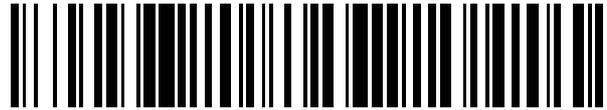


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 428**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2010 E 10719260 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2427772**

54 Título: **Uso de DPPiV/Seprasa como un marcador para el cáncer**

30 Prioridad:

**04.05.2009 EP 09006097**

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

**10.04.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SWIATEK-DE LANGE, MAGDALENA;  
KARL, JOHANN y  
ROLLINGER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 533 428 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Uso de DPPIV/Seprasa como un marcador para el cáncer

- 5 La presente invención se refiere a un método para ayudar a evaluar el cáncer. La invención desvela el uso del "complejo soluble DPPIV/proteína Seprasa" (=DPPIV/Seprasa) como un marcador universal de diferentes tipos de cáncer. La medición de DPPIV/Seprasa puede usarse, por ejemplo, en la detección o diagnóstico precoz del cáncer o en la supervisión de pacientes que se someten a cirugía.
- 10 El cáncer sigue siendo el desafío principal de la salud pública a pesar de los progresos en cuanto en su detección y terapia. Las células cancerosas se caracterizan por la producción de proteínas marcadoras asociadas al cáncer. Las proteínas asociadas con el cáncer se encuentran en los tejidos y en los fluidos corporales de un individuo que portador de células cancerosas. Sus niveles son normalmente bajos en fases iniciales del progreso carcinogénico y aumentan durante la progresión de la enfermedad y solamente en casos excepcionales se observa una disminución
- 15 del nivel de proteínas en el transcurso de la progresión de la enfermedad. La detección sensible de estas proteínas es una estrategia ventajosa y prometedora para el diagnóstico del cáncer, en particular en un diagnóstico de cáncer en fase inicial. Los tipos de cáncer más frecuentes son el cáncer de mama (CM), el cáncer de pulmón (CP) y el cáncer colorrectal (CCR).
- 20 Las estrategias terapéuticas más importantes para los tumores sólidos son:
- a) resección quirúrgica del tumor,
  - b) quimioterapia,
  - c) radioterapia,
  - 25 d) tratamiento con agentes biológicos, como anticuerpos anti-tumorales o anticuerpos anti-angiogénicos y
  - e) una combinación de los métodos anteriores.

La resección quirúrgica de los tumores se acepta generalmente como un tratamiento de primera línea para tumores sólidos en fase inicial. Sin embargo, la mayoría de los cánceres se detectan únicamente cuando se vuelven

30 sintomáticos, es decir, cuando los pacientes ya están en una fase más bien avanzada de progresión de la enfermedad.

La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en cuanto a su grado, progresión y gravedad. Agrupa a pacientes con cáncer de manera que puedan realizarse generalizaciones sobre el pronóstico y la elección

35 de la terapia.

Las diferentes fases del CM o CCR usadas se clasifican de acuerdo con las fases A a D de Duke. Actualmente, el sistema TNM es la clasificación más ampliamente usada del grado anatómico del cáncer. Representa un sistema de

40 estadificación uniforme, aceptado a nivel internacional. Existen tres variables clásicas: T (el alcance del tumor primario), N (el estado de los nódulos linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis distantes). Los criterios TNM se publican en la UICC (Unión Internacional Contra el Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds): TNM Classification of Malignant Tumours, sexta edición, 2002). Una vez que se determina el estado TNM los pacientes se agrupan en fases de la enfermedad que se identifican por números romanos que varían de I a IV, siendo IV la fase más avanzada de la enfermedad. La estadificación TNM y las fases de la enfermedad de la UICC

45 se corresponden entre sí como se muestra en la siguiente Tabla, extraída de Sobin L.H. y Wittekind (eds.), anteriormente citado.

Interrelación de la estadificación TNM y fases de la enfermedad de la UICC

Fase de la enfermedad de la UICC	Estadificación T	Estadificación N	Estadificación M
Fase 0	T <sub>is</sub>	N0	M0
Fase I	T1, T2	N0	M0
Fase IIA	T3	N0	M0
Fase IIB	T4	N0	M0
Fase IIIA	T1, T2	N1	M0
Fase IIIB	T3, T4	N1	M0
Fase IIIC	Cualquier T	N2	M0
Estadío IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

50

Lo que es especialmente importante es que el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo, CM o CCR, se traduce en un pronóstico mucho mejor. En el CCR, los tumores malignos colorrectales surgen de tumores benignos, es decir, de adenoma. Por lo tanto, los pacientes diagnosticados en la fase de adenoma tienen mejor pronóstico. Si los pacientes diagnosticados tan pronto como en la fase Tis, N0, M0 o T1-3; N0; M0, se tratan adecuadamente, tienen una probabilidad de supervivencia de 5 años mayor del 90 % después del diagnóstico, en comparación con un índice de supervivencia de 5 años de solo el 10 % en pacientes diagnosticados cuando la metástasis distante está ya presente.

Los métodos de detección actuales que incluyen métodos de diagnóstico por imágenes, tales como rayos X o imágenes por resonancia magnética nuclear en teoría serían al menos parcialmente apropiados para su uso como una herramienta de exploración general. Sin embargo, son muy costosos y no permisibles para los sistemas sanitarios para un uso amplio y general en exploraciones masivas de gran cantidad de personas, particularmente de personas sin ningún síntoma tumoral.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento sencillo y rentable para evaluar tumores, por ejemplo, para identificar individuos que se sospecha que tienen cáncer. Para esta finalidad, sería deseable un marcador tumoral general que fuese detectable en fluidos corporales, por ejemplo, sangre, suero o plasma, o un panel de dichos marcadores.

En el uso clínico, ya se dispone de diversos marcadores tumorales en suero. 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 (CCE) son los marcadores más destacados del CP. Sin embargo, ninguno de estos cumple con los criterios de sensibilidad y especificidad necesarios para una herramienta de exploración (Thomas, L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/ Main, Alemania (2000)).

Para ser de utilidad clínica, un nuevo marcador diagnóstico debe ser comparable, o mejor, como un solo marcador, con otros marcadores conocidos en la técnica. O, un nuevo marcador debe conducir a un avance en cuanto a la sensibilidad y/o especificidad diagnóstica, si se usa solo o en combinación con uno o más marcadores distintos, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnóstica de un ensayo se evalúa mejor por sus características de los datos recibidos, que se describirán con detalle más adelante.

La sangre entera, el suero o el plasma son las fuentes de muestra más generalmente usadas en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral precoz que podría ayudar en la detección fiable del cáncer o proporcionar una información de pronóstico precoz podría conducir a un método que ayudaría enormemente en el diagnóstico y en el tratamiento de esa enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente para mejorar la evaluación *in vitro* del cáncer y, en particular, del CP o del CCR. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo, del CP o del CCR, ya que los pacientes diagnosticados precozmente tienen probabilidades de supervivencia mucho más altas en comparación con los pacientes diagnosticados a una fase de enfermedad avanzada.

La utilidad clínica de los marcadores bioquímicos en el cáncer de pulmón se ha revisado recientemente (Duffy, M.J., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38 (2001) 225-262).

Actualmente se considera que Cyfra 21-1 es el mejor marcador tumoral hasta ahora conocido para el cáncer de pulmón. Incluso no siendo órgano-específico se encuentra predominantemente en tejido pulmonar. La sensibilidad de Cyfra 21-1 para el cáncer de pulmón, se describe que es de aproximadamente un 46-61 % a una especificidad del 95 % frente a otras enfermedades pulmonares benignas. Los niveles de Cyfra 21-1 aumentados en suero también están asociados con enfermedades hepáticas benignas declaradas, insuficiencia renal y cáncer invasivo de vejiga urinaria. El ensayo con Cyfra 21-1 se recomienda para supervisión de terapia postoperatoria.

El ACE pertenece al grupo de antígenos carcinofetales, normalmente producidos durante la embriogénesis. El ACE no es órgano-específico y se usa predominantemente para controlar el cáncer colorrectal. Además de tumores malignos, también diversas enfermedades benignas, tales como cirrosis, bronquitis, pancreatitis y enfermedades autoinmunitarias, están asociadas con niveles aumentados de ACE en suero. A una especificidad del 95 % frente a enfermedades pulmonares benignas su sensibilidad para el cáncer de pulmón se indica que es del 29-44 %. Un uso preferido del ACE es la supervisión de la terapia del cáncer de pulmón.

La proteína FERR (Ferritina) contiene aproximadamente 20% de hierro y se encuentra en el intestino, hígado y bazo. Es una de las formas principales en las que se almacena el hierro en el organismo. Se ha notificado que las reservas de hierro corporal aumentan el riesgo de neoplasmas colorrectales. En un estudio realizado por Scholefield, J.H. et al. (Dis. Colon Rectum 41 (1998) 1029-1032) utilizando muestras de 148 pacientes (50 pacientes con cáncer colorrectal demostrado, 49 de pacientes sin enfermedad colónica y pacientes con adenomas del colon) se analizó la ferritina en suero. No hubo diferencias significativas en cuanto a los niveles de ferritina en suero entre ninguno de los tres grupos.

La OPN (Osteopontina) es una sialoproteína de unión celular específica de hueso (Kiefer, M.C. et al., Nucl. Acids Res. 17 (1989) 3306). La osteopontina (Oldberg, A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 8819-8823; Oldberg, A. et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 19433-19436) también conocida como fosfoproteína secretada asociada a transformación (Senger, D.R. et al., Anticancer Res. 9 (1989) 1291-1299), o activación-1 de linfocitos T temprana (Patarca, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 2736-2739), es una fosfoproteína glucosilada secretada expresada por hueso (Oldberg et al., J. Biol. Chem. 263 (1986) 19433-19436), linfocitos T activados (Patarca, R. et al., J. Exp. Med. 170 (1989) 145-161; Patarca, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 2736-2739), macrófagos (Singh, R.P. et al., J. Exp. Med. 171 (1990) 1931-1942), células de la musculatura lisa del sistema vascular (Giachelli, C. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 177 (1991) 867-873) y carcinomas y sarcomas (Senger, D.R. et al., Anticancer Res. 9 (1989) 1291-1299).

La seprasa, originalmente identificada como una gelatinasa unida a membrana de 170 kDa, se expresa en invadopodios de células LOX de melanoma altamente agresivo (Aoyama, A. and Chen, W.T., PNAS 87 (1990) 8296-8300; Mueller, S.C. et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 24947-24952; Monsky, W.L. et al., Cancer Res. 54 (1994) 5702-5710). La enzima activa es un homodímero de dos subunidades (Pineiro-Sanchez, M.L. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 7595-7601; Park, J.E. et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 36505-36512). El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de un ADNc que codifica la subunidad de 97 kDa (Goldstein, L.A. et al., Biochem. Biophys. Act. 1361 (1997) 11-19) reveló que es básicamente idéntica a la proteína  $\alpha$  de activación de fibroblastos (PAF $\alpha$ ) (Scanlan, M.J. et al., PNAS 91 (1994) 5657-5661), que se expresa en fibroblastos estromales reactivos de cánceres epiteliales y en cicatrización de heridas (Garin-Chesa, P. et al., PNAS 87 (1990) 7235-7239).

La NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa; Swiss-PROT: P40261) tiene un peso molecular aparente de 29,6 kDa y un punto isoeléctrico de 5,56. La NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida y de otras piridinas. Esta actividad es importante para la biotransformación de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. Se ha notificado que la proteína se expresa predominantemente en hígado y que se localiza en el citoplasma. La NNMT se ha clonado a partir de ADNc de hígado humano y contiene una fase de lectura abierta de 792 nucleótidos que codifica una proteína de 264 amino ácidos con una masa molecular calculada de 29,6 kDa (Aksoy, S. et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 14835-14840). En la bibliografía hay poca información sobre una posible función de la enzima en el cáncer humano. En un documento se notificó el aumento de la actividad enzimática de la NNMT hepática como un marcador en ratones para la caquexia en cáncer (Okamura, A. et al., Jpn. J. Cancer Res. 89 (1998) 649-656). En un informe reciente, se demostró la regulación negativa del gen de la NNMT en respuesta a radiación en líneas celulares sensibles a radiación (Kassem, H.S. et al., Int. J. Cancer 101 (2002) 454-460). Recientemente se ha descubierto (documento WO 2004/057336) que la NNMT será de interés en la evaluación del CCR.

Con respecto a los perfiles de los marcadores y teniendo como objetivo mejorar el diagnóstico del cáncer de pulmón, se publicó un método (Schneider, J. et al., Int. J. Clin. Oncol. 7 (2002) 145-151) usando algoritmos de clasificación basados en lógica difusa para combinar niveles de suero de Cyfra 21-1, EEN y proteína C reactiva (PCR), que es un marcador de inflamación general. Los autores describen una sensibilidad del 92 % a una especificidad del 95 %. Sin embargo, en este estudio, por ejemplo, se indica que la sensibilidad de Cyfra 21-1, como un marcador tumoral sencillo, es del 72 % a una especificidad del 95 %, que es significativamente más alta que en muchos otros estudios publicados. Duffy, MJ, in Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38 (2001) 225-262 indican una sensibilidad de entre 46 % y 61 %. Este comportamiento elevado inusual conseguido por Schneider et al., genera algunas dudas y posiblemente se debe a diversas circunstancias. En primer lugar, el colectivo de pacientes control parece que es más joven que el colectivo de pacientes, es decir, los grupos no tienen la misma edad, y el colectivo de pacientes comprende muchas fases tardías. En segundo lugar e incluso más crítico, el comportamiento del algoritmo se comprueba en las muestras del conjunto de capacitación que se usa para la determinación de los calificadores de la lógica difusa. Por tanto, estos calificadores son, estrictamente hablando, calificadores "personalizados" para este conjunto y no se aplican a un conjunto de validación independiente. En circunstancias normales, se esperaba que el mismo algoritmo aplicado a un conjunto de validación más grande, independiente y bien equilibrado, condujese a un comportamiento global significativamente reducido. La EEN (enolasa específica neuronal) es un marcador tumoral del CPM (cáncer de pulmón microcítico). Generalmente, el aumento de los niveles en suero de la EEN se encuentran en asociación con tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. Los niveles de suero aumentados también se encuentran en pacientes con enfermedades pulmonares benignas y enfermedades cerebrales, tales como meningitis u otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y lesiones traumáticas en la cabeza. Aunque la sensibilidad para el CPM a una especificidad del 95 % se indica que es del 60-87 %, el comportamiento del ensayo con EEN para el CPNM (cáncer de pulmón microcítico) no es bueno (sensibilidad del 7-25 %). La EEN se recomienda en la supervisión para la terapia del CPNM.

