernina-1 (=SCR1).
45

Figura 2 la fig. 2 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCR1 en muestras de CP con un ABC de 0,85 para la evaluación de 365 muestras obtenidas de pacientes con CP en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.
50

Figura 3 la fig. 3 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCR1 en muestras de CC/C con un ABC de 0,86 para la evaluación de 30 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de cabeza/cuello en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

55 Figura 4 la fig. 4 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCR1 en muestras de CE con un ABC de 0,84 para la evaluación de 23 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de endometrio en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 5 la fig. 5 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCR1 en muestras de CO con un ABC de 0,83 para la evaluación de 42 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de ovario en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.
60

Figura 6 la fig. 6 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCR1 en muestras de MM con un ABC de 0,82 para la evaluación de 16 muestras obtenidas de pacientes con melanoma maligno en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.
65

Figura 7 la fig. 7 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CM con un ABC de 0,77 para la evaluación de 47 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de mama en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

5 Figura 8 la fig. 8 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CC con un ABC de 0,74 para la evaluación de 20 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de cérvix en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 9 la fig. 9 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CPa con un ABC de 0,70 para la evaluación de 49 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de páncreas en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 10 la fig. 10 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CCR con un ABC de 0,67 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 11 la fig. 11 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CV con un ABC de 0,65 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de vejiga en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 12 la fig. 12 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CR con un ABC de 0,60 para la evaluación de 25 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de riñón en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 13 la fig. 13 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de SCRN1 en muestras de CPo con un ABC de 0,58 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de próstata en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos.

Figura 14 la fig. 14 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína SCRN1 humana; base de datos SwissProt, número de acceso: Q12765 (SEC ID nº 1).

Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína SCRN1 humana según la fig. 14; base de datos SwissProt, número de acceso: Q12765.

SEC ID nº 2 muestra la extensión del péptido sintetizado.

SEC ID nº 3 muestra el cebador directo sintetizado.

SEC ID nº 4 muestra el cebador inverso sintetizado.

Ejemplo 1

Identificación de SCRN1 como marcador potencial del cáncer de pulmón

Fuentes de tejido:

45 Con el fin de identificar proteínas específicas de tumor como marcadores diagnósticos potenciales del cáncer de pulmón, se llevó a cabo el análisis de dos tipos diferentes de tejido utilizando métodos proteómicos.

50 En total, se analizaron especímenes de tejido procedentes de un total de 20 pacientes que sufrían de cáncer de pulmón (CP). De cada paciente se recogieron dos tipos de tejido diferente mediante resecciones terapéuticas: tejido tumoral (>80% tumor) (T) y tejido sano contiguo (N). Éste último sirve como muestra de control sano emparejada. Los tejidos inmediatamente se sometieron a congelación instantánea tras la resección y se almacenaron a -80°C antes del procesamiento. Los tumores se diagnosticaron utilizando criterios histopatológicos.

55 Preparación del tejido:

60 Se cortaron 0,8 a 1,2 g de tejido congelado en trozos pequeños, se transfirieron al recipiente de molienda frío de un molino mezclador de bolas y se congelaron por completo con nitrógeno líquido. Se pulverizó el tejido en el molino de bolas, se disolvió en un volumen de 10 veces (p/v) de tampón de lisis (citrate de Na 40 mM, MgCl₂ 5 mM, Genapol X-080 al 1%, azida de Na al 0,02%, Complete[®] sin EDTA [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de cat. 1 873 580]) y posteriormente se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio Wheaton[®] (20 x poco ajustado, 20 x muy ajustado). El homogenado se sometió a centrifugación (10' a 5.000 x g), el sobrenadante se transfirió a otro vial y se sometió nuevamente a centrifugación (15' a 20.000 x g). El sobrenadante resultante contenía las proteínas solubles y se utilizó para el análisis posterior.

65 Enfoque isoeléctrico (EIE) y SDS-PAGE:

Para el EIE, se mezclaron 3 ml de la suspensión con 12 ml de tampón para muestras (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS al 2%, tampón IPG al 0,4%, pH 4-7, DTT al 0,5%) y se incubaron durante 1 h. Se concentraron las muestras en un dispositivo Amicon® Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y se determinó la concentración de proteína utilizando el ensayo de proteínas Bio-Rad® (n° de cat. 500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) siguiendo las instrucciones en el manual del proveedor. A un volumen correspondiente a 1,5 mg de proteína se añadió tampón para muestras hasta un volumen final de 350 ml. Esta solución se utilizó para rehidratar tiras de IPG, pH 4-7 (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) durante la noche. El EIE se llevó a cabo utilizando el protocolo de gradiente siguiente: 1.) 1 minuto a 500 V; 2.) 2 h a 3.500 V; 3.) 22 h a 3.500 V constantes, dando lugar a 82 kWh. Tras el EIE, las tiras se almacenaron a -80°C o se utilizaron directamente para el SDS-PAGE.

Antes del SDS-PAGE, las tiras se incubaron en tampón de equilibrado (urea 6 M, Tris/HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol al 30%, SDS al 2%), para la reducción se añadió DDT (15 min. + 50 mg de DTT/10 ml) y para la alquilación, IAA (15 min. + 235 mg de yodoacetamida/10 ml). Las tiras se aplicaron a geles de poliacrilamida al 12,5% y se sometieron a electroforesis a 1 W/gel durante 1 h y después a 17 W/gel. A continuación se fijaron los geles (metanol al 50%, acetato al 10%) y se tiñeron durante la noche con kit de tinción de azul coloidal Novex™ (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, n° de cat. LC6025, 45-7101).

Detección de SCRN1 como marcador potencial del cáncer de pulmón:

Cada pacientes se analizó separadamente mediante análisis de imágenes con el software ProteomeWeaver® (Definiens AG, Alemania, München). Además, todos los puntos del gel se recortaron con un robot de recolección y las proteínas presentes en los puntos se identificaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex™ Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente se compararon 3 geles de la muestra de tumor con 3 geles de tejido normal contiguo y se analizaron para puntos diferentes correspondientes a proteínas expresadas diferencialmente. Se identificó SCRN1 en las muestras de tumor de 16 pacientes y únicamente en 1 muestra de control. De esta manera se encontró que la proteína SCRN1 se expresaba específicamente o se sobreexpresaba fuertemente en tejido tumoral, respectivamente. Por lo tanto, se consideró marcador candidato para la utilización en el diagnóstico del cáncer de pulmón. Se identificaron los péptidos trípticos siguientes derivados de SCRN1:

Tabla 2: péptidos trípticos identificados mediante MALDI-TOF

péptido identificado	tramo de aminoácidos de SCRN1 (ver SEC ID n° 1)
DEVQEVVYFSAADHEPESK	33-51
VECTYISIDQVPR	52-64
EPAAEIEALLGMDLVR	99-114
DEAWVLETIGK	163-173
YWAAEKVTEGVR	174-185
DKASGVCIDSEFFLTTASGVSVLPQNR	260-286
ASGVCIDSEFFLTTASGVSVLPQNR	262-286
SSPCIHYFTGTPDPSR	287-302
SIFKPFIFVDDVK	303-315
FQEKPDR	337-343
AIIESDQEQGR	356-366

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos contra la proteína marcadora de cáncer SCRN1

Se generó anticuerpo policlonal contra la proteína APEX marcadora de cáncer pulmonar para la utilización posterior del anticuerpo en la medición de los niveles en suero, plasma y sangre de APEX mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo mediante transferencia western y ELISA.

Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*:

Con el fin de generar anticuerpos contra SCRN1, se produjo el antígeno recombinante en *E. coli*. Por lo tanto, se amplificó por PCR la región codificante de SCRN1 a partir del clon de ADNc de longitud completa obtenido del German Resource Center for Genome Research (RZPD, Berlín, Alemania) utilizando los cebadores siguientes: Cebador directo (SEC ID n° 3):

5'-acgtgaattcattaaagaggagaaattaactATGAGAGGATCGCATCACCAT
CACCATCACATTGAAGGCCGTGCTGCAGCTCCTCCAAGTTACTG-3'

(el sitio *EcoRI* se encuentra subrayado; los nucleótidos codificantes se muestran en mayúsculas).

Cebador inverso (SEC ID nº 4):

5' -acgtaagcttTCATTACTTAAAGAACTTAATCTCeGTG-3' (el sitio *HindIII* se encuentra subrayado; los nucleótidos codificantes se muestran en mayúsculas).

