

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 254**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.09.2009 PCT/GB2009/002098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.03.2010 WO10023458**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.09.2009 E 09785026 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2016 EP 2329042**

54 Título: **Método de diagnóstico o de pronóstico de cáncer epitelial de ovario**

30 Prioridad:

**01.09.2008 GB 0815846**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.03.2017**

73 Titular/es:

**IMMUNOVIA AB (100.0%)**

**Medicon Village**

**223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**BORREBAECK, CARL, ARNE, KRISTER;  
EK, SARA, CHARLOTTE, ANDERSSON y  
BRENNAN, DONAL, JOHN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 605 254 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

Método de diagnóstico o de pronóstico de cáncer epitelial de ovario

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a novedosos agentes para el diagnóstico, el pronóstico y la obtención de imágenes de cáncer epitelial de ovario (CEV), y uso de los mismos.

10 **Introducción**

El cáncer epitelial de ovario (CEV) es la causa más frecuente de muerte de tumor maligno ginecológico y la quinta causa más común de muerte relacionada con el cáncer en mujeres. Se estima que en el 2008 se diagnosticarán 21.650 nuevos casos de cáncer de ovario en los Estados Unidos y que 15.520 sucumbirán a la enfermedad (Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians 2008;58:71-96). La mala relación de la supervivencia con respecto a la incidencia en CEV está relacionada con el alto porcentaje de casos que son diagnosticados en una etapa avanzada y la falta de terapias eficaces para enfermedad avanzada resistente al tratamiento. A pesar de las mejoras en las técnicas quirúrgicas y la aparición de agentes terapéuticos más dirigidos tales como bevacizumab, la supervivencia de pacientes con CEV es del 45 % a los cinco años (Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA: a cancer journal for clinicians 2008;58:71-96). Tales malas estadísticas del pronóstico indican que hay una necesidad urgente de mejorar nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares que subyacen al CEV, para desarrollar mejores ensayos de pronóstico y predictivos e identificar nuevas dianas terapéuticas.

El cáncer epitelial de ovario comprende tres subtipos histológicos principales; seroso, mucinoso y endometriode. El CEV seroso incluye cistomas serosos, cistoadenomas benignos serosos, cistoadenomas serosos con actividad proliferante de las células epiteliales y anomalías nucleares, pero sin crecimiento destructivo infiltrativo (tumor maligno de bajo potencial o incierto) y cistoadenocarcinomas serosos. El CEV mucinoso incluye cistomas mucinosos, cistoadenomas benignos mucinosos, cistoadenomas mucinosos con actividad proliferante de las células epiteliales y anomalías nucleares, pero sin crecimiento destructivo infiltrativo (tumor maligno de bajo potencial o incierto) y cistoadenocarcinomas mucinosos. El CEV endometriode incluye tumores endometrioides (similares a adenocarcinomas en el endometrio), quistes benignos endometrioides, tumores endometrioides con actividad proliferante de las células epiteliales y anomalías nucleares, pero sin crecimiento destructivo infiltrativo (tumor maligno de bajo potencial maligno o incierto) y adenocarcinomas endometrioides.

También existen otros dos subtipos histológicos menos prevalentes, célula clara y no diferenciado.

Además, el CEV puede clasificarse por "etapas", que dependen de cómo de lejos se hayan extendido más allá del ovario. Así, la etapa I se define como cáncer de ovario que está confinado a uno o ambos ovarios. La etapa II se define como cáncer de ovario que se ha extendido a los órganos pélvicos (por ejemplo, útero, trompas de Falopio), pero que no se ha extendido a los órganos abdominales. La etapa III se define como cáncer de ovario que se ha extendido a los órganos abdominales o el sistema linfático (por ejemplo, ganglios linfáticos pélvicos o abdominales, en el hígado, en el intestino). Finalmente, la etapa IV se define como cáncer de ovario que se ha extendido a sitios remotos (por ejemplo, pulmón, dentro del hígado, cerebro, ganglios linfáticos en el cuello).

Los CEVs también pueden clasificarse según la aparición de las células cancerosas. Bajo grado (o grado 1) significa que las células cancerosas se parecen a las células normales del ovario; normalmente crecen lentamente y es menos probable que se extiendan. Grado moderado (o grado 2) significa que las células parecen más anormales que las células de bajo grado. Alto grado (o grado 3) significa que las células parecen muy anormales. Es probable que crezcan más rápidamente y es más probable que se extiendan.