El gen de PSE3 se aisló inicialmente en 1990 y la proteína correspondiente se denominó Ki. Los pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) producen autoanticuerpos contra diversos antígenos nucleares, Ki entre otros. Nikaido et al. (Nikaido, T. et al., Clin. Exp. Immunol. 79 (1990) 209-214) aislaron el ADNc correspondiente usando un ADNc bovino como una sonda y explorando una biblioteca de ADNc de un paciente con LES. Más tarde, se descubrió que la Ki recombinante activa el proteasoma, y la proteína se identificó como PSE3 (Realini, C. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 25483-25492; Tanahashi, N. et al., Genes to Cells 2 (1997) 195-211). Tanahashi, N. et al., citado anteriormente, también describen un anticuerpo contra P28gamma, es decir contra PSE3. Miyagi, T. et al. (Journal of Gastroenterology and Hepatology 18 (2003) 32-40) indican que la expresión de subunidades proteasómicas y de

antígenos leucocitarios humanos de clase I están afectados en células de cáncer de colon humano. La expresión de la PSE3 es anómalamente alta en cáncer de tiroides, especialmente en sus células de crecimiento acelerado, calculado por tinción inmunohistoquímica y transferencia de Western (Okamura, T. et al., J. Clin. Endocrin. Metab. 88 (2003) 1374-1383).

S100A12, también se denomina CAAF1; CAGC; proteína de unión a calcio en líquido amniótico; proteína relacionada con calgranulina; CGRP; proteína de unión a calcio en líquido amniótico 1; Calgranulina C; ENRAGE (proteína de unión a RAGE extracelular recientemente identificada); proteína S100 de neutrófilos; proteína A 12 de unión a calcio S100. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de proteínas S100 que contiene 2 motivos EF-hand de unión a calcio. Las proteínas S100 se localizan en el citoplasma y/o núcleo de una gran variedad de células, y están implicadas en la regulación de diversos procesos celulares tales como la progresión y diferenciación del ciclo celular. Los genes de S100 incluyen al menos 13 miembros que se localizan como un grupo sobre el cromosoma 1q21. Se propone que esta proteína está implicada en rutas específicas de transducción de señal dependientes de calcio y que su efecto regulador sobre componentes del citoesqueleto puede modular varias actividades neutrófilas.

CYBP (S100A6) es una proteína de unión a calcio que pertenece a la familia de proteínas S100 (revisado en Zimmer, D. B. et al., Brain Res. Bull. 37 (1995) 417-429 y Heizmann, C. W. et al., Biometals 11 (1998) 383-397). Su gen se descubrió basándose en su expresión dependiente del ciclo celular (Calabretta, B. et al., J. Biol. Chem. 261 (1986) 12628 a 12632). Este gen se expresa a su nivel máximo durante la transición entre la fase G0 a S del ciclo celular, pero su expresión está desregulada en leucemia mieloide aguda (Calabretta, B. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83 (1986) 1495-1498). La proteína se purificó primero y caracterizó de células tumorales de ascitis de Ehrlich 1 (TAE) (Kuznicki, J. et al., Biochem. J. 247 (1987) 663-667, y Kuznicki, J. et al., Biochem. J. 263 (1989) 951-956). Posteriormente, se descubrió que calciclina se expresaba a altos niveles en fibroblastos y en células epiteliales, en células con elevada actividad proliferante, y en aquellas que experimentaban diferenciación (Leonard, D.G. et al., Mol. Cell. Biol. 7 (1987) 3156-3167; Guo, X. J. et al., Cell Growth Differ. 1 (1990) 333-338; Tonini, G. P. et al., Cancer Res. 51 (1991) 1733-1737; Kuznicki, J. et al., Exp. Cell Res. 200 (1992) 425-430).

ASC, la "proteína de tipo mancha asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa", también se conoce como "diana de silenciamiento 1 inducido por metilación" (TMS1) (Swiss-PROT: Q9ULZ3). Los dominios de reclutamiento asociados a caspasa (DRAC) median la interacción entre proteínas adaptadoras, tales como APAF1 (factor 1 activador de la proteasa apoptótica) y la proforma de caspasas (por ejemplo CASP9) que participan en la apoptosis. ASC es un miembro de la familia de proteínas adaptadoras que contienen DRAC.

EEN: La enzima enolasa glucolítica se produce en diversas isoformas diméricas que comprenden tres subunidades inmunológicamente diferentes denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Las isoformas  $\alpha\gamma$  y  $\gamma\gamma$  de la enolasa, denominadas enolasas específicas neuronales (EEN) o  $\gamma$ -enolasas, son principalmente detectables a altas concentraciones en neuronas y en células neuroendocrinas, así como en tumores que se originan de las mismas (Lamerz R., NSE (Neuronenspezifische Enolase),  $\gamma$ -Enolasa, En: Thomas L (ed) Clinical Laboratory Diagnosis, TH-Books, Frankfurt, 1ª Edición Inglesa 1998: 979-981, 5. deutsche Auflage 1998:1000-1003). La EEN se describe como el marcador de primera elección en el control del carcinoma bronquial microcítico, (Lamerz R., NSE (Neuronenspezifische Enolase),  $\gamma$ -Enolasa, en: Thomas L (ed) Clinical Laboratory Diagnosis, TH-Books, Frankfurt, 1ª Edición Inglesa 1998: 979-981, 5. deutsche Auflage 1998:1000-1003). Se encuentran concentraciones elevadas de EEN en el 60-81 % de los casos de carcinoma bronquial microcítico.

CA 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9), un antígeno (a) de Lewis sialilado) en un glucolípido es un marcador tumoral de cánceres gastrointestinales. Se produce en epitelio gástrico intestinal y pancreático fetal. También puede encontrarse a bajas concentraciones en tejido adulto en el hígado, pulmones y páncreas. No hay correlación entre la masa tumoral y los valores de ensayo de CA 19-9. Por lo tanto, la determinación de CA 19-9 no puede usarse para la detección precoz del carcinoma pancreático. Como la mucina se excreta exclusivamente a través del hígado, en algunos casos, leves colestasias regulares pueden conducir a niveles de CA 19-9 claramente elevados en suero. El marcador se usa principalmente para ayudar a controlar la patología en aquellos pacientes que tienen cáncer pancreático confirmado (sensibilidad del 70-87 %). El 3-7 % de la población tiene la configuración de grupo sanguíneo Lewis  $\alpha$ -negativo/ b-negativo y no pueden expresar la mucina con el CA 19-9 determinante reactivo. Esto debe tenerse en cuenta al interpretar los resultados.

CA 125 se encuentra en un alto porcentaje de tumores no mucinosos de ovario de origen epitelial y puede detectarse en suero. El carcinoma de ovario representa aproximadamente el 20 % de los tumores ginecológicos. Aunque los valores de CA 125 más altos se producen en pacientes que padecen carcinoma de ovario, también se observan claramente niveles elevados en tumores malignos de endometrio, mama, tracto gastrointestinal y diversos otros tumores malignos. Algunas veces se encuentran valores aumentados en diversas enfermedades ginecológicas benignas, tales como quistes de ovario, metaplasia de ovario, endometriosis, útero miomatoso o cervicitis. También pueden producirse ligeros aumentos de este marcador el inicio de la gestación y en diversas enfermedades benignas (por ejemplo pancreatitis aguda y crónica, enfermedades gastrointestinales benignas, insuficiencia renal,

enfermedades autoinmunitarias y otras). Se han encontrado niveles notablemente elevados en enfermedades hepáticas benignas tales como cirrosis y hepatitis. Pueden producirse aumentos extremos en cualquier tipo de ascitis debido a enfermedades malignas y benignas. Aunque CA 125 es un marcador relativamente inespecífico, actualmente es el marcador tumoral más importante para controlar la terapia y el progreso de pacientes con carcinoma seroso de ovario. Se indica una sensibilidad del 69-79 % para una especificidad del 82-93 %.

p53 (TP53, antígeno tumoral celular p53, supresor tumoral p53 o fosfoproteína p53) es un factor de transcripción que induce la detención o apoptosis del crecimiento celular (Appella, E. et al., *Pathol. Biol.* 48 (2000) 227-245). El p53 actúa como un supresor tumoral en muchos tipos de tumores y las mutaciones inactivadoras en su gen son los acontecimientos genéticos más comunes estimulando el desarrollo del cáncer en seres humanos (revisado en Olivier, M. y Petitjean, A., *Cancer Gene Ther.* 16 (2009) 1-12; Petitjean, A. et al., *Oncogene* 26 (2007) 2157-2165). La mutación de p53 se observa en el 40-50 % de los carcinomas colorrectales, y se asocia con agresividad del carcinoma (Soussi, T., *Cancer Res.* 60 (2000) 1777-1788). Las mutaciones en el gen de p53 no solo conducen 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 generación de autoanticuerpos anti-p53 específicos en sueros de pacientes con cáncer (Zhang, J.Y. et al., *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12 (2003) 136-143; Soussi, T., *Cancer Res.* 60 (2000) 1777-1788). La detección de autoanticuerpos anti-p53 en suero humano es una herramienta incipiente para el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Dependiendo del tipo de cáncer, la frecuencia de autoanticuerpos anti-p53 en suero varía de 17,8 % (CCR) a 16,1 % (CP) y 7,8 % (cáncer de mama) (Tan, E.M., *Immunological Reviews* 222 (2008) 328-340; Zhang, J.Y. et al., *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 12 (2003) 136-143).

Fue objeto de la presente invención investigar si podía identificarse un marcador bioquímico que se pudiese utilizar en la evaluación de la enfermedad del cáncer. En particular, los inventores de la presente invención investigaron si en los fluidos corporales podía identificarse un marcador bioquímico para evaluar los diferentes tipos de cáncer, tales como, cáncer de pulmón, mama, colon, próstata y riñón. En un aspecto muy preferido de la presente invención, se investigó la identificación de un marcador bioquímico para la evaluación del cáncer de pulmón (CP) o del cáncer colorrectal (CCR).

Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de la DPPIV/Seprasa puede superar, al menos parcialmente, algunos de los problemas de los marcadores actualmente conocidos en el estado de la técnica.

#### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir, en una muestra líquida, la concentración de a) el complejo soluble dipeptidil peptidasa IV/proteína Seprasa (=DPPIV/Seprasa), b) opcionalmente uno o más marcadores distintos de cáncer y c) usar el resultado de la medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer.

Además, la presente invención se refiere al uso de la DPPIV/Seprasa en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer y en el que la DPPIV/Seprasa se detecta en una muestra de suero o plasma.

Además, la presente invención se refiere al uso de una combinación de anticuerpos dirigidos bien contra la DPPIV soluble o contra la Seprasa soluble, en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de una DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer.

Además, la presente invención desvela el uso de un panel de marcadores que comprende la DPPIV/Seprasa y opcionalmente uno o más marcadores distintos para el cáncer en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de una DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer, y en el que la DPPIV/Seprasa se detecta en una muestra de suero o plasma.

#### Descripción detallada de la invención

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en una muestra la concentración de DPPIV/Seprasa y usar los resultados de la medición, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

En otra realización preferida, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en una muestra líquida la concentración de (a) DPPIV/Seprasa, (b) opcionalmente, uno o más marcadores distintos de cáncer y (c), usar el resultado de la medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer.

Sorprendentemente, se ha descubierto que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa en la muestra de ensayo está asociada con la aparición de cáncer. Pudo mostrarse que la DPPIV/Seprasa es un marcador que no es específico para un solo tipo de cáncer, sino un marcador para diferentes tipos de cáncer, es decir, un marcador tumoral general. Dado que la DPPIV/Seprasa parece ser bastante específica para procesos tumorigénicos, el nuevo marcador tumoral DPPIV/Seprasa tiene un gran potencial para ser de utilidad clínica con diversas clases de tipos tumorales.

Sorprendentemente, se descubrió en la presente invención que una determinación de la concentración de DPPIV/Seprasa en una muestra y/o fluido corporal, permitía la evaluación del cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, estómago, conducto biliar, esófago, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata. Incluso más sorprendentemente, se descubrió que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa o sus fragmentos en una muestra y/o fluido corporal, en comparación con controles normales, era indicativa de riesgo o de aparición del cáncer.