El cebador directo (aparte de los sitios *EcoRI* de clonación y de unión ribosómica) codifica una extensión peptídica N-terminal MRGSHHHHHHIEGR (mostrada en SEC ID nº 2) fusionada en el mismo marco de lectura en el extremo 5' del gen *SCRN1*. El fragmento de PCR digerido con *EcoRI/HindIII* se liga en el vector pQE80L (Qiagen, Hilden, Alemania). A continuación, se transforman células competentes *E. coli* XL1-blue con el plásmido generado. Tras el análisis de secuencias, las células competentes *E. coli* C600 se transforman con el plásmido generado para la expresión inducible con IPTG bajo el control del promotor de T5 de la serie de vectores pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-*SCRN1*, se peletizó mediante centrifugación 1 litro de un cultivo bacteriano inducido durante la noche y el pellet celular se resuspendió en tampón de lisis (fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, cloruro sódico (NaCl) 500 mM). Las células se fragmentaron en una prensa francesa con una presión de 1.500 bar. El material insoluble se peletizó mediante centrifugación (25.000 g, 15 min., 4°C) y el sobrenadante se hizo pasar por una columna de afinidad de metal de Ni-ácido nitriloacético (Ni-NTA). Tras la aplicación del antígeno, la columna se lavó con varios volúmenes de lecho de tampón de lavado (tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 20 mM). Finalmente, el antígeno unido se eluyó utilizando el tampón de lavado con un gradiente lineal de imidazol 20 mM-500 mM, las fracciones que contenían antígeno (7 ml cada una) se identificaron a DO_{280} en un detector de UV. Se agruparon las fracciones que contenían antígeno, se dializaron frente a tampón de almacenamiento (HEPES 75 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa al 6,5% (p/v)) y se almacenaron a 4°C o a -80°C, respectivamente.

Generación de inmunogenes de péptido para la inmunización:

Para generar anticuerpos policlonales específicos para *SCRN1*, se identificaron las secuencias de péptido que mostraban una homología significativa respecto a otras proteínas humanas conocidas. Se comparó la secuencia de aminoácidos de *SCRN1* con el banco de datos de proteínas humanas disponible en el Swiss Institute of Bioinformatics utilizando el software Blast. La secuencia de aminoácidos 398-413 no mostraba homologías significativas respecto a la secretina-2 (=SCRN2) u otras proteínas humanas y por lo tanto se seleccionó para generar anticuerpos específicos para *SCRN1*. Se sintetizó la secuencia respectiva y se conjugó químicamente con HLA (=hemocianina de lapa americana) con el fin de obtener un inmunógeno para la inmunización.

Generación de anticuerpos policlonales:

a) Inmunización

Para la inmunización, se preparó una emulsión fresca de la solución de proteína (100 mg/ml de proteína *SCRN1* ó 500 mg/ml de HLA acoplada con un péptido entre los aminoácidos 398 a 413 de *SCRN1*) y adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1. Se inmunizó cada conejo con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrajo sangre y el suero anti-*SCRN1* resultante se utilizó para experimentos adicionales tal como se describe en los Ejemplos 3 y 4.

b) Purificación de IgG (inmunoglobulina G) procedente de suero de conejo mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico

Se diluyó un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). Se ajustó el pH a 4,5 con base Tris 2 M. Se añadió gota a gota ácido caprílico (25 µl/ml de muestra diluida) bajo agitación vigorosa. Tras 30 minutos, la muestra se centrifugó (13.000 x g, 30 minutos, 4°C), se descartó el pellet y se recogió el sobrenadante. Se ajustó el pH del sobrenadante a 7,5 mediante la adición de base Tris 2 M y se filtró (0,2 µm).

Se precipitó la inmunoglobulina en el sobrenadante bajo agitación vigorosa mediante la adición gota a gota de una solución 4 M de sulfato amónico hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogieron mediante centrifugación (8.000 x g, 15 minutos, 4°C).

Se descartó el sobrenadante. Se disolvió el pellet en $NaH_2PO_4/NaOH$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializó exhaustivamente. Se centrifugó el dializado (13.000 x g, 15 minutos, 4°C) y se filtró (0,2 µm).

Biotinilación de IgG policlona de conejo:

Se llevó la IgG policlona de conejo a 10 mg/ml en NaH_2PO_4 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de biotín-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografió en Superdex 200 (NaH_2PO_4 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30

mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG biotinilada. Los anticuerpos monoclonales se biotinilaron siguiendo el mismo procedimiento.

Digoxigenilación de IgG policlona de conejo:

Se llevó la IgG policlona de conejo a 10 mg/ml en NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG, se añadieron 50 µl de N-hidroxisuccinimida-éster de ácido digoxigenín-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, n° de cat. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografió en Superdex[®] 200 (NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG digoxigenilada. Los anticuerpos monoclonales se marcaron con digoxigenina siguiendo el mismo procedimiento.

Ejemplo 3

Transferencia western para la detección de SCRN1 en tejido de cáncer de pulmón (CP) humano utilizando anticuerpo policlona tal como el generado en el Ejemplo 2

Se prepararon lisados de tejido procedente de muestras de tumor y de muestras de controles sanos tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, "Preparación de tejidos".

Se llevaron a cabo el SDS-PAGE y la transferencia western utilizando reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido sometida a ensayo, se diluyeron 15 µg de lisado de tejido en tampón SDS reductor para muestras NuPAGE[®] (Invitrogen) y se calentaron durante 10 minutos a 95°C. Las muestras se analizaron en geles de NuPAGE[®] al 4-12% (Tris-glicina) en el sistema tampón de migración MES. La mezcla de proteínas separada en gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando el módulo de transferencia Invitrogen XCell II[™] (Invitrogen) y el sistema tampón de transferencia NuPAGE[®]. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS/Tween-20 al 0,05% y se bloquearon con tampón de bloqueo Roti[®]-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 h. El anticuerpo primario, suero anti-SCRN1 policlona de conejo (se describe la generación 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/Tween-20 al 0,05%. El anticuerpo primario de conejo unido específicamente se marcó con un anticuerpo de oveja anti-IgG de conejo policlona conjugado con POD, diluido a 10 mU/ml en 0,5x tampón de bloqueo Roti[®]-Block. Tras la incubación durante 1 hora, las membranas se lavaron 6 veces en PBS/Tween-20 al 0,05%. Para la detección del anticuerpo anti-conejo conjugado con POD ligado, la membrana se incubó con el sustrato de transferencia western Lumi-Light^{PLUS} (n° de pedido 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expuso a una película autorradiográfica.

Se incrementó la intensidad de la señal de SCRN1 en 19 de 20 lisados de tejido tumoral obtenidos de 20 pacientes de CP diferentes (fig. 1). De esta manera, se confirmó claramente mediante los análisis de transferencia western la abundancia incrementada de SCRN1 en el tejido tumoral según la detección mediante MALDI en el Ejemplo 1.

Ejemplo 4

ELISA para la medición de SCRN1 en muestras humanas de suero y plasma o en otros líquidos corporales

Para la detección de SCRN1 en suero o plasma humano, se reveló un ELISA de tipo 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 de longitud completa de SCRN1 se conjugaron con digoxigenina.

Para la calibración del ensayo, se propagaron células LOXIMVI, una línea celular de melanoma humano incluida en las líneas celulares de tumor NCI60 del US National Cancer Institute, y se utilizó un lisado de las células para la calibración. Se fijó arbitrariamente una dilución 1:2.500 del lisado (concentración de proteína=7,7 mg/ml) en 1 U/ml. Se incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina, con 100 µl de anticuerpo policlona anti-SCRN1 biotinilado, aa 398-413, durante 60 min. a 10 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween-20 al 0,1%. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces con NaCl al 0,9%, Tween-20 al 0,1%. A continuación, los pocillos se incubaron durante la noche con una dilución en serie de la proteína recombinante (ver el Ejemplo 2) como antígeno estándar o con muestras de suero/plasma/LRE diluido procedentes de pacientes. Tras la unión de SCRN1, las placas se lavaron tres veces con NaCl al 0,9%, Tween-20 al 0,1%. Para la detección específica de SCRN1 unido, los pocillos se incubaron con 100 µl de anticuerpo policlona anti-SCRN1 digoxigenilado durante 60 min. a una concentración de 10 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween-20 al 0,1%. A continuación, las placas se lavaron tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En la siguiente etapa, los pocillos se incubaron con 50 mU/ml de conjugado anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1633716) durante 60 minutos en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween-20 al 0,1%. A continuación, las placas se lavaron tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 µl de solución de ABTS

(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la DO tras 30 a 60 minutos a 405 nm con un lector de ELISA.