El CEV, al igual que la mayoría de los otros cánceres, es así una enfermedad heterogénea compleja, influida y controlada por múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas que conducen a un fenotipo cada vez más agresivo (Martin L y Schilder R. Novel approaches in advancing the treatment of epithelial ovarian cancer: the role of angiogenesis inhibition. Journal of clinical oncology 2007;25:2894-901; Naora H and Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. Nature reviews 2005;5:355-66). Ahora se ha reconocido bien que las características de un tumor individual y su evolución vital resultan de múltiples mutaciones somáticas adquiridas con el tiempo (por ejemplo, TP53, PTEN, RAS) y la evolución continua de las respuestas del huésped a factores ambientales (por ejemplo, exposición a estrógenos o tabaco) (West M, Ginsburg G, Huang A, and Nevins J. Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine. Genome Res 2006;16:559-66). En ciertos casos, estas mutaciones somáticas cubren las variaciones inherentes de la línea germinal (por ejemplo, BRCA1/2) (West M, Ginsburg G, Huang A, and Nevins J. Embracing the complexity of genomic data for personalized medicine. Genome Res 2006;16:559-66; Prat J, Ribe A, and Gallardo A. Hereditary ovarian cancer. Human pathology 2005;36:861-70). Desde un punto de vista terapéutico, el CEV se considera mejor un conjunto de enfermedades inter-relacionadas complejas representadas por una inmensa heterogeneidad natural en los fenotipos de tumor, desenlaces de la enfermedad y respuesta al tratamiento. Un reto importante es, por consiguiente,

identificar y validar minuciosamente biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico que puedan describir con exactitud la heterogeneidad atribuida al CEV. Además, se requieren biomarcadores predictivos precisos para guiar los actuales protocolos de tratamiento, además de para guiar el desarrollo y la aplicación de nuevas terapias dirigidas.

5  
Tecnologías, tales como micromatrices de ADN, proteómica y metabolómica basada en espectrometría de masas han facilitado la investigación traduccional durante la última década, ayudando a mejorar el entendimiento de la base molecular y genética de la oncogénesis y proporcionando una oportunidad para añadir nuevos enfoques a la práctica de la oncología clínica. La premisa fundamental de "tecnologías ómicas" es que el examen completo de cambios en el genoma (ADN), transcriptoma (ARNm), proteoma (proteínas) o metaboloma (metabolitos) puede proporcionar una percepción en la fisiología y el mecanismo de enfermedad, por la provisión de pruebas de diagnóstico superiores y eficacia terapéutica a la actualmente disponible (Brennan DJ, Kelly C, Rexhepaj E, et al. Contribution of DNA and Tissue Microarray Technology to the Identification and Validation of Biomarkers and Personalised Medicine in Breast Cancer. *Cancer Genomics and Proteomics* 2007;4:3-16). La aplicación de tecnología de micromatrices de ADN a la biología del cáncer, en particular, ha conducido a una comprensión cada vez mayor de la complejidad de las vías fisiopatológicas subyacentes e interacciones dentro de un tumor (Duffy MJ, Kelly ZD, Culhane AC, O'Brien S, and Gallagher WM. DNA microarray-based gene expression profiling in cancer aiding cancer diagnosis, assessing prognosis and predicting response to therapy. *Current Pharmacogenomics* 2005;3:289-304; Brennan DJ, O'Brien SL, Fagan A, et al. Application of DNA microarray technology in determining breast cancer prognosis and therapeutic response. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:1069-83). Los cribados transcriptómicos han acelerado la investigación en correlaciones genotípicas-fenotípicas, con un objetivo común de elucidar la taxonomía funcional de genes en tanto tejidos normales como estados de enfermedad, tales como cáncer (Brennan D, O'Brien S, Fagan A, et al. Application of DNA microarray technology in determining breast cancer prognosis and therapeutic response. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:1069-83).

25  
Konstantinopoulos, P.A. et al., *Nature Clinical Practice* (2008), 5(10):577-587 publicado en línea el 22 de julio de 2008 y Spentzos, D. et al., *Journal of Clinical Oncology* (2004), 22(23):4700-4710 desvelan perfiles de expresión génica con significancia de pronóstico en cáncer epitelial de ovario.

30 Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de agentes y métodos mejorados para el diagnóstico y pronóstico de CEV.

### Sumario de la invención

35 La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un primer aspecto de la divulgación se refiere a un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, para su uso en el diagnóstico o pronóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV).

40 Se apreciará que la divulgación se refiere a proporcionar el uso de un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, en la preparación de un agente de diagnóstico o pronóstico para cáncer epitelial de ovario (CEV).

45 Por "proteína Sox11" los presentes inventores incluyen la secuencia de aminoácidos de la proteína Sox11 humana como se muestra en la Figura 4 en el presente documento, además de homólogos que existen de forma natural de la misma.

50 Así, los presentes inventores también incluyen las proteínas Sox11 como se identifican en los N.º de acceso de la base de datos BAA88122, AAH25789, AAB08518, AAH25789 y P35716.

55 Los presentes inventores han identificado sorprendentemente Sox11 como un novedoso antígeno de diagnóstico/pronóstico para CEV, usando análisis de inmunohistoquímica. No solo es éste el primer informe que muestra la expresión en exceso de Sox11 en células de CEV, sino también la expresión diferencial de Sox11 en cohortes de CEV de alto riesgo frente a bajo riesgo. Así, Sox11 proporciona un valioso marcador para diagnosticar pacientes con CEV y facilita el preciso diagnóstico y/o pronóstico de este agresivo tumor maligno.