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* que comprende medir en una muestra la concentración de DPPIV/Seprasa mediante un método de detección inmunológico y usar el resultado de la medición, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

El método de la presente invención es idóneo para evaluar muchos tipos de cáncer diferentes. La disminución de la concentración de la DPPIV/Seprasa en una muestra, en comparación con controles normales, se ha descubierto, por ejemplo, en tipos de cánceres específicos, tales como cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, estómago, conducto biliar, esófago, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata, respectivamente.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, la concentración de DPPIV/Seprasa se mide *in vitro* en una muestra para evaluar tipos de cánceres específicos, tales como cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, estómago, conducto biliar, esófago, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la concentración de DPPIV/Seprasa se mide *in vitro* en una muestra para evaluar el cáncer, tal como cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello y panceras.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la concentración de DPPIV/Seprasa se mide *in vitro* en una muestra para evaluar el cáncer, tal como cáncer de pulmón (CP) o cáncer colorrectal (CCR).

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la concentración de DPPIV/Seprasa se mide *in vitro* en una muestra para evaluar el cáncer, tal como CP.

De acuerdo con otra realización preferida de la invención, la concentración de DPPIV/Seprasa se mide *in vitro* en una muestra para evaluar el cáncer, tal como CCR.

Una realización de la presente invención se refiere a la exploración masiva de una población para diferenciar entre individuos que probablemente no tienen cáncer e individuos que podrían clasificarse como casos "sospechosos". El último grupo de individuos puede después someterse a procedimientos de diagnóstico adicionales, por ejemplo, mediante métodos de diagnóstico por imágenes u otros medios idóneos.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a un perfeccionamiento de paneles marcadores tumorales que son idóneos para el diagnóstico del cáncer en general o paneles marcadores tumorales que son idóneos para el diagnóstico de un tipo de tumor específico, por ejemplo, cáncer de pulmón o cáncer de colon.

La presente invención también se refiere a un método para evaluar el cáncer *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir, en una muestra, la concentración de DPPIV/Seprasa y de uno o más marcadores distintos específicos de cáncer, y usar los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas, en la evaluación del cáncer. Los marcadores preferidos para su uso en combinación con DPPIV/Seprasa son, por otro lado, marcadores que son marcadores tumorales generales (es decir, marcadores que no son específicos de un solo tipo de tumor) o, por otro lado, marcadores tumorales específicos (marcadores que son específicos de un solo tipo de tumor). Son marcadores preferidos, por ejemplo, para evaluar el cáncer, tal como cáncer de pulmón o de colon, Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA19-9 y CA125. Cada uno de estos marcadores puede usarse individualmente o en cualquier combinación junto con DPPIV/Seprasa.

La presente invención también se refiere a un método para evaluar *in vitro* el cáncer, tal como cáncer de pulmón o cáncer de colon mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de DPPIV/Seprasa y de uno o más marcadores distintos, por ejemplo, uno o más marcadores distintos de cáncer de pulmón o de colon y usar los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas, en la evaluación del cáncer. Se prefiere que uno o más marcadores distintos se seleccionen del grupo que consiste en

Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA19-9 y CA125.

5 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores distintos seleccionados del grupo que consiste en CYBP, NNMT, PSE3, ASC, OPN, Seprasa, S100A12, EEN, ACE y Cyfra 21-1, en la evaluación del CP, y más particularmente CPNM.

10 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores distintos seleccionados del grupo que consiste en FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, ACE y Cyfra 21-1, en la evaluación del cáncer de colon, y más particularmente del CCR.

15 La presente invención también se refiere al uso de DPPIV/Seprasa en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer.

La presente invención también se refiere al uso de DPPIV/Seprasa en la evaluación de diversos tipos específicos de cáncer, particularmente cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata.

20 La presente invención también se refiere al uso de DPPIV/Seprasa en la evaluación de diversos tipos específicos de cáncer, particularmente cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello o páncreas.

25 La presente invención también se refiere al uso de una combinación de agentes de unión específicos dirigidos contra cualquiera de DPPIV soluble, Seprasa soluble o DPPIV/Seprasa en la evaluación del cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer.

Preferentemente, la DPPIV/Seprasa se detecta en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich (= inmunoensayo sándwich).

30 La presente invención también se refiere a un formato de inmunoensayo sándwich con un primer agente de unión específico que se une a la DPPIV soluble como parte de la DPPIV/Seprasa y un segundo agente de unión específico que se une a la Seprasa soluble como parte de la DPPIV/Seprasa, respectivamente.

35 La presente invención también se refiere a un formato de inmunoensayo sándwich con un agente de unión específico que se une al complejo soluble DPPIV/proteína Seprasa pero no a la DPPIV soluble o a la Seprasa soluble, respectivamente.

40 La presente invención también se refiere a un formato de inmunoensayo sándwich con agentes de unión caracterizado por que, como agente de unión de captura, se usa cualquiera de un primer agente de unión específico o un segundo agente de unión específico y como agente de unión de detección se usa cualquiera de dicho segundo agente de unión específico o de dicho primer agente de unión específico, respectivamente.

45 El término "medición" comprende preferentemente una medición semi-cualitativa o cuantitativa de DPPIV/Seprasa en una muestra. En una realización preferida la medición es una medida semi-cuantitativa, es decir, se determina si la concentración de DPPIV/Seprasa es superior o inferior a un valor de límite. Como apreciará el experto en la técnica, en un ensayo de Si (presencia) o No (ausencia), la sensibilidad del ensayo normalmente se establece para igualarse con el valor de límite. Un valor de límite puede determinarse, por ejemplo, a partir del ensayo de un grupo de individuos sanos. Preferentemente el límite se establece para dar como resultado una especificidad del 90 %, también se prefiere que el límite se establezca para dar como resultado una especificidad del 95 %, o también se prefiere que el límite se establezca para dar como resultado una especificidad del 98 %. La presencia o un valor inferior al valor de límite pueden ser, por ejemplo, indicativo de la presencia de cáncer. En particular, la presencia o un valor inferior al valor de límite pueden ser, por ejemplo, indicativo de la presencia de cáncer de pulmón, colon, esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata. En una realización adicional preferida la medición de DPPIV/Seprasa es una medición cuantitativa. En otra realización la concentración de DPPIV/Seprasa se correlaciona con una cuestión de diagnóstico subyacente, tal como, por ejemplo, la fase de la enfermedad, la progresión de la enfermedad, o la respuesta a la terapia.

60 En determinadas realizaciones preferidas distintas, por ejemplo, en el control o seguimiento de la terapia, el límite se establece para dar como resultado una sensibilidad del 90 %, también se prefiere que el límite se establezca para dar como resultado una sensibilidad del 95 %, o también se prefiere que el límite se establezca para dar como resultado una sensibilidad de 98 %.

65 Un valor superior al valor de límite puede ser, por ejemplo, indicativo de la ausencia de cáncer. En particular un valor superior al valor de límite puede ser, por ejemplo, indicativo de la ausencia de cáncer de mama, colorrectal y/o de ovario.

En una realización adicional preferida, la medición de DPPIV/Seprasa es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales la concentración del complejo soluble DPPIV/Seprasa se correlaciona con una cuestión de diagnóstico subyacente, tal como, por ejemplo, la fase de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

La Seprasa unida a membrana humana, también conocida como proteína de activación de fibroblastos (= PAF), es una glucoproteína de 170 kDa que tiene actividad gelatinasa y dipeptidil peptidasa que consta de dos unidades de Seprasa monoméricas idénticas (Pineiro-Sanchez, M.L. et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 7595-7601; Park, J.E. et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 36505-36512). El monómero de la proteína Seprasa humana comprende 760 aminoácidos mostrados en la SEC ID N°: 1 (N° de registro Q12884 de la base de datos Swissprot).

Un experto en la técnica conoce una forma más corta de la proteína Seprasa humana como Seprasa soluble o enzima de escisión antiplasmina circulante (= EEAP) (Lee, K.N. et al., Blood 103 (2004) 3783-3788; Lee, K.N. et al., Blood 107 (2006) 1397-1404). La secuencia de aminoácidos de la Seprasa soluble humana se muestra en la SEC ID N°: 4 y comprende las posiciones de aminoácidos 26-760 del N° de registro Q12884 de la base de datos Swissprot. Se prevé que la Seprasa humana tenga sus 4 primeros restos N-terminales dentro del citoplasma del fibroblasto, seguido por un dominio transmembrana de 21 restos y después un dominio catalítico C-terminal extracelular de 734 restos (Goldstein, L.A. et al., Biochim Biophys Acta. 1361 (1997) 11-19; Scanlan, M.J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994) 5657-5661). El dímero de la Seprasa soluble es una glucoproteína de 160 kDa que consta de dos unidades de proteína Seprasa solubles monoméricas idénticas. Se ha mostrado que la Seprasa soluble puede procesarse adicionalmente en el extremo N en fragmentos de 70 kDa o 50 kDa (Chen, D. et al., Cancer Res. 66 (2006) 9977-9985).

Piñero-Sánchez et al. (anteriormente citados) descubrieron que una expresión aumentada de Seprasa se correlacionaba con el fenotipo invasivo de células de carcinoma y melanoma humano. Henry, L.R. et al., Clin. Cancer Res. 13 (2007) 1736-1741 describen que los pacientes con tumor de colon humano tienen altos niveles de Seprasa estromal y tienen más probablemente una progresión de enfermedad agresiva y un posible desarrollo de metástasis o recurrencia.

La dipeptidil peptidasa IV (= DPPIV) humana, que también se conoce como CD26, es una molécula de superficie celular de 110 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana comprende 766 aminoácidos y se muestra en la SEC ID N°: 2 (N° de Registro P27487 de la base de datos Swissprot). Contiene actividad dipeptidil peptidasa IV intrínseca que elimina selectivamente dipéptidos N-terminal de péptidos con prolina o alanina en la tercera posición aminoacídica. Interacciona con diversas moléculas extracelulares y también está implicada en cascadas de transducción de señal intracelular. Las actividades multifuncionales de la DPPIV humana dependen del tipo de célula y de las condiciones intracelulares o extracelulares que influyen en su papel como una enzima proteolítica, receptor de superficie celular, proteína de interacción co-estimuladora y mediador de transducción de señales. La DPPIV humana tiene un dominio citoplasmático corto de la posición aminoacídica 1 a 6, una región transmembrana de la posición aminoacídica 7 a 28, y un dominio extracelular de la posición aminoacídica 29 a 766 con actividad dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) intrínseca.

La secuencia de aminoácidos de la dipeptidil peptidasa IV soluble (= DPPIV soluble) humana se muestra en la SEC ID N°: 3, y comprende las posiciones aminoacídicas 29 a 766 del número de registro P27487 de la base de datos Swissprot. El dímero de la DPPIV soluble es una glucoproteína de 170 kDa que consiste en dos unidades de DPPIV soluble monoméricas idénticas.

El complejo humano DPPIV/proteína Seprasa unido a membrana está formado por un homodímero de DPPIV de 220 kDa y un homodímero de Seprasa de 170 kDa que tiene un peso molecular de 410 kDa. En determinadas condiciones este complejo puede formar un complejo doble que tiene un peso molecular de 820 kDa. Estos complejos DPPIV/proteína Seprasa unidos a membrana han sido descritos por Gherzi, G. et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 29.231-29.241; Gherzi, G. et al., Adv. Exp. Med. Biol. 524 (2003) 87-94, y Gherzi, G. et al., Cancer Res. 66 (2006) 4652-4661 en células endoteliales humanas.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "complejo soluble DPPIV/proteína Seprasa" (= DPPIV/Seprasa) se refiere al complejo soluble formado por un homodímero de DPPIV soluble (170 kDa) y un homodímero de Seprasa soluble (160 kDa) con un peso molecular de 330 kDa. En determinadas condiciones este complejo puede formar un complejo doble que tiene un peso molecular de 660 kDa.

Por tanto, ninguno de los documentos anteriores de la técnica sugiere que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa en fluidos corporales sea un indicativo de cáncer.

Como es obvio para el experto en la técnica, la presente invención no debe interpretarse que se limita al complejo formado por la DPPIV soluble de la SEC ID N°: 3 y la Seprasa soluble de la SEC ID N°: 4. La DPPIV/Seprasa también puede comprender fragmentos fisiológicos o artificiales de la DPPIV o de la Seprasa, modificaciones secundarias de la DPPIV o de la Seprasa, así como variantes alélicas de la DPPIV o de la Seprasa. Por lo tanto, la DPPIV, así como fragmentos, modificaciones y variantes de la DPPIV, están unidos a la Seprasa.

La DPPIV/Seprasa se detecta en muestras apropiadas. Estas muestras son plasma o suero. Preferentemente, la muestra procede de un sujeto humano, por ejemplo, de un paciente con un tumor o de una persona que está en riesgo de tener un tumor o de una persona que se sospecha que tiene un tumor. La DPPIV/Seprasa se detecta en una muestra de suero o plasma.

5 También pueden emplearse todas estas técnicas de detección en el formato de micromatrices, matrices de proteína, micromatrices de anticuerpos, micromatrices tisulares, bio microplacas electrónicas o tecnologías basadas en microplacas de proteínas (véase Schena M., Microarray Biochip Technology, Eaton Publishing, Natick, Mass., 2000).

10 Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

15 En el presente documento, los artículos "un" y "uno/a" se usan para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. Como ejemplo, "un marcador" significa un marcador o más de un marcador. La expresión "al menos" se usa para indicar que, opcionalmente, puede haber uno o más objetos adicionales. Como ejemplo, un panel de marcadores que comprende al menos (los marcadores) DPPIV/Seprasa y CYFRA 21-1 puede comprender opcionalmente uno o más marcadores distintos.

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

25 Las expresiones "bio microplaca", "microplaca polimérica" o "microplaca de proteínas" se usan indistintamente y se refiere a un conjunto de una gran cantidad de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos dispuestos sobre un sustrato compartido que puede ser una parte de una oblea de silicio, una tira de nylon, una tira de plástico, o un portaobjetos.