Ejemplo 5

SCRN1 como marcador sérico de cáncer de pulmón (CP)

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

Tabla 3: población de estudio

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

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CP de la Tabla 3 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,85 (fig. 2).

Ejemplo 6

SCRNI como marcador sérico de cáncer de cabeza/cuello (CC/C)

Se utilizaron muestras derivadas de 30 pacientes de CC/C bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 4.

Tabla 4: población de estudio

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

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CC/C de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,86 (fig. 3).

Ejemplo 7

SCRNI como marcador sérico de cáncer de endometrio (CE)

Se utilizaron muestras derivadas de 23 pacientes de cáncer de endometrio bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 5.

Tabla 5: población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	12
UICC III	3
UICC IV	3
estadificación desconocida	5
donantes de sangre evidentemente sanos	50

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CE de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,84 (fig. 4).

Ejemplo 8

SCRN1 como marcador sérico de cáncer ovárico (CO)

Se utilizaron muestras derivadas de 42 pacientes de cáncer ovárico (CO) bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 6.

5

Tabla 6: población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	7
UICC III	14
UICC IV	9
estadificación desconocida	12
donantes de sangre evidentemente sanos	50

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CO de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,83 (fig. 5).

10

Ejemplo 9

SCRNI como marcador sérico de cáncer ovárico (CO)

15 Se utilizaron muestras derivadas de 16 pacientes de melanoma maligno bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 7.

Tabla 7: Población de estudio

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

20 Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de MM de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,82 (fig. 6).

Ejemplo 10

25 SCRNI como marcador sérico de cáncer de mama (CM)

Se utilizaron muestras derivadas de 47 pacientes de cáncer de mama bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 8.

30

Tabla 8: Población de estudio

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

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CM de la Tabla 5 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,77 (fig. 6).

35 **Ejemplo 11**

SCRNI como marcador sérico de cáncer de cérvix (CC)

40 Se utilizaron muestras derivadas de 20 pacientes de cáncer de cérvix bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 9.

Tabla 9: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
-----------------------	--------------------

UICC I/II	11
UICC III	7
UICC IV	2
estadificación desconocida	0
donantes de sangre evidentemente sanos	50

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CC de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,74 (fig. 8).

5 **Ejemplo 12**

SCRNI como marcador sérico de cáncer de páncreas (CPa)

10 Se utilizaron muestras derivadas de 49 pacientes de cáncer de páncreas bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 10.

Tabla 10: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	26
UICC III	5
UICC IV	15
estadificación desconocida	3
donantes de sangre evidentemente sanos	50

15 Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CPa de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,70 (fig. 9).

Ejemplo 13

20 SCRNI como marcador sérico de cáncer colorrectal (CCR)

Se utilizaron muestras derivadas de 50 pacientes de cáncer colorrectal bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 11.

Tabla 11: Población de estudio

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

25 Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CCR de la Tabla 4 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,67 (fig. 10).

Ejemplo 14

30 SCRNI como marcador sérico de cáncer de vejiga (CV)

Se utilizaron muestras derivadas de 50 pacientes de cáncer de vejiga bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 12.

35

Tabla 12: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC 0/I/II	42
UICC III	1
UICC IV	3
estadificación desconocida	4
donantes de sangre evidentemente sanos	50

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CPa de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,65 (fig. 11).

Ejemplo 15

SCRNI como marcador sérico de cáncer de riñón (CR)

Se utilizaron muestras derivadas de 25 pacientes de cáncer de riñón bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 13.

Tabla 13: Población de estudio de CR

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

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CR de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,60 (fig. 12).

Ejemplo 16

SCRNI como marcador sérico de cáncer de próstata (CPo)

Se utilizaron muestras derivadas de 50 pacientes de cáncer de próstata bien caracterizados con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 14.

Tabla 14: Población de estudio de CPo

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

Se evaluó el nivel de SCRNI en las muestras de CPo de la Tabla 6 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) con una ABC de 0,58 (fig. 13).

Ejemplo 17

SCRNI en micromuestreo broncoscópico de líquido de revestimiento epitelial (LRE)

El micromuestreo broncoscópico (MB) ofrece la posibilidad de recolectar líquido de revestimiento epitelial (LRE) próximo a pequeños nódulos pulmonares de una manera sustancialmente no invasiva. A continuación resulta posible medir concentraciones de marcadores tumorales en el LRE con el fin de identificar un nódulo maligno. Se obtiene una concentración de línea base específica del paciente del marcador tumoral respectivo mediante muestreo del LRE en el pulmón contralateral.

La sonda de MB (Olympus Medical Systems Corp. Tokyo, Japón, nº de cat. BC-402C) se inserta en los pulmones a través de un bronscopio y consiste de una vaina externa de polietileno y una sonda de algodón interna unida a una guía de acero inoxidable. Se hace avanzar la sonda interna hasta el área próxima al nódulo y se lleva a cabo el MB durante unos cuantos segundos. Seguidamente se retira la sonda interna hacia el interior de la vaina externa y se extraen ambos dispositivos simultáneamente. Se recorta la punta de algodón y se congela directamente a -80°C. Para la determinación, se eluye el LRE de la punta de algodón y posteriormente puede analizarse. Se determina la concentración de SCRNI en el LRE mediante ELISA tal como se indica en el Ejemplo 4.

SCRNI era detectable en el LRE de los pacientes con una masa pulmonar detectada mediante tomografía computerizada. Las abreviaturas utilizadas en la Tabla 15 son MP (=pulmón con masa pulmonar) y PC (=pulmón contralateral). En caso de disponer de un diagnóstico final relacionado con cáncer, se proporciona en la tabla.

Tabla 15: Detección de SCRNI en LRE

Paciente	Diagnóstico	SCRNI [U/ml]
ELF_1_PM	Carcinoma pulmonar de células pequeñas	5,89
ELF_1_CI		0,00
ELF_2_PM	Diagnóstico final desconocido	3,87
ELF_2_CI		0,83
ELF_3_PM	Carcinoma escamoso recidivante	0,13
ELF_3_CI		2,78
ELF_4_PM	Adenocarcinoma	4,08
ELF_4_CI		2,65
ELF_5_PM	Diagnóstico final desconocido	2,59
ELF_5_CI		1,78
ELF_6_PM	Masa pulmonar benigna	2,14
ELF_6_CI		2,01
ELF_7_PM	Diagnóstico final desconocido	0,21
ELF_7_CI		0,00
ELF_8_PM	Diagnóstico final desconocido	3,35
ELF_8_CI		0,73
ELF_9_PM	Diagnóstico final desconocido	1,87
ELF_9_CI		0,06
ELF_10_PM	Diagnóstico final desconocido	1,50
ELF_10_CI		0,00

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Secemina-1 como marcador de cáncer
- <130> 26148 WO
- 10 <150> EP09161524
- <151> 2009-05-29
- <160> 4
- 15 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 414
- 20 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 532 644 T3