30 Una "matriz", "macromatriz" o "micromatriz" es un conjunto de sustancias, tales como moléculas, marcadores, abridores, microcoloides, detectores y/o detectores, intencionalmente creado, unidos a, o fabricados sobre, un sustrato o superficie sólida, tal como una microplaca de vidrio, de plástico, de silicio u otro material que forme una matriz. Las matrices pueden usarse para medir simultáneamente niveles de grandes cantidades, por ejemplo, decenas, miles o millones, de reacciones o combinaciones. Una matriz también puede contener una pequeña cantidad de sustancias, por ejemplo, una, alguna o una docena. Las sustancias en la matriz pueden ser idénticas o diferentes entre sí. La matriz puede asumir diversos formatos, por ejemplo, bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de moléculas inmovilizadas, bibliotecas de anticuerpos inmovilizados, bibliotecas de compuestos en contacto con perlas de resina, microplacas de sílice, u otros soportes sólidos. La matriz podría ser una macromatriz o una micromatriz, dependiendo del tamaño de las almohadillas sobre la matriz. Una macromatriz generalmente contiene tamaños de almohadilla de aproximadamente 300 micras o de mayor tamaño y pueden formar imágenes fácilmente a través de escáneres con gel y transferencias. Una micromatriz contendrá generalmente tamaños de almohadilla menores de 300 micras.

40 Un "soporte sólido" es un material polimérico, insoluble, funcionalizado al cual miembros de la biblioteca o reactivos pueden conectarse o unirse de manera covalente (a menudo mediante un conector) para inmovilizarse o permitir que se separen fácilmente (por filtración, centrifugación, lavado, etc.) del exceso de reactivos, subproductos de reacción solubles, o disolventes.

45 Las expresiones "marcador" o "marcador bioquímico", como se usan en el presente documento, se refieren a una molécula que se usa como una diana para analizar una muestra de ensayo de un paciente. Son ejemplos de dichas dianas moleculares las proteínas o los polipéptidos. Se contempla que las proteínas o los polipéptidos usados como un marcador en la presente invención incluyan variantes de origen natural de dicha proteína, así como fragmentos de dicha proteína o de dicha variante, en particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables comprenden preferentemente al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la técnica reconocería qué proteínas, liberadas por células o presentes en la matriz extracelular, pueden estar dañadas, por ejemplo, durante la inflamación, o pueden degradarse o escindirarse en dichos fragmentos. Determinados marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que posteriormente puede activarse por proteólisis. Como el experto en la técnica apreciará, las proteínas o fragmentos de las mismas también pueden estar presentes como parte de un complejo. Dicho complejo también puede usarse como un marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador están codificadas por el mismo gen, pero pueden diferenciarse por su punto isoelectrico (= PI) o peso molecular (= PM), o ambos, por ejemplo, como resultado de ARNm alternativo, procesamiento de pre-ARNm o procesamiento de proteínas. La secuencia de aminoácidos de una variante tiene una identidad de hasta el 95 % o más con la secuencia marcadora correspondiente. Además, o como alternativa, un polipéptido marcador o una variante del mismo, pueden llevar una modificación postraduccional. Las modificaciones postraducionales preferidas son glucosilación, acilación, y/o fosforilación.

65 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para DPPIV/Seprasa, una unión de lectina a DPPIV/Seprasa o un anticuerpo reactivo con la DPPIV/Seprasa. Un agente de unión específico tiene una afinidad de

al menos  $10^7$  l/mol por su molécula diana correspondiente. El agente de unión específico tiene preferentemente una afinidad de  $10^8$  l/mol o también se prefiere de  $10^9$  l/mol por su molécula diana.

5 Un par de agentes de unión específico comprende preferentemente un primer anticuerpo reactivo con la DPPIV soluble y un segundo anticuerpo reactivo con la Seprasa soluble de tal manera que el par de anticuerpos puede formar un complejo con la DPPIV/Seprasa.

10 Adicionalmente, un agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo específicamente reactivo con la DPPIV/Seprasa pero no solo con la DPPIV soluble o con la Seprasa soluble.

15 En el presente documento también se desvela un agente de unión específico dirigido contra la DPPIV soluble no unida, mediante lo cual el agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo reactivo con un epítipo de la DPPIV soluble que está oculto cuando la DPPIV soluble está unida a la Seprasa soluble. En la presente invención también se incluye un agente de unión específico dirigido contra la Seprasa soluble no unida, mediante lo cual el agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo reactivo con un epítipo de la Seprasa soluble que está oculto cuando la Seprasa soluble está unida a la DPPIV soluble.

20 El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, a un anticuerpo monoclonal, a fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, a anticuerpos monocatenarios, así como a construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

25 Puede usarse cualquier fragmento de anticuerpo que conserve los criterios anteriores de un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan por procedimientos de última tecnología, como se describe, por ejemplo, en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, en todo el libro, especialmente en las páginas 43-78). Además, el experto en la técnica conoce bien métodos basados en inmunoabsorbentes que pueden usarse para el aislamiento específico de anticuerpos. A través de estos medios, la calidad de los anticuerpos policlonales, y por tanto su comportamiento en inmunoensayos, puede potenciarse (Tijssen, P., citado anteriormente, páginas 108-115).

30 Para los conseguir los resultados desvelados en el presente documento, pueden usarse anticuerpos policlonales suscitados en conejos. Sin embargo, también pueden usarse claramente anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, de oveja o cabra, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad necesaria con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo de rutina clínica. La generación y uso de anticuerpos monoclonales contra DPPIV/Seprasa en un método de acuerdo con la presente invención, representa respectivamente, otras realizaciones incluso preferidas.

40 Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la técnica. Los métodos para realizar dichos ensayos así sus aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en libros de texto 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 221-278, Burdon, R.H. y v. Knippenberg, P.H. (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990), y diversos volúmenes de "Methods in Enzymology" (Eds. SP Colowick, NO Caplan, Academic Press), con referencia a métodos de detección inmunológica, especialmente en los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

45 De acuerdo con la presente invención, se determina la concentración de DPPIV/Seprasa. En una realización, el marcador DPPIV/Seprasa se mide específicamente a partir de una muestra mediante el uso de un agente de unión específico.

50 Como apreciará el experto en la técnica, la DPPIV/Seprasa se ha identificado ahora como un marcador que es útil en la evaluación del cáncer, preferentemente de cáncer de pulmón o colon. Pueden usarse diversos procedimientos de inmunodiagnóstico para alcanzar un resultado comparable con el de los logros de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden, entre otras, el uso de péptidos sintéticos, que representan un epítipo de DPPIV, Seprasa, o DPPIV/Seprasa para inmunización. Como alternativa, la inmunización con ADN también se conoce como vacunación con ADN que puede usarse.

60 Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incuba con los agentes de unión específicos para la DPPIV/Seprasa en condiciones apropiadas para la formación del complejo de un agente de unión-DPPIV/Seprasa. Dichas condiciones no necesitan especificarse, ya que el experto en la técnica puede identificar fácilmente dichas condiciones de incubación apropiadas sin realizar ningún esfuerzo inventivo. La cantidad de agente de unión a DPPIV/Seprasa se mide y se usa en la evaluación del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón. Como apreciará el experto en la técnica existen numerosos métodos para medir la cantidad del agente de unión específico a DPPIV/Seprasa, todos ellos descritos con detalle en libros de texto relevantes (véase, por ejemplo, Tijssen, P., citado anteriormente, o Diamandis, E.P., y Christopoulos, T.K. (eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

Preferentemente, la DPPIV/Seprasa se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich (= inmunoensayo sándwich). En dicho inmunoensayo sándwich, por un lado se usa un primer agente de unión específico unido a un soporte sólido para capturar la DPPIV/Seprasa y por otro lado, se usa un segundo agente de unión específico, que está marcado para ser directa o indirectamente detectable. Los agentes de unión específicos usados en un formato de ensayo de tipo sándwich pueden ser una combinación de anticuerpos específicamente dirigidos contra la DPPIV y la Seprasa, respectivamente.

También se prefiere un inmunoensayo de tipo sándwich con un anticuerpo de captura contra la DPPIV soluble y un anticuerpo de detección contra la Seprasa soluble, y viceversa.

También se prefiere un inmunoensayo de tipo sándwich con anticuerpos que se unen al complejo DPPIV/Seprasa pero no a la DPPIV soluble o a la Seprasa soluble.

En algunos entornos diagnósticos, también pueden usarse anticuerpos que solo reconocen la forma que no forma complejo de la DPPIV soluble o Seprasa soluble.

Un "marcador de cáncer" y, en particular, un "marcador de cáncer de pulmón" y un "marcador de cáncer de colon", en el sentido de la presente invención, es cualquier marcador que, si se combina con el marcador DPPIV/Seprasa, añade información relevante en la evaluación del cáncer, por ejemplo, en la evaluación del cáncer en general o en la evaluación de determinados tipos de cáncer, por ejemplo, en la evaluación de CP o CCR. La información se considera relevante o de valor aditivo para la evaluación del cáncer, si a una especificidad determinada la sensibilidad, o si a una sensibilidad determinada la especificidad, respectivamente, puede mejorarse incluyendo dicho marcador en una combinación marcadora que ya comprende el marcador DPPIV/Seprasa. En la realización de evaluación de cáncer preferida, la mejora en sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significado de  $p = 0,05, 0,02, 0,01$  o menor. Preferentemente, el uno o más marcadores tumorales distintos se seleccionan del grupo que consiste en Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA 19-9 y CA 125.

El término "muestra", como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra biológica obtenida con la finalidad de realizar una evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra es suero o plasma.

La expresión "evaluación de cáncer" y en particular "evaluación de cáncer de pulmón" o "evaluación de cáncer de colon" se usa para indicar que el método de acuerdo con la presente invención ayudará (solo o junto con otros marcadores o variables, por ejemplo, los criterios determinados por la UICC (véase anteriormente)) al médico a establecer o confirmar la ausencia o presencia de cáncer, en particular de CP o de CCR o ayudará al médico en el pronóstico, en la detección de la reaparición, (seguimiento de pacientes después de cirugía) y/o el control del tratamiento, especialmente de quimioterapia.

Como apreciará el experto en la técnica, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza *in vitro*. La muestra del paciente se desecha después de esto. La muestra del paciente se usa exclusivamente para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de nuevo al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo, sangre entera, suero o plasma.

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

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para evaluar cáncer, por ejemplo, CP o CCR, *in vitro*, mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de DPPIV/Seprasa y usar la concentración determinada en la evaluación de cáncer, por ejemplo, CP o CCR.

Los inventores de la presente invención han podido detectar sorprendentemente una disminución de la concentración del marcador DPPIV/Seprasa en un porcentaje significativo de muestras procedentes de pacientes con cáncer, en particular con cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata. Incluso, más sorprendentemente, han podido demostrar que la disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa en dicha muestra obtenida de un individuo puede usarse en la evaluación de cáncer, en particular de las enfermedades de cáncer mencionadas anteriormente.

El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un solo evento o proceso ocasionaría la enfermedad respectiva como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los otros casos, establecer un diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se comprende del todo, como ocurre en muchos tipos de cáncer, por ejemplo, en el CP. Como apreciará el experto en la técnica,

ningún marcador bioquímico es diagnóstico con especificidad del 100 % y al mismo tiempo con sensibilidad del 100 % para una enfermedad multifactorial determinada, por ejemplo para el CP. En cambio, pueden usarse marcadores bioquímicos, por ejemplo, Cyfra 21-1, ACE, EEN, o como se muestra en el presente documento, DPPIV/Seprasa, para evaluar con determinada probabilidad o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, la ausencia o la gravedad de una enfermedad. Por lo tanto, en diagnósticos clínicos rutinarios, se consideran generalmente diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos en su conjunto, en el diagnóstico, tratamiento y gestión de la enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos pueden determinarse independientemente o, en una realización preferida de la invención, pueden medirse simultáneamente usando una bio microplaca o una tecnología de matriz basada en perlas. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan después independientemente, por ejemplo, usando un límite individual para cada marcador, o se combinan para su interpretación.

En otra realización preferida, la evaluación del cáncer de acuerdo con la presente invención se realiza en un método que comprende medir en una muestra la concentración de a) DPPIV/Seprasa, b) uno o más marcadores distintos de cáncer y c) usar el resultado de la medición, por ejemplo, las concentraciones determinadas en la etapa (a) y (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer.

En la evaluación del cáncer el marcador DPPIV/Seprasa será beneficioso en uno o más de los siguientes aspectos: exploración; ayuda al diagnóstico; pronóstico; control de terapia, tal como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

Exploración:

La exploración se define como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar individuos, por ejemplo, individuos en riesgo, para indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de cáncer. Preferentemente, la población a explorar se compone de individuos que se sabe que tienen riesgo de cáncer por encima de la media. Por ejemplo, una población en la que se explora el cáncer de pulmón, se compone de individuos, como fumadores, exfumadores y trabajadores expuestos a uranio, cuarzo o amianto, que se sabe que tienen un riesgo de cáncer de pulmón por encima de la media.

Como muestra en la exploración del cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón o colorrectal, se usa plasma o suero

Para muchas enfermedades, ningún solo marcador bioquímico en la circulación cumplirá con los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para los fines de la exploración. Esto parece ser cierto para el cáncer y en particular para el cáncer de pulmón. Se esperaba que un panel de marcadores que comprendiese una pluralidad de marcadores tuviese que usarse en la exploración del cáncer. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador DPPIV/Seprasa formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado para fines de exploración. La presente invención por lo tanto se refiere al uso de DPPIV/Seprasa como un marcador de un panel de marcadores de cáncer, es decir, un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores adicionales para fines de exploración del cáncer. En particular, la presente invención se refiere al uso de DPPIV/Seprasa como un marcador de un panel de marcadores de cáncer general. Dicho panel de marcadores comprende el marcador DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores adicionales, por ejemplo, marcadores generales de cáncer y/o marcadores para el tipo de cáncer mencionado anteriormente.

Probablemente la DPPIV/Seprasa también contribuye en paneles marcadores para determinados tipos específicos de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata.

Otros tipos preferidos de cáncer a evaluar con un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa son cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello o páncreas.

Otros tipos preferidos de cáncer a evaluar con un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa son cáncer de pulmón (CP) o cáncer de colon (CCR).

Un tipo de cáncer preferido a evaluar con un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa es CCR.

Un tipo preferido de cáncer a evaluar con un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa es CP.

Estos datos también indican que determinadas combinaciones de marcadores serán ventajosas en la exploración del cáncer.

Por ejemplo, con referencia a la realización de exploración del cáncer, la presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa y uno más marcadores tumorales distintos seleccionados del grupo que consiste en Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA 19-9 y CA 125.

Por ejemplo, con referencia a la realización de exploración de CCR, la presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores tumorales distintos seleccionados del grupo que consiste en Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CA19-9 y CA125.

5 Por ejemplo, con referencia a la realización de exploración de CP, la presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores tumorales distintos seleccionados del grupo que consiste en CYBP, NNMT, PSE3, ASC, OPN, Seprasa, S100A12, EEN, Cyfra 21-1, ACE, CA 19-9 y CA 125.

10 Asistencia al diagnóstico:

Los marcadores pueden dar asistencia al diagnóstico diferencial de enfermedad benigna frente a maligna en un órgano particular, ayudar a diferenciar entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o establecer valores marcadores iniciales antes de la cirugía.

15 En una realización preferida el marcador DPPIV/Seprasa se usa en un método inmunohistoquímico para establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de cáncer.

20 Dado que el marcador DPPIV/Seprasa, como único marcador, puede ser superior a otros marcadores, por ejemplo, en el caso de CP con respecto a otros marcadores tales como el ACE o la EEN, se esperaba que DPPIV/Seprasa se usase como una asistencia al diagnóstico, especialmente estableciendo un valor inicial antes de la cirugía. La presente invención por tanto también se refiere al uso de DPPIV/Seprasa para establecer un valor inicial antes de la cirugía para el cáncer.

25 Pronóstico:

Los indicadores de pronóstico pueden definirse como aspectos clínicos, patológicos o bioquímicos de pacientes con cáncer y sus tumores que predicen con una determinada probabilidad el desenlace de la enfermedad. Su uso principal es ayudar a gestionar razonablemente el programa del paciente, es decir, impedir el infratratamiento de la enfermedad agresiva o el sobretatamiento de la enfermedad indolente, respectivamente. Molina, R. et al., Tumor Biol. 24 (2003) 209-218 evaluaron el valor pronóstico del ACE, CA 125, Cyfra 21-1, SSC y EEN en el CPNM. En su estudio, niveles anómalos en suero de los marcadores EEN, ACE y LDH (lactato deshidrogenasa) parecen indicar una supervivencia más corta.

35 Dado que en solitario la DPPIV/Seprasa contribuye significativamente a diferenciar pacientes con cáncer, por ejemplo, pacientes con CP o CCR, de controles sanos, debe esperarse que ayudará a evaluar el pronóstico de pacientes que padecen cáncer, preferentemente CP o CCR. El nivel de DPPIV/Seprasa preoperatorio se combinará más probablemente con uno o más marcadores distintos para el cáncer y/o el sistema de estadificación TNM. En una realización preferida, se usa DPPIV Seprasa en el pronóstico de pacientes con CP o CCR.

Control de terapia:

45 Merle, P. et al., Int. J. of Biological Markers 19 (2004) 310-315 han evaluado variaciones de niveles en suero de Cyfra 21-1 en pacientes con CPNM localmente avanzado tratados con quimioterapia de inducción. Los investigadores llegaron a la conclusión de que el control precoz de niveles en suero de CYFRA 21-1 puede ser una herramienta pronóstica útil para la respuesta y supervivencia tumoral en pacientes con CPNM de fase III. Además, se han descrito informes acerca del uso del ACE en el control del tratamiento de pacientes con CP (Fukasawa, T. et al., Gan to Kagku Ryoho 13 (1986) 1862-1867). La mayoría de estos estudios fueron retrospectivos, no aleatorizados y contenían pocos pacientes. Como en el caso de los estudios con Cyfra 21-1, los estudios con ACE sugieren: a) que los pacientes con una disminución en cuanto a niveles de ACE que reciben generalmente al mismo tiempo quimioterapia tienen un mejor resultado que aquellos pacientes cuyos niveles de ACE no disminuyen y b) para casi todos los pacientes, los aumentos en los niveles de CEA se asociaron con progresión de la enfermedad.

55 Se espera que DPPIV/Seprasa sea al menos tan buen marcador para controlar la quimioterapia como lo es Cyfra 21-1 o ACE, respectivamente. La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de DPPIV/Seprasa en el control de pacientes con cáncer y preferentemente de pacientes con CP o CCR con terapia.

60 En el control de terapia, en una realización preferida, las mediciones de DPPIV/Seprasa y de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en CYBP, NNMT, PSE3, ASC, OPN, Seprasa, S100A12, EEN, ACE, Cyfra 21-1, CA 19-9 y CA 125 se combinarán y se usarán en la valoración del CP.

65 En el control de terapia, en una realización preferida, las mediciones de DPPIV/Seprasa y de al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en CEA, Cyfra 21-1, Ferritina, OPN, autoanticuerpos anti-p53, NNMT, PSE3, S100A12, CA 19-9 y CA 125 se combinarán y se usarán en la evaluación del CCR.

## Seguimiento:

Una gran parte de pacientes con CP que se someten a resección quirúrgica con el fin de extirpar por completo tejido canceroso desarrollan más tarde enfermedad recurrente o metastásica (Wagner, H. Jr., Chest 117 (2000) 110S-118S; Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). La mayoría de estas recaídas se producen a los primeros 2-3 años después de la cirugía. Dado que la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente mortal si se detecta demasiado tarde, se ha prestado especial atención a investigar sobre la reincidencia del cáncer en una fase temprana y por tanto posiblemente tratable.

Por consiguiente, muchos pacientes con cáncer, por ejemplo, pacientes con CP, se someten a un programa de supervivencia postoperatorio, que incluye frecuentemente el control regular con ACE. Se ha demostrado que el control en serie con ACE un año después de realizar la resección quirúrgica, detecta una enfermedad recurrente/metastásica postoperatoria precoz 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 (2003) 973-980). Por tanto, el seguimiento de pacientes con CP después de cirugía es uno de los campos de uso más importantes para un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad de DPPIV/Seprasa en los pacientes con CP investigados, es probable que la DPPIV/Seprasa en solitario o en combinación con uno o más marcadores distintos sea de gran ayuda en el seguimiento de pacientes con CP, especialmente en pacientes con CP después de cirugía. El uso de un panel de marcadores que comprenda DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores distintos de CP en el seguimiento de pacientes con CP representa una realización adicional preferida de la presente invención.

En una realización preferida, la presente invención se refiere al uso de DPPIV/Seprasa en el campo diagnóstico de cáncer. Preferentemente la DPPIV/Seprasa se usa en la evaluación de cáncer de pulmón (CP), colon (CCR), esófago, cabeza y cuello, estómago, conducto biliar, páncreas, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata, respectivamente.

En una realización adicional preferida, la presente invención se refiere al uso de DPPIV/Seprasa como una molécula marcadora para el cáncer, por ejemplo, para cáncer en general o para tipos específicos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio o próstata, en combinación con una o más moléculas marcadoras adicionales para el cáncer. Las moléculas marcadoras adicionales pueden ser moléculas marcadoras generales no específicas de tipos de cáncer y/o moléculas marcadoras específicas de tipos de cáncer, por ejemplo, moléculas marcadoras para CP o CCR. La DPPIV/Seprasa y el al menos un marcador adicional se usan en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP o CCR, en una muestra líquida obtenida de un individuo. Otros marcadores de cáncer seleccionados preferidos con los que puede combinarse la medición de DPPIV/Seprasa son Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA19-9 y CA125. En particular, se prefiere seleccionar marcadores de CP o CCR distintos con los que la medición de DPPIV/Seprasa puede combinarse que son Cyfra 21-1, ACE y/o EEN. Incluso se prefiere también que el panel de marcadores usado en la evaluación del cáncer, por ejemplo CP, comprenda DPPIV/Seprasa y al menos una molécula marcadora distinta seleccionada del grupo que consiste en Cyfra 21-1 y ACE.

Como apreciará el experto en la técnica existen muchas maneras de usar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la cuestión diagnóstica que se está investigando. En una estrategia bastante simple, pero de ningún modo a menudo eficaz, se supone un resultado positivo si una muestra es positiva para al menos uno de los marcadores investigados. Esto puede ser el caso de, por ejemplo, cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como SIDA.

Sin embargo, frecuentemente, la combinación de marcadores se evalúa. Preferentemente los valores medidos para marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo, para DPPIV/Seprasa y Cyfra 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores de los marcadores pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado utilizado en la técnica. Los métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcador con una enfermedad emplean métodos como, análisis discriminativos (AD) (es decir, AD lineales, cuadráticos, regularizados), Métodos de Kernel (es decir SVM), Métodos no Paramétricos (es decir, Clasificadores k vecinos más cercanos), PLS (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos basados en Árbol (es decir Regresión Logística, CART, Métodos de poblaciones de árboles al azar, Métodos de Refuerzo/Remuestreo), Métodos Lineales Generalizados (es decir Regresión Logística), Métodos basados en componentes principales (es decir SIMCA), Modelos Aditivos Generalizados, Métodos basados en Lógica difusa, Redes Neuronales y Métodos basados en Algoritmos Genéticos. El experto en la técnica no tendrá problemas al seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente, el método usado en correlación con la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo, en ausencia o presencia de CP se selecciona de AD (Análisis Discriminativos lineales, cuadráticos, regularizados), Métodos de Kernel (es decir SVM), Métodos no Paramétricos (es decir, Clasificadores k vecinos más cercanos), PLS (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos basados en Árbol (es decir Regresión Logística, CART, Métodos de poblaciones de árboles al azar, Métodos de Refuerzo), o modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relacionados con estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes

referencias: Ruczinski, I. et al, J. of Computational y Graphical Statistics, 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, T. et al., The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics (2001); Breiman, L. et al., Classification y regression trees, California: Wadsworth (1984); Breiman, L., Random Forests, Machine Learning 45 (2001) 5-32; Pepe, M.S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series 28 (2003); y Duda, R.O. et al., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2ª edición (2001).

Es una realización preferida de la invención usar un límite multivariado optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo, el enfermo del sano. En este tipo de análisis los marcadores ya no son independientes sino que forman un panel de marcadores.

La precisión de un método diagnóstico se describe mejor por sus características de los datos recibidos (ROC, por sus siglas en inglés *Receiver Operating Characteristic*; véase especialmente Zweig, M.H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es una representación de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión sobre todo el intervalo de los datos observados.

El comportamiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o de la capacidad para clasificar correctamente a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la capacidad del ensayo para diferenciar 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, la representación ROC representa el solapamiento entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y está la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de resultados de ensayo positivos verdaderos + número de resultados de ensayo negativos falsos)]. Esto también se ha referido a una positividad en la presencia de una enfermedad o afección. Se calcula exclusivamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x está la fracción de positivos falsos, o 1 - especificidad [definida como (número de resultados positivos falsos)/(número de resultados negativos verdaderos + número de resultados positivos falsos)]. Se trata de un índice de especificidad y se calcula íntegramente a partir del subgrupo no afectado. Dado que las fracciones positivas verdaderas y falsas se calculan íntegramente por separado, usando los resultados del ensayo de dos subgrupos diferentes, la representación ROC es independiente de la frecuencia de enfermedad en la muestra. Cada punto de la representación ROC representa un par de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (no solapa en las dos distribuciones de resultados) tiene una representación ROC que atraviesa el ángulo superior izquierdo, donde la fracción de positivos verdaderos es de 1,0 o 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción de positivos falsos es 0 (especificidad perfecta). La representación teórica para un ensayo sin discriminación (distribuciones de resultados idénticas para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde el ángulo inferior izquierda al ángulo superior derecho. La mayoría de las representaciones se encuentran entre estos dos extremos. (Si la gráfica ROC se encuentra completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se subsana fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que" o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cerca esté la representación del ángulo superior izquierdo, mayor la precisión global del ensayo.

Una forma preferida para cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su comportamiento mediante un solo número. Dicho parámetro global se denomina, por ejemplo, "error total" o como alternativa el "área bajo la curva = ABC". La medida global más común es el área bajo la curva de la representación ROC. Por convención, este área siempre es  $> 0,5$  (si no lo es, puede invertirse la norma de decisión para hacer que lo sea). Los valores varían entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia distribucional aparente entre los dos grupos de los valores de ensayo). El área no solo depende de una parte particular de la representación, tal como del punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90 % de especificidad, sino de toda la representación. Esta es una expresión descriptiva, cuantitativa de cómo de cerca está la representación ROC a la perfecta (área = 1,0).

Combinando las mediciones de DPPIV/Seprasa con otros marcadores, como Cyfra 21-1 o ACE, o con otros marcadores de cáncer aún por descubrir, DPPIV/Seprasa conduce y conducirá, respectivamente, a mejoras adicionales en la evaluación del cáncer.