Met Ala Ala Ala Pro Pro Ser Tyr Cys Phe Val Ala Phe Pro Pro Arg
1 5 10 15

Ala Lys Asp Gly Leu Val Val Phe Gly Lys Asn Ser Ala Arg Pro Arg
20 25 30

Asp Glu Val Gln Glu Val Val Tyr Phe Ser Ala Ala Asp His Glu Pro
35 40 45

Glu Ser Lys Val Glu Cys Thr Tyr Ile Ser Ile Asp Gln Val Pro Arg
50 55 60

Thr Tyr Ala Ile Met Ile Ser Arg Pro Ala Trp Leu Trp Gly Ala Glu
65 70 75 80

Met Gly Ala Asn Glu His Gly Val Cys Ile Ala Asn Glu Ala Ile Asn
85 90 95

Thr Arg Glu Pro Ala Ala Glu Ile Glu Ala Leu Leu Gly Met Asp Leu
100 105 110

Val Arg Leu Gly Leu Glu Arg Gly Glu Thr Ala Lys Glu Ala Leu Asp
115 120 125

Val Ile Val Ser Leu Leu Glu Glu His Gly Gln Gly Gly Asn Tyr Phe
130 135 140

ES 2 532 644 T3

Glu Asp Ala Asn Ser Cys His Ser Phe Gln Ser Ala Tyr Leu Ile Val
 145 150 155 160

Asp Arg Asp Glu Ala Trp Val Leu Glu Thr Ile Gly Lys Tyr Trp Ala
 165 170 175

Ala Glu Lys Val Thr Glu Gly Val Arg Cys Ile Cys Ser Gln Leu Ser
 180 185 190

Leu Thr Thr Lys Met Asp Ala Glu His Pro Glu Leu Arg Ser Tyr Ala
 195 200 205

Gln Ser Gln Gly Trp Trp Thr Gly Glu Gly Glu Phe Asn Phe Ser Glu
 210 215 220

Val Phe Ser Pro Val Glu Asp His Leu Asp Cys Gly Ala Gly Lys Asp
 225 230 235 240

Ser Leu Glu Lys Gln Glu Glu Ser Ile Thr Val Gln Thr Met Met Asn
 245 250 255

Thr Leu Arg Asp Lys Ala Ser Gly Val Cys Ile Asp Ser Glu Phe Phe
 260 265 270

Leu Thr Thr Ala Ser Gly Val Ser Val Leu Pro Gln Asn Arg Ser Ser
 275 280 285

Pro Cys Ile His Tyr Phe Thr Gly Thr Pro Asp Pro Ser Arg Ser Ile
 290 295 300

Phe Lys Pro Phe Ile Phe Val Asp Asp Val Lys Leu Val Pro Lys Thr
 305 310 315 320

Gln Ser Pro Cys Phe Gly Asp Asp Asp Pro Ala Lys Lys Glu Pro Arg
 325 330 335

Phe Gln Glu Lys Pro Asp Arg Arg His Glu Leu Tyr Lys Ala His Glu
 340 345 350

Trp Ala Arg Ala Ile Ile Glu Ser Asp Gln Glu Gln Gly Arg Lys Leu
 355 360 365

Arg Ser Thr Met Leu Glu Leu Glu Lys Gln Gly Leu Glu Ala Met Glu

ES 2 532 644 T3

370

375

380

Glu Ile Leu Thr Ser Ser Glu Pro Leu Asp Pro Ala Glu Val Gly Asp
 385 390 395 400

Leu Phe Tyr Asp Cys Val Asp Thr Glu Ile Lys Phe Phe Lys
 405 410

<210> 2
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Extensión peptídica sintetizada

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 96
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo sintetizado

<400> 3

acgtgaattc attaaagagg agaaattaac tatgagagga tcgcatcacc atcaccatca 60

5 cattgaaggc cgtgctgcag ctcctccaag ttactg 96

<210> 4
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Cebador inverso sintetizado

15

<400> 4
 acgtaagctt tcattactta aagaactta tctccgtg 38

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar el cáncer *in vitro*, que comprende medir en una muestra de suero o plasma la concentración de:
- 5 (a) proteína secernina-1 (=SCRN1) y/o fragmentos de la misma,
 (b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer, y
 (c) utilizar el resultado de la medición de la etapa (a), y opcionalmente de la etapa (b), en la evaluación del cáncer, en el que una concentración incrementada de proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es
 10 indicativa de cáncer,
 y en el que dicho método es un inmunoensayo de tipo sándwich.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que además el método está destinado a la evaluación de cánceres como el cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón y próstata.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que además otro u otros marcadores de la etapa (b) se seleccionan de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, AnCE, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que además la concentración se mide mediante un método inmunológico.
5. Utilización de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer *in vitro*, en el que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer y en la que la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se detecta en una muestra de suero o plasma.
- 25 6. Utilización según la reivindicación 5 en la evaluación de un cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste de cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón y próstata.
- 30 7. Utilización de un anticuerpo dirigido contra la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer *in vitro*, en la que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer y en la que la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se detecta en una muestra de suero o plasma.
- 35 8. Utilización de un panel de marcadores que comprende la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y opcionalmente otro u otros marcadores del cáncer en la evaluación del cáncer *in vitro*, en la que una concentración incrementada de la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma es indicativa de cáncer y en la que la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma se detecta en una muestra de suero o plasma.
- 40 9. Utilización del panel de marcadores según la reivindicación 8, caracterizado por que además el otro u otros marcadores opcionales se seleccionan de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, APE, PLProG, AnCE, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa.
- 45 10. Utilización del panel de marcadores según las reivindicaciones 8 y 9 en la evaluación de cáncer de pulmón, ovario, endometrio, melanoma, mama, cabeza y cuello, vejiga, páncreas, colon, cérvix, riñón y próstata.
- 50 11. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende los reactivos necesarios para medir específicamente la proteína SCRN1 y/o fragmentos de la misma y los reactivos requeridos para medir específicamente otro u otros marcadores de cáncer.
- 55 12. Matriz biochip para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para medir específicamente SCRN1 y otro u otros marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de Cyfra 21-1, ACE, EEN, CA 19-9, CA 125, AEP, PLProG, AnCE, NNMT, autoanticuerpos anti-p53, seprasa y DPPIV/seprasa, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo la medición.