En una realización adicional preferida, la presente invención se refiere a un método para mejorar la precisión diagnóstica del cáncer, por ejemplo, CP o CCR frente a controles sanos, midiendo en una muestra la concentración de al menos DPPIV/Seprasa y uno o más marcadores tumorales distintos seleccionados del grupo que consiste en Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA19-9 y CA125, respectivamente y correlacionando las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo, CP o CCR, clasificándose correctamente la mejora resultante en más pacientes como que padecen cáncer, por ejemplo, CP o CCR frente a controles sanos en comparación con una clasificación basada en un solo marcador investigado en solitario.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a un método para mejorar la precisión diagnóstica para el cáncer, por ejemplo, CP o CCR frente a controles sanos midiendo en una muestra la concentración de al menos DPPIV/Seprasa y Cyfra 21-1, y opcionalmente de ACE y/o EEN, respectivamente y correlacionando las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo, CP o CCR, clasificándose correctamente la mejora resultante en más pacientes como que padecen cáncer, por ejemplo, CP o CCR frente a controles sanos en comparación con una clasificación basada en un solo marcador investigado en solitario.

Los siguientes ejemplos, el listado de secuencias y las figuras se proporcionan para ayudar a entender la presente invención, cuyo verdadero alcance se expone en las reivindicaciones adjuntas.

#### Descripción de las Figuras

La Figura 1 muestra la distribución de valores de concentración en suero de DPPIV/Seprasa en pacientes con cáncer colorrectal (CCR) y pacientes control sanos.  
 La Figura 2 muestra la curva ROC del ensayo con DPPIV/Seprasa de las cohortes de pacientes con CCR y controles sanos.  
 La Figura 3 muestra la distribución de valores de DPPIV/Seprasa en las cohortes de pacientes con CP, cáncer de cabeza y cuello y cáncer pancreático y controles sanos.  
 La Figura 4 muestra la curva ROC del ensayo con DPPIV/Seprasa de las cohortes de pacientes con CP y controles sanos.  
 La Figura 5 muestra la curva ROC del ensayo con DPPIV/Seprasa de las cohortes de pacientes con cáncer de cabeza y cuello y controles sanos.  
 La Figura 6 muestra la curva ROC del ensayo con DPPIV/Seprasa de las cohortes de pacientes con cáncer pancreático y controles sanos.

#### Descripción de las secuencias

La SEC ID Nº: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína Seprasa humana (Isoforma 1); número de registro Q12884 de la base de datos SwissProt.  
 La SEC ID Nº: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana; número de registro P27487 de la base de datos SwissProt.  
 La SEC ID Nº: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana soluble; posición 29 a 766 del número de registro P27487 de la base de datos SwissProt.  
 La SEC ID Nº: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína Seprasa humana soluble; posición 26 a 760 del número de registro Q12884 de la base de datos SwissProt.

#### Ejemplo 1

Los anticuerpos anti-DPPIV y anti-Seprasa monoclonales de rata (clones E26 y D28, respectivamente) se adquirieron en Vitatex Inc. (Stony Brook, NY, USA). Los anticuerpos se describieron anteriormente por Gherzi, G. et al. (J. Biol. Chem. 277 (2002) 29.231-29.241) y Piñeiro-Sánchez, M.-L. et al. (J. Biol. Chem. 12 (1997) 7595-7601).

#### Biotinilación de IgG de rata monoclonal

La IgG de rata monoclonal (clon E26) se llevó a 10 mg/ml en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de biotina N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se realizó la cromatografía de la muestra en Superdex 200 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG biotinada.

#### Digoxigenilación de IgG de rata monoclonal

La IgG de rata monoclonal (clon D28) se llevó a 10 mg/ml en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 10 mM, NaCl 30 mM, pH 7,5. Por ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonyl-ε-aminocaproico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, Cat. No. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 min a temperatura ambiente, se realizó la cromatografía de la muestra en Superdex® 200 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG digoxigenilada.

#### Ejemplo 2

#### ELISA para la medición de DPPIV/Seprasa en muestras de plasma y suero humano

Para la detección de DPPIV/Seprasa en suero o plasma humano, se desarrolló un ELISA sándwich. Para la captura y detección del antígeno, alícuotas de los anticuerpos monoclonales anti-DPPIV E26 y anticuerpos monoclonales anti-Seprasa D28 (véase el Ejemplo 1) se conjugaron con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Las muestras (20 µl) se mezclaron en pocillos distintos de una placa de microtitulación cubierta con estreptavidina con 100 µl de reactivo de anticuerpo que contenía 0,12 µg/ml de cada uno de los anticuerpos E26-biotina y D28-digoxigenina en tampón de incubación (fosfato 40 mM, tartrato sódico 200 mM, EDTA 10 mM, fenol al 0,05 %, polietilenglicol 40000 al 0,1 %, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 0,2 %, IgG bovina al 0,1 %, 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano al 0,02 % ajustado a pH 7,4, complementado con fragmentos poliméricos Fab de IgG monoclonal de ratón 200 µg/ml para la eliminación de la respuesta de anticuerpos humanos anti-rata (HARA); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo N° 11096478-001).

Después de la incubación durante una hora, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0,05 %).

En una etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 30 mU/ml de conjugado anti-digoxigenina-HRP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo N°1633716) en Tampón Conjugado Universal (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo N° 11684825) durante 60 min y se lavó como se ha indicado anteriormente.

Después, los pocillos se incubaron durante 30 min con 100 µl de solución sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catálogo N° 12034425). La adición de ácido sulfúrico 2N (50 µl) detuvo el revelado del color y cambió el color azul a amarillo. Se midió la DO a 450 nm con un lector ELISA.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras de suero o plasma humano se pre-diluyeron con tampón de incubación al 5 %. Para la calibración, se usó suero humano como patrón. Este se diluyó con tampón de incubación al 2/4/8/16/32 % para preparar calibradores con valores arbitrariamente proporcionados a 2/4/8/16/32 Unidades/ml, respectivamente.

La ecuación de la curva de calibración se calculó por ajuste de curva no lineal de mínimos cuadrados (Wiemer-Rodbard) y se usó para convertir la lectura de la absorbancia de un pocillo en el valor de concentración correspondiente. El resultado se multiplicó por el factor de pre-dilución para conseguir la concentración de la propia muestra respectiva.

Ejemplo 3

Población de estudio de CCR

En un primer estudio, se han usado muestras procedentes de 48 pacientes con cáncer colorrectal bien caracterizado (clasificación UICC proporcionada en la Tabla 1).

Tabla 1

Fase de acuerdo con la UICC	Número de muestras
UICC I	6
UICC II	14
UICC III	13
UICC IV	6
sin estadificación	9
número total de muestras de CCR	48

Las muestras de la Tabla 1 se habían evaluado en comparación con muestras control obtenidas de 50 individuos obviamente sanos sin ninguna enfermedad tumoral conocida (= cohorte control).

Ejemplo 4

El complejo DPPIV/Seprasa discrimina pacientes con cáncer de controles sanos

La concentración en suero de DPPIV/Seprasa difiere notablemente entre pacientes con CCR y controles sanos (Figuras 1 y 2).

La concentración media de las cohortes de pacientes con CCR es significativamente más baja que la de las cohortes control: 51,6 U/ml en pacientes frente a 85,8 U/ml en controles. Con un valor de límite que produce una especificidad del 95 % sobre la cohorte control respectiva, la sensibilidad del cáncer colorrectal es del 75 %.

La sensibilidad es similar en todas las fases del cáncer (Tabla 2). Por lo tanto, la concentración de DPPIV/Seprasa en suero/plasma puede usarse como un indicador precoz de enfermedad.

Tabla 2

Estudio de CCR: sensibilidad dependiendo de la clasificación de la UICC			
Fase de acuerdo con la UICC	Número de muestras	Número de positivos	% de positivos
UICC I	6	5	83
UICC II	14	12	86
UICC III	13	8	61,5
UICC IV	6	5	83
sin estadificación	9	5	55
número total de muestras de CCR	48		

5

Ejemplo 5

Población de estudio de CP

10 Un segundo estudio totalmente independiente del primero se centró en cáncer de pulmón (exactamente cáncer de pulmón no microcítico: CPNM), cáncer de cabeza y cuello y cáncer pancreático. Para el CPNM, se investigaron pacientes que padecían dos tipos principales de este, el adenocarcinoma y el carcinoma de células escamosas. La Tabla 3 describe el tipo y la distribución de fases de la cohorte con cáncer de pulmón.

15

Tabla 3

Tipo y estadificación de muestras de CP		
Tipo de Cáncer	Número de muestras	
	UICC I o II	UICC III o IV
Adenocarcinoma	12	17
Carcinoma de células escamosas	12	18
número total de muestras de muestras de CPNM	57	

20 La cohorte control en este estudio se definió especialmente para comprender muestras de fumadores y no fumadores, como se describe en la Tabla 4. Se realizó un ensayo de espirometría de función pulmonar (Miller, MR et al., Eur. Respir. J. 26 (2005) 319-338) con cada individuo. Las muestras se incluyeron en la cohorte control solamente si el resultado del donante estaba dentro del intervalo normal. Para la evaluación de las sensibilidades de ensayo de DPPIV/Seprasa para cánceres de cabeza y cuello y pancreático, se aplicó la misma cohorte control.

Tabla 4

Composición de la cohorte control	
Individuos	Número de muestras
Fumadores	30
Exfumadores	5
No fumadores	25
No especificado	7

25 Ejemplo 6

La DPPIV/Seprasa discrimina pacientes con CP de controles sanos

30 La concentración en suero de DPPIV/Seprasa difiere notablemente entre pacientes con CP y controles sanos (Fig. 3). La concentración media de las cohortes de pacientes con cáncer es significativamente menor que la de las

cohortes control: 35 U/ml en pacientes frente a 75 U/ml en controles. Con un valor de límite que produce una especificidad del 95 % sobre la cohorte control respectiva, la sensibilidad del cáncer de pulmón es del 77 %.

5 La sensibilidad es similar en todas las fases del cáncer de pulmón, aunque que la sensibilidad para el carcinoma de células escamosas es mayor que para el adenocarcinoma (Tabla 5).

Tabla 5

Estudio de CP: sensibilidad dependiendo del tipo y estadificación			
Fase y tipo de CP	Número de muestras	Número de positivos	% de positivos
UICC I y II	24	18	75
UICC III y IV	33	26	79
Adenocarcinoma	29	21	72
Carcinoma de células escamosas	28	23	82
Total de muestras de CP	57	44	77

Ejemplo 7

10

Población de estudio de cáncer de cabeza y cuello

15 En este estudio se han usado muestras procedentes de 29 pacientes con cáncer de cabeza y cuello bien caracterizado (Clasificación UICC proporcionada en la Tabla 6). Las muestras se han evaluado en comparación con muestras control obtenidas de 67 individuos obviamente sanos sin ninguna enfermedad tumoral conocida (= cohorte control). Para la evaluación de las sensibilidades de ensayo de DPPIV/Seprasa para CP y cáncer pancreático, se aplicó la misma cohorte control.

20

Tabla 6

Tipo y estadificación de muestras de cáncer de cabeza y cuello	
Fase de acuerdo con la UICC	Número de muestras
UICC I	2
UICC II	2
UICC III	2
UICC IV	21
sin estadificación	2
muestras totales de cáncer de cabeza y cuello	29

Ejemplo 8

25

La DPPIV/Seprasa discrimina pacientes con cáncer de cabeza y cuello de controles sanos

30 La concentración en suero de DPPIV/Seprasa difiere entre pacientes con cáncer de cabeza y cuello y controles sanos (Figura 3). La concentración media de la cohortes de pacientes con cáncer cabeza y cuello es significativamente menor que la de las cohortes control: 44 U/ml en pacientes frente a 75 U/ml en controles. Con un valor de límite que produce una especificidad del 95 % sobre la cohorte control respectiva, la sensibilidad del cáncer de cabeza y cuello es del 59 %.

Ejemplo 9

35

Población de estudio de cáncer de pancreático

40 En este estudio se han evaluado muestras procedentes de 44 pacientes con cáncer pancreático bien caracterizado en comparación con la cohorte de control. Para la evaluación de las sensibilidades de ensayo de DPPIV/Seprasa para CP y cáncer de cabeza y cuello, se aplicó la misma cohorte control. La Tabla 7 describe el tipo y la distribución de fases de la cohorte de cáncer pancreático.

Tabla 7

Tipo y estadificación de muestras de cáncer pancreático	
Fase de acuerdo con la UICC	Número de muestras
UICC I	0
UICC II	24
UICC III	5
UICC IV	13
sin estadificación	2
muestras totales de cáncer pancreático	44

Ejemplo 10

5 El complejo DPPIV/Seprasa discrimina pacientes con cáncer Pancreático de controles sanos

La concentración en suero de DPPIV/Seprasa difiere notablemente entre pacientes con cáncer pancreático y controles sanos (Fig. 3). La concentración media de las cohortes de pacientes con cáncer pancreático es significativamente más baja que la de las cohortes control: 41 U/ml en pacientes frente a 75 U/ml en controles. Con un valor de límite que produce una especificidad del 95 % sobre la cohorte control respectiva, la sensibilidad del cáncer pancreático es del 59 %.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Roche Diagnostics GmbH F. Hoffmann-La Roche AG
- <120> Uso de DPPIV/Seprasa como un marcador para el cáncer
- <130> 26090 WO
- 20 <150> EP09006097
- <151> 04-05-2009
- <160> 4
- 25 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 760
- 30 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 533 428 T3

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val  
1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His  
20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu  
35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly  
50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn  
65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys  
85 90 95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val  
100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala  
115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn  
130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser  
145 150 155 160

ES 2 533 428 T3

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro  
 165 170 175  
 Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile  
 180 185 190  
 Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Pro Thr  
 195 200 205  
 Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala  
 210 215 220  
 Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly  
 245 250 255  
 Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro  
 260 265 270  
 Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser  
 275 280 285  
 Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val  
 290 295 300  
 Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile  
 305 310 315 320  
 Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln  
 325 330 335  
 Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val  
 340 345 350  
 Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe  
 355 360 365  
 Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val  
 370 375 380  
 Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile  
 385 390 395 400  
 Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu  
 405 410 415

ES 2 533 428 T3

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr  
 420 425 430  
 Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys  
 435 440 445  
 Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu  
 450 455 460  
 Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg  
 465 470 475 480  
 Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn  
 485 490 495  
 Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu  
 500 505 510  
 Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe  
 515 520 525  
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro  
 530 535 540  
 Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr  
 545 550 555 560  
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly  
 565 570 575  
 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu  
 580 585 590  
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile  
 595 600 605  
 Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser  
 610 615 620  
 Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu  
 625 630 635 640  
 Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr  
 645 650 655  
 Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp  
 660 665 670

ES 2 533 428 T3

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr  
 675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn  
 690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala  
 705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu  
 725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu  
 740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp  
 755 760

<210> 2  
 <211> 766  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala  
 1 5 10 15

Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr  
 20 25 30

Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr  
 35 40 45

Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser  
 50 55 60

Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn  
 65 70 75 80

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

Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln  
 100 105 110

Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr  
 115 120 125

10

ES 2 533 428 T3

Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr  
 130 135 140

Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val  
 145 150 155 160

Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile  
 165 170 175

Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp  
 180 185 190

Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Val Phe  
 195 200 205

Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala  
 210 215 220

Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe  
 225 230 235 240

Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr  
 245 250 255

Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn  
 260 265 270

Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr  
 275 280 285

Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr  
 290 295 300

Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln  
 305 310 315 320

Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg  
 325 330 335

Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly  
 340 345 350

Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly  
 355 360 365

Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile

ES 2 533 428 T3

370																			
Cys	Tyr	Phe	Gln	Ile	Asp	Lys	Lys	Asp	Cys	Thr	Phe	Ile	Thr	Lys	Gly				
385					390					395					400				
Thr	Trp	Glu	Val	Ile	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Thr	Ser	Asp	Tyr	Leu	Tyr				
				405					410					415					
Tyr	Ile	Ser	Asn	Glu	Tyr	Lys	Gly	Met	Pro	Gly	Gly	Arg	Asn	Leu	Tyr				
			420					425					430						
Lys	Ile	Gln	Leu	Ser	Asp	Tyr	Thr	Lys	Val	Thr	Cys	Leu	Ser	Cys	Glu				
		435					440					445							
Leu	Asn	Pro	Glu	Arg	Cys	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Val	Ser	Phe	Ser	Lys	Glu				
	450					455					460								
Ala	Lys	Tyr	Tyr	Gln	Leu	Arg	Cys	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Pro	Leu	Tyr				
465					470					475					480				
Thr	Leu	His	Ser	Ser	Val	Asn	Asp	Lys	Gly	Leu	Arg	Val	Leu	Glu	Asp				
				485					490					495					
Asn	Ser	Ala	Leu	Asp	Lys	Met	Leu	Gln	Asn	Val	Gln	Met	Pro	Ser	Lys				
			500					505					510						
Lys	Leu	Asp	Phe	Ile	Ile	Leu	Asn	Glu	Thr	Lys	Phe	Trp	Tyr	Gln	Met				
		515					520					525							
Ile	Leu	Pro	Pro	His	Phe	Asp	Lys	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Leu	Leu	Leu				
	530					535					540								
Asp	Val	Tyr	Ala	Gly	Pro	Cys	Ser	Gln	Lys	Ala	Asp	Thr	Val	Phe	Arg				
545					550					555					560				
Leu	Asn	Trp	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Ile	Val	Ala				
				565					570					575					
Ser	Phe	Asp	Gly	Arg	Gly	Ser	Gly	Tyr	Gln	Gly	Asp	Lys	Ile	Met	His				
			580					585					590						
Ala	Ile	Asn	Arg	Arg	Leu	Gly	Thr	Phe	Glu	Val	Glu	Asp	Gln	Ile	Glu				
		595					600					605							
Ala	Ala	Arg	Gln	Phe	Ser	Lys	Met	Gly	Phe	Val	Asp	Asn	Lys	Arg	Ile				
	610					615					620								

ES 2 533 428 T3

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu  
625 630 635 640

Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val  
645 650 655

Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly  
660 665 670

Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val  
675 680 685

Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His  
690 695 700

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser  
705 710 715 720

Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr  
725 730 735

Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr  
740 745 750

Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro  
755 760 765

<210> 3  
<211> 738  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

Asn Lys Gly Thr Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr  
1 5 10 15

Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu  
20 25 30

Arg Trp Ile Ser Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile  
35 40 45

Leu Val Phe Asn Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn  
50 55 60

Ser Thr Phe Asp Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser  
65 70 75 80

10

ES 2 533 428 T3

Pro Asp Gly Gln Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp  
 85 90 95  
 Arg His Ser Tyr Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg  
 100 105 110  
 Gln Leu Ile Thr Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr  
 115 120 125  
 Trp Ser Pro Val Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile  
 130 135 140  
 Tyr Val Lys Ile Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Glu Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu  
 165 170 175  
 Glu Glu Val Phe Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly  
 180 185 190  
 Thr Phe Leu Ala Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile  
 195 200 205  
 Glu Tyr Ser Phe Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val  
 210 215 220  
 Arg Val Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe  
 225 230 235 240  
 Phe Val Val Asn Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser  
 245 250 255  
 Ile Gln Ile Thr Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu  
 260 265 270  
 Cys Asp Val Thr Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu  
 275 280 285  
 Arg Arg Ile Gln Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu  
 290 295 300  
 Ser Ser Gly Arg Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met  
 305 310 315 320  
 Ser Thr Thr Gly Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe  
 325 330 335

ES 2 533 428 T3

Thr Leu Asp Gly Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly  
 340 345 350  
 Tyr Arg His Ile Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe  
 355 360 365  
 Ile Thr Lys Gly Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser  
 370 375 380  
 Asp Tyr Leu Tyr Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly  
 385 390 395 400  
 Arg Asn Leu Tyr Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys  
 405 410 415  
 Leu Ser Cys Glu Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser  
 420 425 430  
 Phe Ser Lys Glu Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly  
 435 440 445  
 Leu Pro Leu Tyr Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg  
 450 455 460  
 Val Leu Glu Asp Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln  
 465 470 475 480  
 Met Pro Ser Lys Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe  
 485 490 495  
 Trp Tyr Gln Met Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr  
 500 505 510  
 Pro Leu Leu Leu Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp  
 515 520 525  
 Thr Val Phe Arg Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn  
 530 535 540  
 Ile Ile Val Ala Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp  
 545 550 555 560  
 Lys Ile Met His Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu  
 565 570 575  
 Asp Gln Ile Glu Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp  
 580 585 590

ES 2 533 428 T3

Asn Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr  
 595 600 605

Ser Met Val Leu Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala  
 610 615 620

Val Ala Pro Val Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu  
 625 630 635 640

Arg Tyr Met Gly Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg  
 645 650 655

Asn Ser Thr Val Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr  
 660 665 670

Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser  
 675 680 685

Ala Gln Ile Ser Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala  
 690 695 700

Met Trp Tyr Thr Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His  
 705 710 715 720

Gln His Ile Tyr Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser  
 725 730 735

Leu Pro

<210> 4  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

Leu Arg Pro Ser Arg Val His Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala  
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe  
 20 25 30

Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp  
 35 40 45

Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile  
 50 55 60

5

10

ES 2 533 428 T3

Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu  
 65 70 75 80  
  
 Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu  
 85 90 95  
  
 Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn  
 100 105 110  
  
 Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu  
 115 120 125  
  
 Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn  
 130 135 140  
  
 Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe  
 145 150 155 160  
  
 Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr  
 165 170 175  
  
 Glu Glu Glu Met Leu Pro Thr Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn  
 180 185 190  
  
 Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val  
 195 200 205  
  
 Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn  
 210 215 220  
  
 Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe  
 225 230 235 240  
  
 Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro  
 245 250 255  
  
 Val Pro Ala Met Ile Ala Ser Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr  
 260 265 270  
  
 Trp Val Thr Asp Glu Arg Val Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln  
 275 280 285  
  
 Asn Val Ser Val Leu Ser Ile Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr  
 290 295 300  
  
 Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly



ES 2 533 428 T3

Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile  
 565 570 575

Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg  
 580 585 590

Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala  
 595 600 605

Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro  
 610 615 620

Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met  
 625 630 635 640

Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr  
 645 650 655

Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile  
 660 665 670

His Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile  
 675 680 685

Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr  
 690 695 700

Ser Asp Gln Asn His Gly Leu Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr  
 705 710 715 720

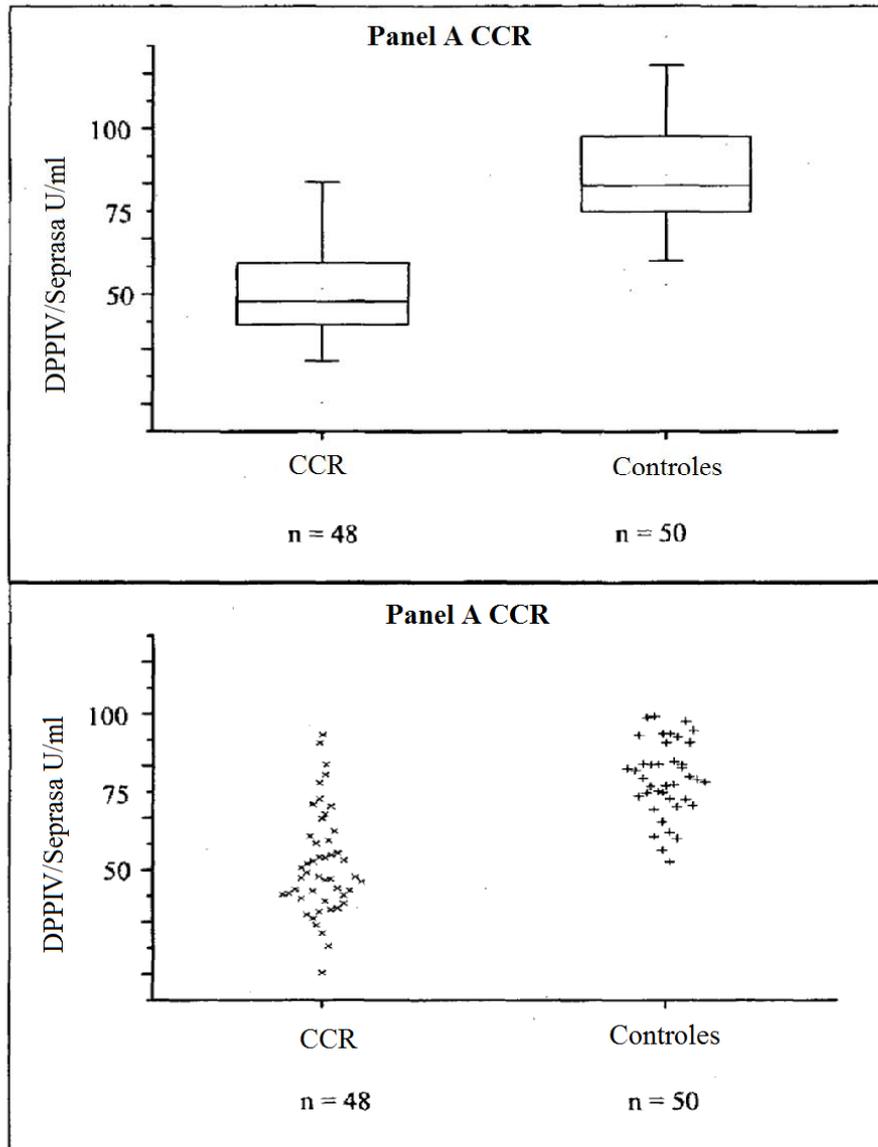
Thr His Met Thr His Phe Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp  
 725 730 735

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para la evaluación de un cáncer *in vitro* que comprende medir en una muestra de suero o de plasma la concentración de
- 10 a) un complejo soluble de dipeptidil peptidasa IV/proteína Seprasa (= DPPIV/Seprasa),  
 b) opcionalmente, uno o más marcadores distintos de cáncer, y  
 c) el uso del resultado de la medición de la etapa (a) y opcionalmente de la etapa (b) en la evaluación de un cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho método es un inmunoensayo sándwich.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado adicionalmente por que se usa un primer agente de unión específico que se une a la dipeptidil peptidasa IV soluble (= DPPIV soluble) como parte de DPPIV/Seprasa y un segundo agente de unión específico que se une a la proteína Seprasa soluble (= Seprasa) como parte de DPPIV/Seprasa, respectivamente.
- 20 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado adicionalmente por que se usa un agente de unión específico que se une al complejo DPPIV/Seprasa pero no a la DPPIV soluble o a la Seprasa soluble, respectivamente.
- 25 5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado adicionalmente por que como agente de unión de captura se usa o un primer agente de unión específico o un segundo agente de unión específico y dicho segundo agente de unión específico o dicho primer agente de unión específico se usa como agente de unión de detección, respectivamente.
- 30 6. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado adicionalmente por que el método es para evaluar cánceres tales como como cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio y próstata.
- 35 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado adicionalmente por que dicho uno o más marcadores distintos de la etapa (b) se selecciona del grupo constituido por Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA19-9 y CA125.
- 40 8. El uso de DPPIV/Seprasa en la evaluación de un cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer y en el que la DPPIV/Seprasa se detecta en una muestra de suero o de plasma.
- 45 9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8 en la evaluación de un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio y próstata.
- 50 10. El uso de un panel de marcadores que comprende la DPPIV/Seprasa y opcionalmente uno o más marcadores distintos para cáncer en la evaluación de un cáncer, en el que una disminución de la concentración de DPPIV/Seprasa es indicativa de cáncer y en el que la DPPIV/Seprasa se detecta en una muestra de suero o de plasma.
- 55 11. El uso de un panel de marcadores de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizado adicionalmente por que opcionalmente uno o más marcadores distintos se seleccionan del grupo constituido por Cyfra 21-1, ACE, FERR, OPN, autoanticuerpos anti-p53, Seprasa, NNMT, PSE3, S100A12, CYBP, ASC, EEN, CA19-9 y CA125.
12. El uso del panel de marcadores de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, en la evaluación de cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, páncreas, esófago, estómago, conducto biliar, riñón, cuello uterino, ovario, mama, vejiga urinaria, endometrio y próstata.