Fig. 1

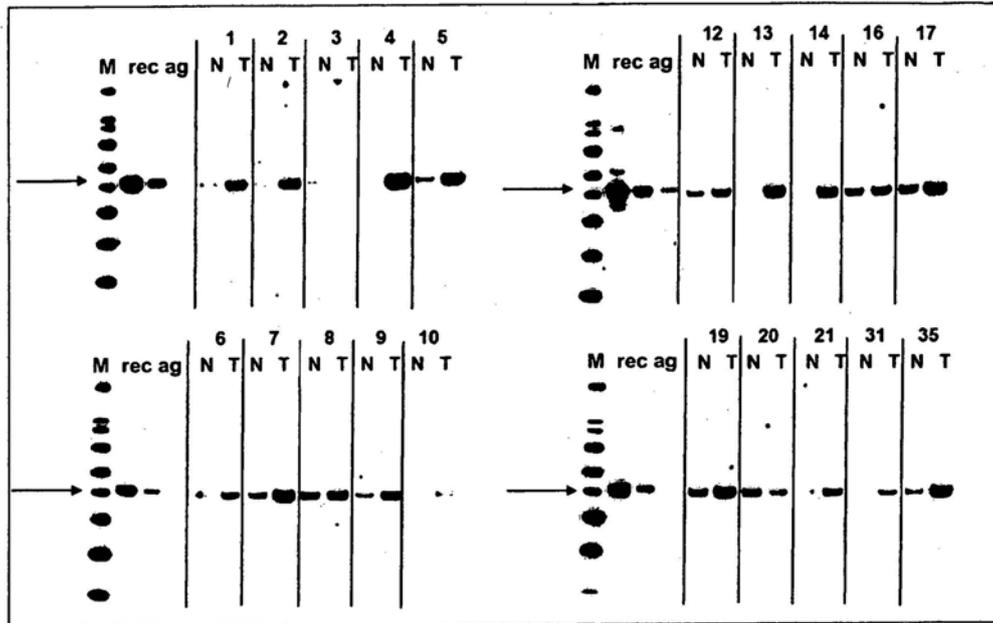


Fig. 2

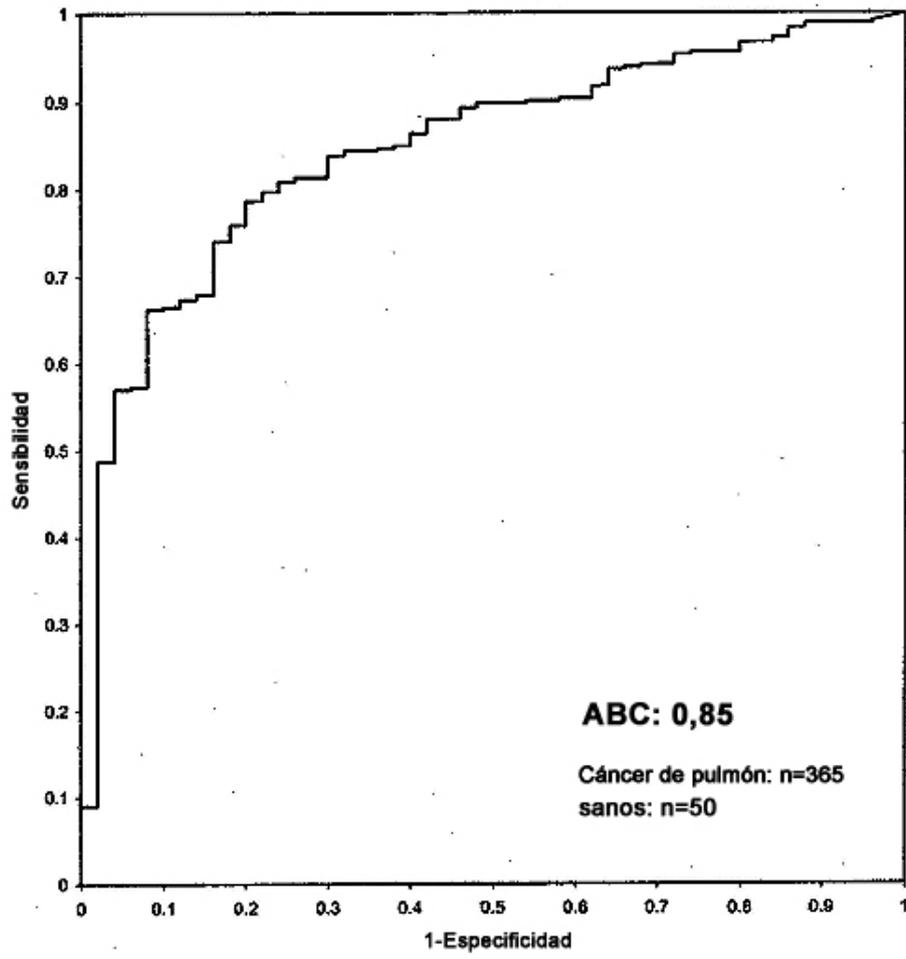


Fig. 3

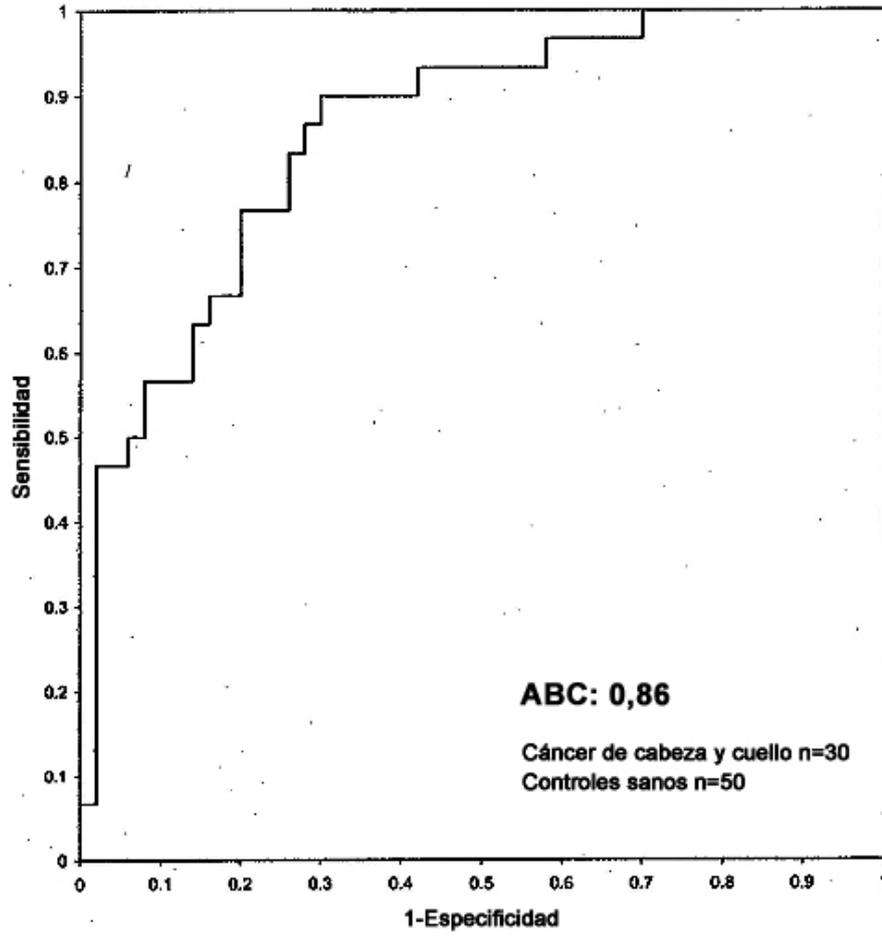


Fig. 4

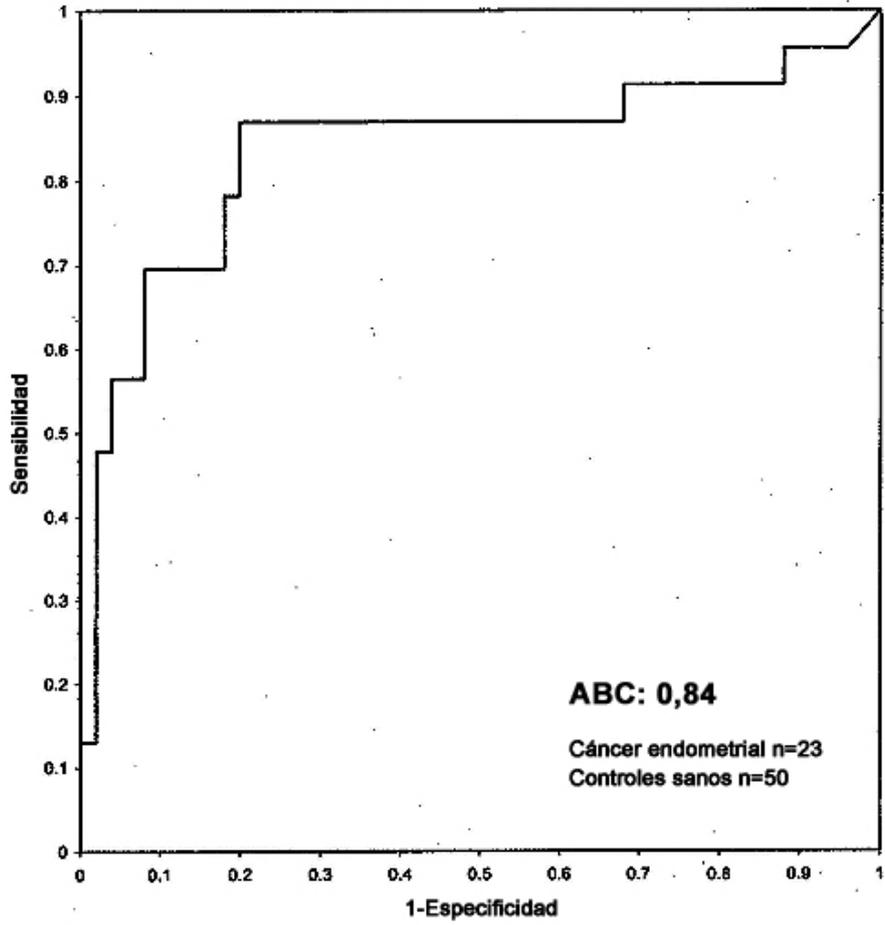


Fig. 5

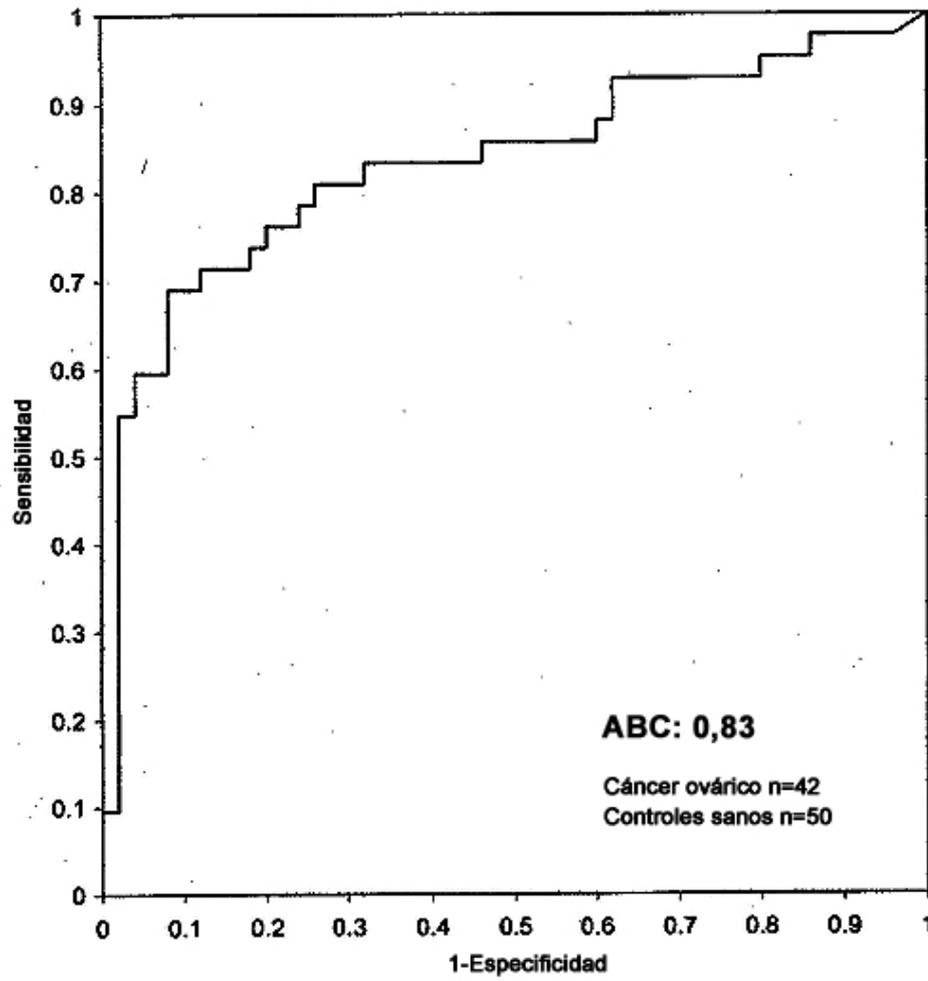


Fig. 6

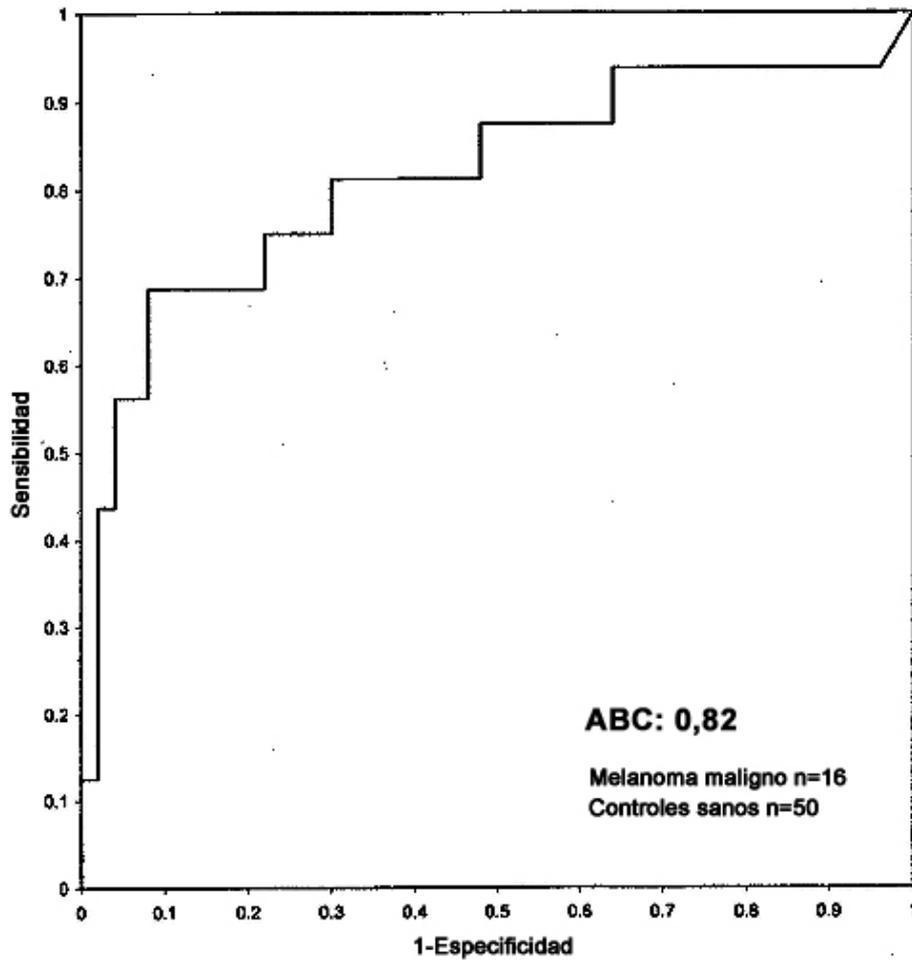