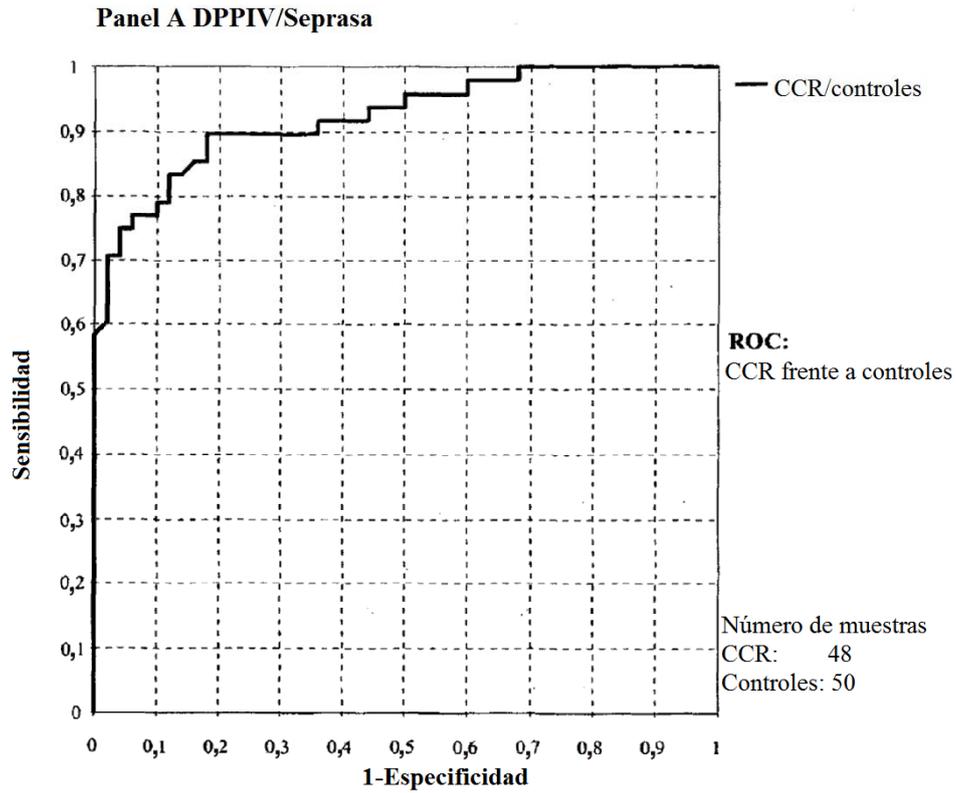
**Fig. 1**

**Distribución de los valores de DPPIV/Seprasa en las cohortes de pacientes con CCR y controles sanos**



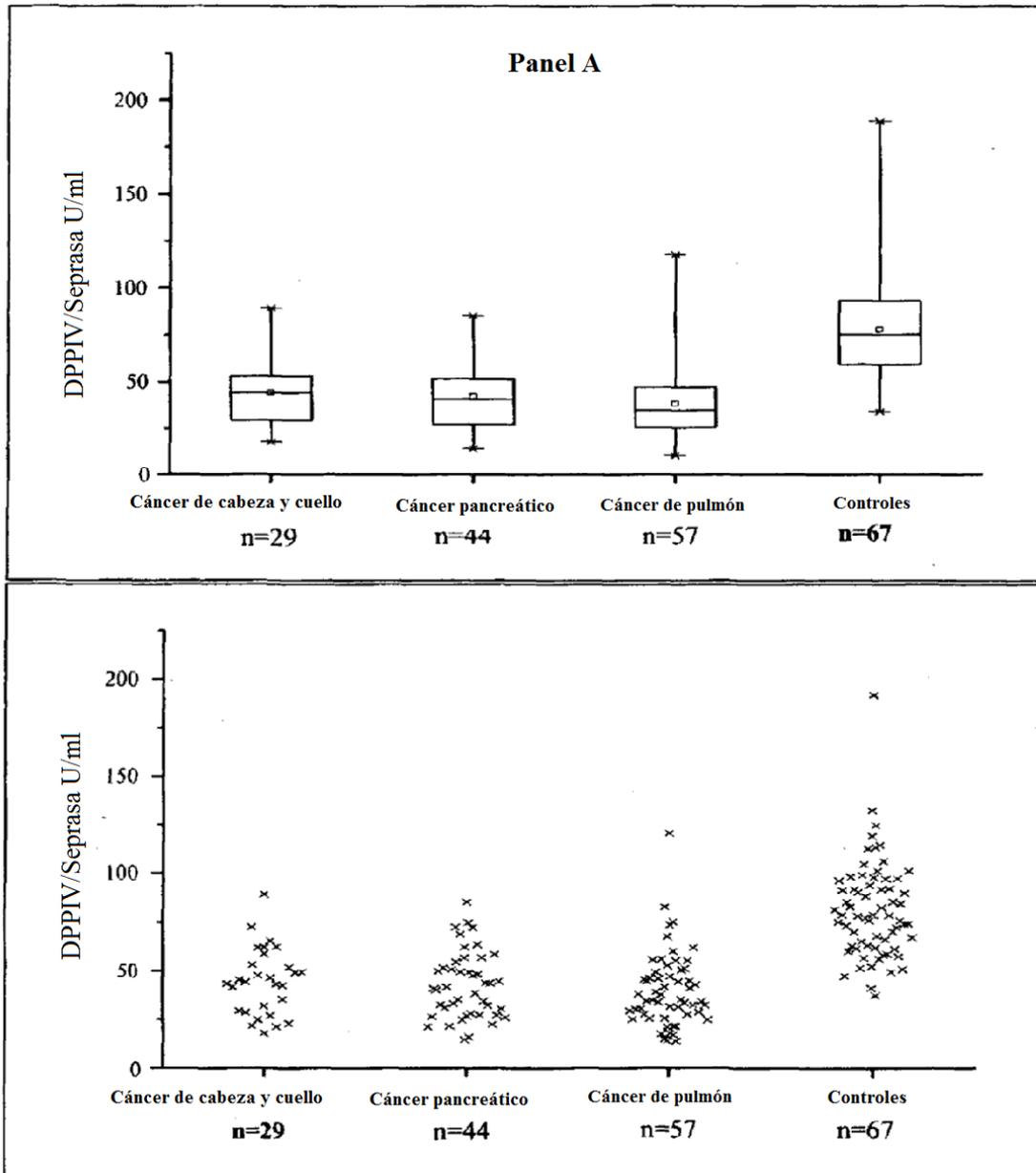
**Fig. 2**

Curva ROC del ensayo con DPPIV/Seprasa de las cohortes de pacientes con CCR y controles sanos

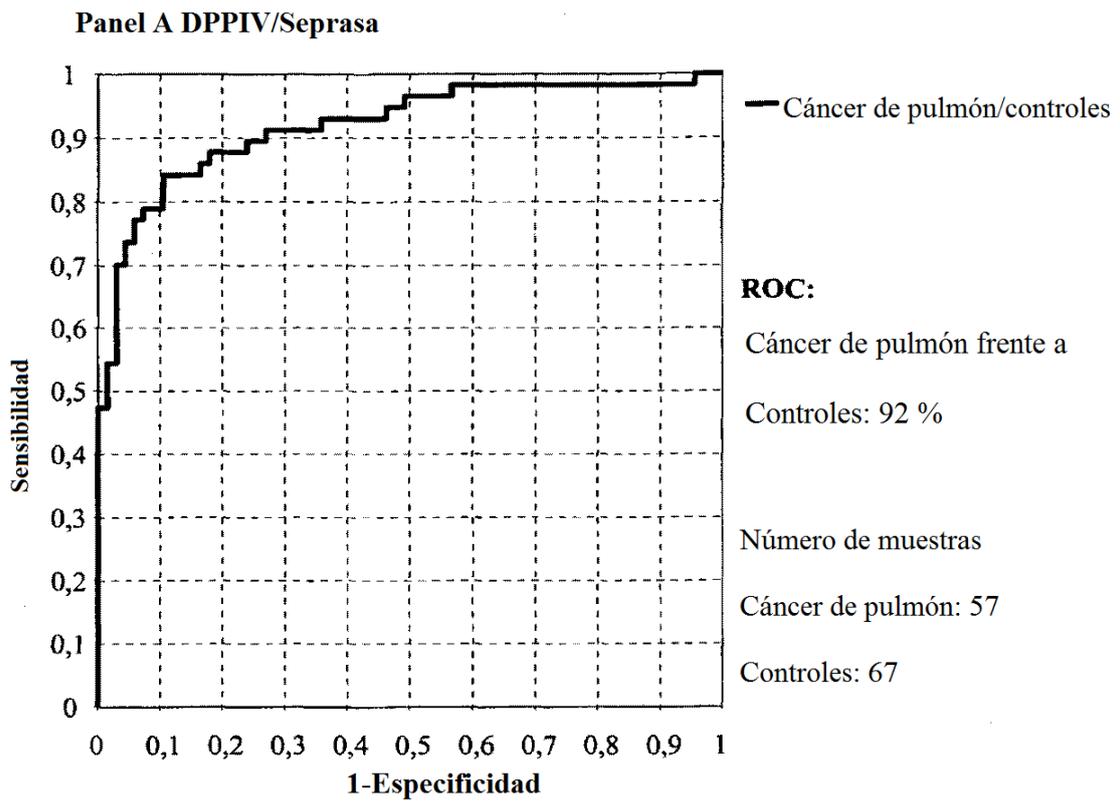


**Fig. 3**

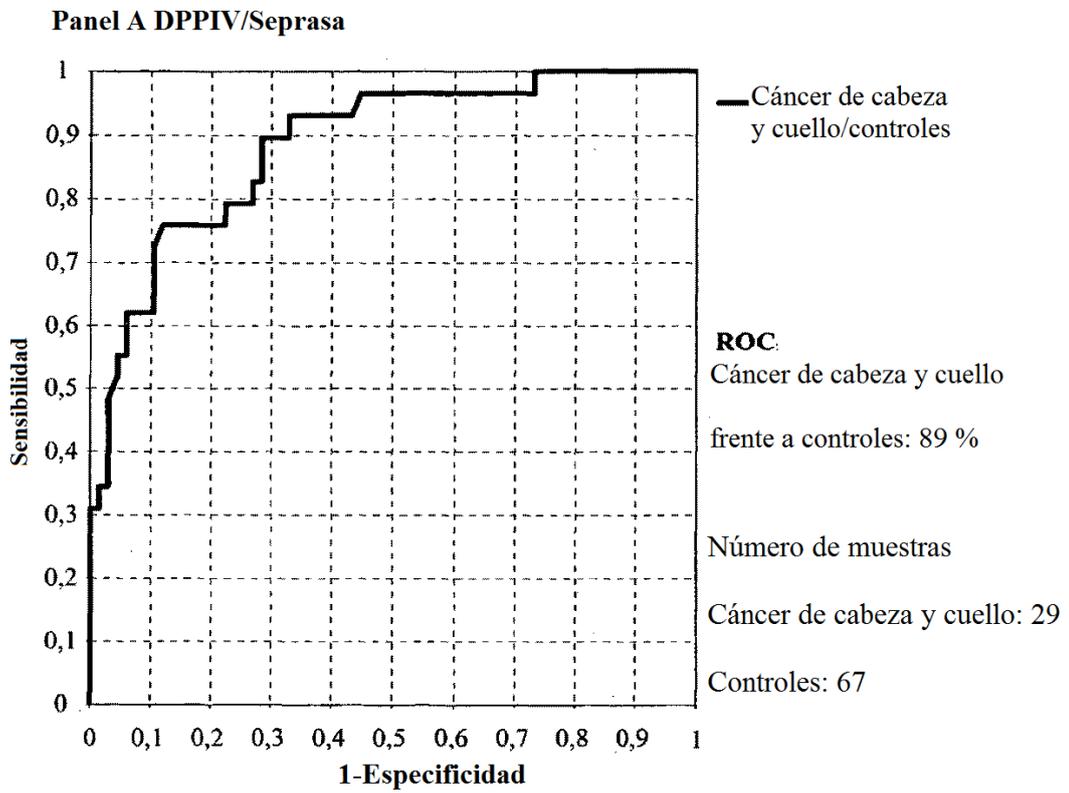
**1) Distribución de los valores de DPPIV/Seprasa en las cohortes de pacientes con CP, cáncer de cabeza y cuello y pancreático y controles sanos**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