Fig. 7

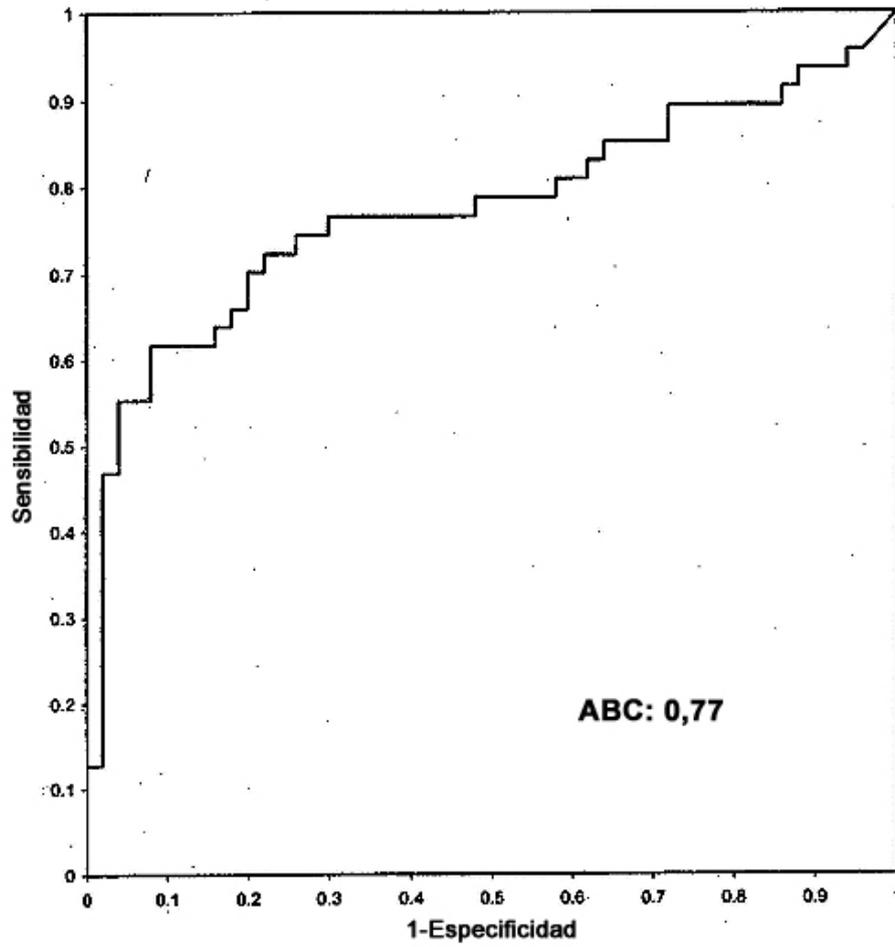


Fig. 8

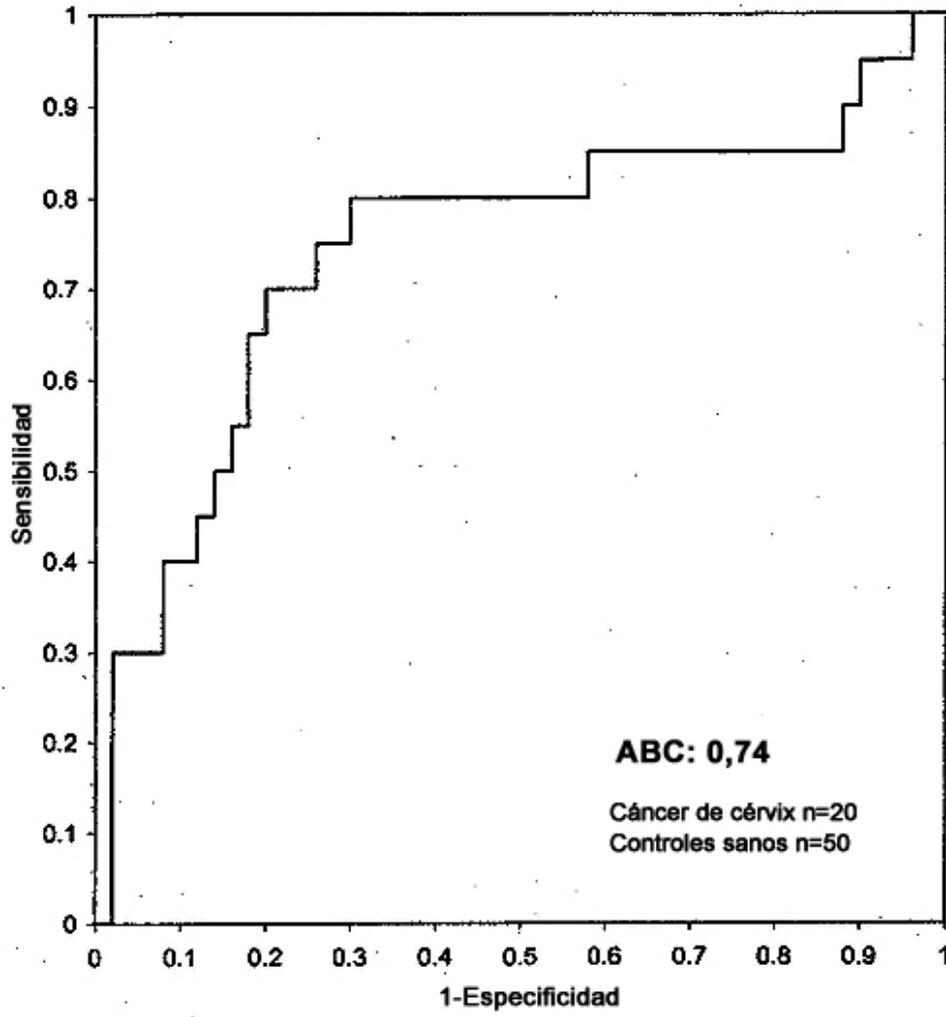


Fig. 9

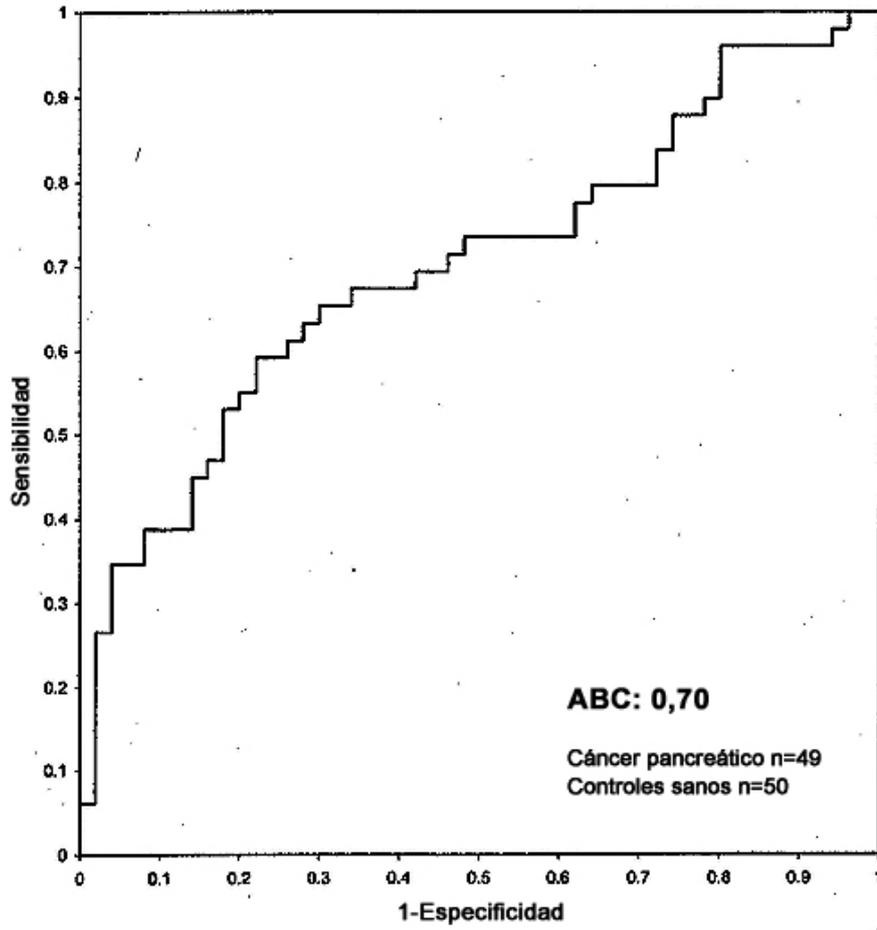


Fig. 10

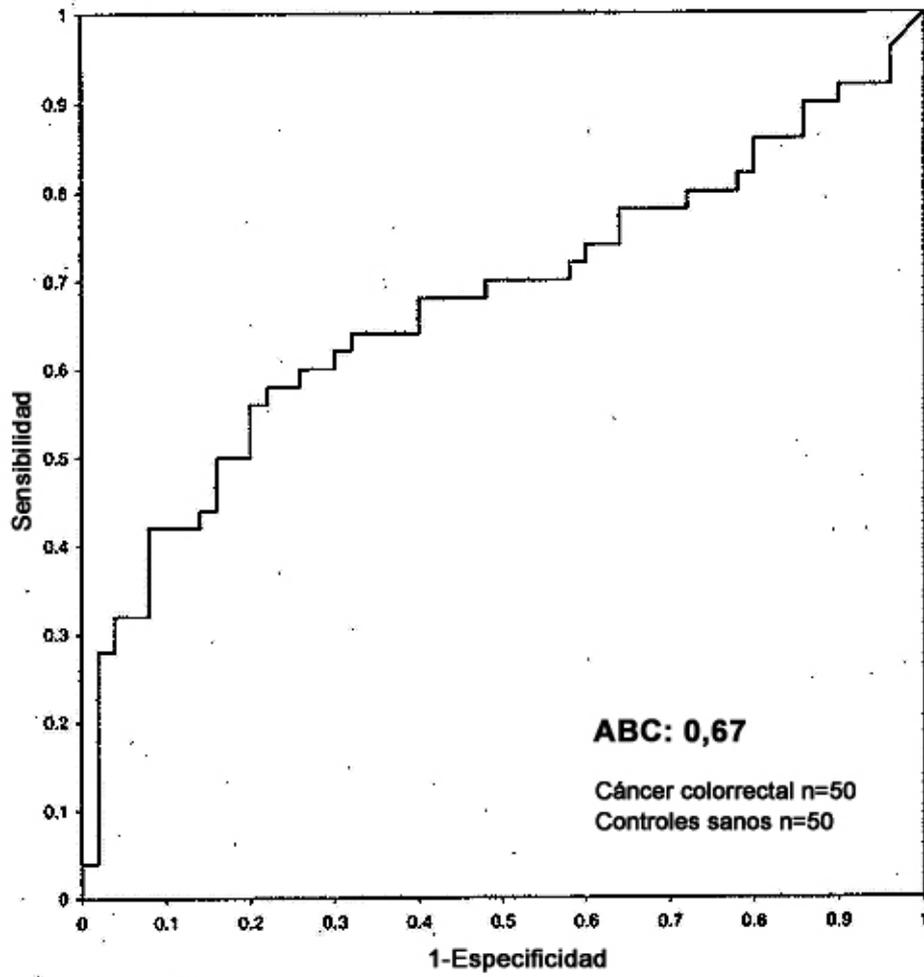


Fig. 11

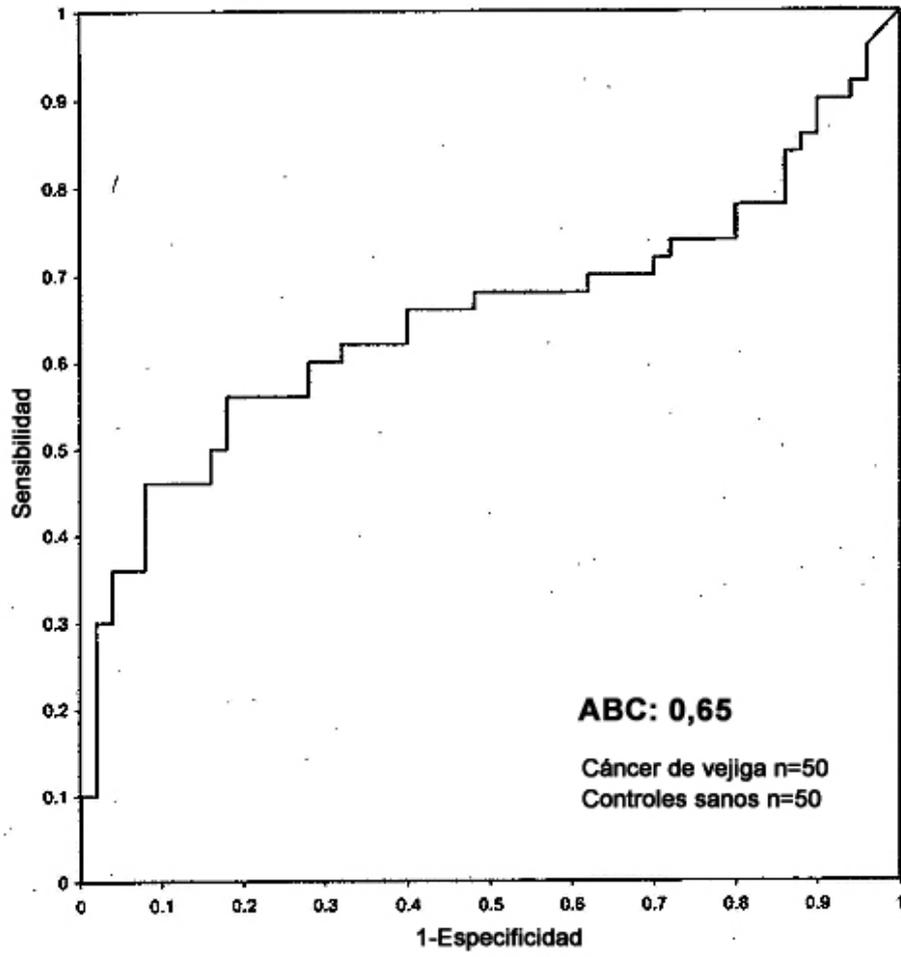


Fig. 12

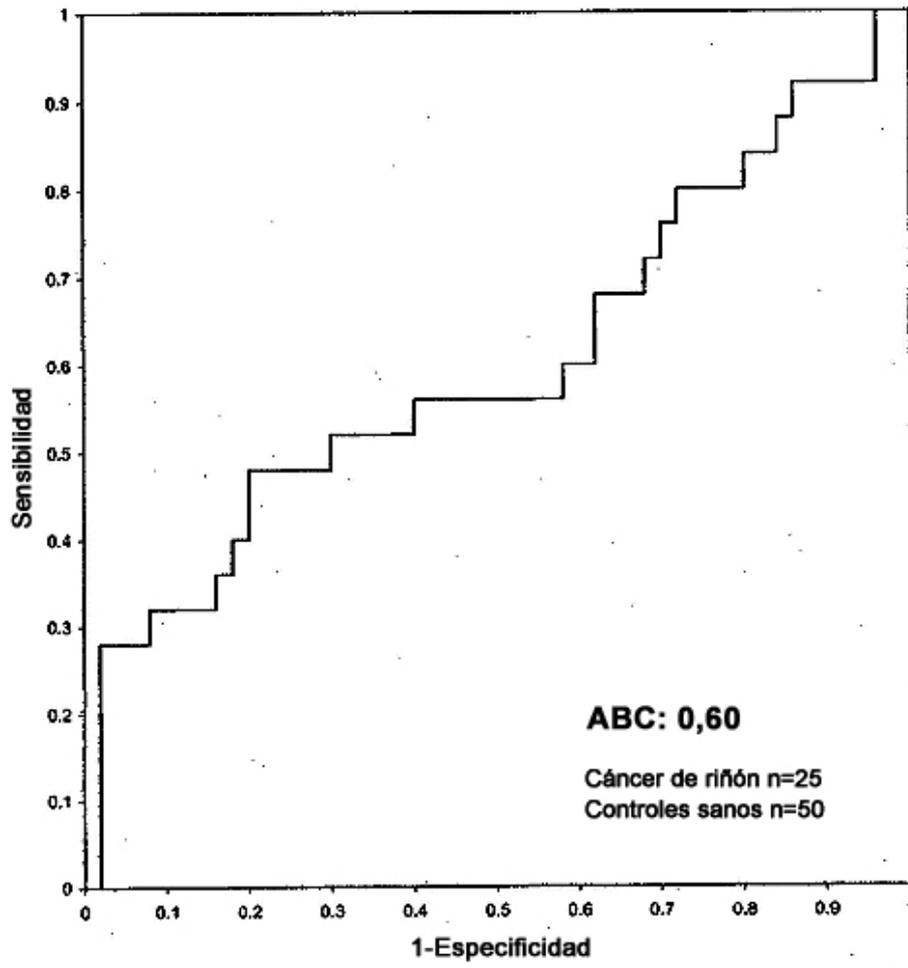


Fig. 13

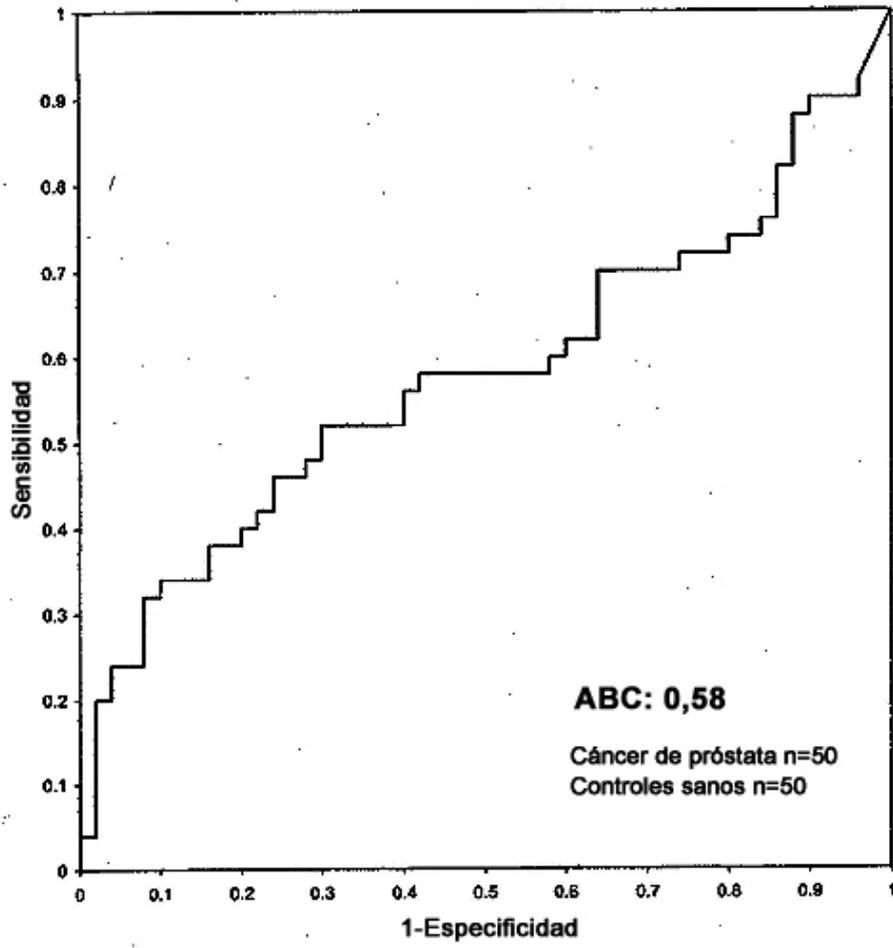


Fig. 14

1 MAAAPPSYCF VAFPPRAKDG LVVFGKNSAR PRDEVQEVVY FSAADHEPES
51 KVECTYISID QVPRTYAIMI SRPAWLWGAE MGANEHGVC I ANEAINTREP
101 AAEIEALLGM DLVRLGLERG ETAKEALDVI VSLLEE HQG GNYFEDANSC
151 HSFQSAYLIV DRDEAWVLET IGKYWAAEKV TEGVRCICSQ LSLTTKMDAE
201 HPELRSYAQS QGWWTGE GEF NFSEVFSPVE DHLDCGAGKD SLEKQESIT
251 VQTMNTLRD KASGVCIDSE FFLTTASGVS VLPQNRSSPC IHYFTGTPDP
301 SRSIFKPFIF VDDVKLVPKT QSPCFGDDDP AKKEPRFQEK PDRRHELYKA
351 HEWARAIIES DQEQRKLR S TMLELEKQGL EAMEEILTSS EPLDPAEVGD
401 LFYDCVDTEI KFFK