60 Por "diagnosticar" los presentes inventores incluyen el acto o proceso de identificar la existencia y/o tipo de cáncer que puede estar padeciendo un individuo. Así, en una realización, el diagnóstico incluye la diferenciación de un tipo de cáncer particular, concretamente CEV, de uno o varios de otros cánceres. En una realización alternativa, los restos de unión de la divulgación son para su uso en clasificar pacientes con CEV en grupos clínicamente relevantes basándose en la supervivencia global y/o supervivencia específica de cáncer.

65 Por "pronóstico" los presentes inventores incluyen el acto o proceso de predecir la probable evolución y desenlace de un cáncer, por ejemplo, determinar la probabilidad de supervivencia y/o probabilidad de supervivencia sin recidivas (RFS, *recurrence-free survival*).

Por "resto de unión" se indica una molécula o entidad que es capaz de unirse a la proteína Sox11 o ARNm que codifica la misma.

5 Se apreciará por personas expertas en la materia que los restos de unión de la divulgación pueden usarse para el diagnóstico o pronóstico de CEV de cualquier subtipo histológico (por ejemplo, seroso, mucinoso, endometriode, célula clara, no diferenciado o inclasificable).

10 En una realización de la invención, el resto de unión es para su uso en el diagnóstico o pronóstico de CEV que pertenece a un subtipo histológico específico. Así, el CEV puede pertenecer a un subtipo histológico seleccionado del grupo que consiste en célula serosa, mucinosa, endometriode o clara.

Asimismo, el resto de unión puede ser para su uso en el diagnóstico o pronóstico de CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto).

15 También se apreciará que los restos de unión de la divulgación pueden usarse *in vivo* o *in vitro*.

20 En una realización de la invención, el resto de unión de la invención es para su uso en la detección de la expresión de Sox11 como biomarcador único para cáncer epitelial de ovario (CEV). Por ejemplo, la expresión de Sox11 puede usarse como biomarcador único para la diferenciación de CEV de uno o varios de otros cánceres.

25 Alternativamente, el resto de unión de la divulgación puede ser para su uso en combinación con uno o más restos de unión adicionales para detectar uno o más biomarcadores adicionales para cáncer epitelial de ovario (CEV). Así, el resto de unión puede ser para su uso en combinación con menos de 20 restos de unión adicionales, por ejemplo, menos de 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos de unión adicionales.

En una realización particular, el resto de unión de la divulgación es para detectar expresión nuclear y/o citoplásmica de Sox11.

30 Por "unir selectivamente" los presentes inventores incluyen restos de unión que se unen más fuertemente a Sox11 que a otros polipéptidos o ácidos nucleicos; preferentemente al menos 10 veces más fuertemente, más preferentemente al menos 50 veces más fuertemente e incluso más preferentemente, al menos 100 veces más fuertemente. Preferentemente, los restos de unión se unen solo a polipéptidos o ácidos nucleicos Sox11.

35 El término 'polipéptido', como se usa en el presente documento, significa una pluralidad de aminoácidos que se unen juntos mediante un enlace peptídico. El término 'péptido' puede usarse indistintamente con el término 'polipéptido', sin embargo, un péptido puede estar compuesto de dos o más polipéptidos.

40 El término 'aminoácido', como se usa en el presente documento, incluye los veinte aminoácidos estándar genéticamente codificados y sus estereoisómeros correspondientes en la forma 'D' (en comparación con la forma 'L' natural), omega-aminoácidos distintos de aminoácidos que existen de forma natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo, aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, N-alquil-aminoácidos, etc.) y aminoácidos químicamente derivatizados.

45 Cuando un aminoácido está siendo específicamente enumerado, tal como 'alanina' o 'Ala' o 'A', el término se refiere a tanto L-alanina como a D-alanina, a menos que se establezca explícitamente de otro modo. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente divulgación, en tanto que la propiedad funcional deseada sea retenida por el polipéptido. Para los péptidos mostrados, cada resto de aminoácido codificado, cuando corresponda, se representa por la designación de una sola letra, correspondiente al nombre común del aminoácido convencional.

50 Los restos de unión basados en ácidos nucleicos de la divulgación son preferentemente ADN, pero también pueden ser ARN o un ácido nucleico artificial tal como PNA.

55 El segundo aspecto de la divulgación proporciona un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, para su uso en detectar células de cáncer epitelial de ovario (CEV) en una muestra.

En una realización, el resto de unión es para su uso en detectar CEV que pertenece a un subtipo histológico específico (por ejemplo, célula serosa, mucinosa, endometriode, clara y no diferenciado o inclasificable).

60 Asimismo, el resto de unión puede ser para su uso en detectar CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto).

65 Una realización de la divulgación proporciona un resto de unión según tanto el primer como el segundo aspecto que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11. Preferentemente, la proteína Sox11 es una proteína humana.

Convenientemente, el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 (véase la Figura 4) y/o una variante natural de la misma.

5 Por "variante natural" los presentes inventores incluyen las proteínas Sox11 que se encuentran en la naturaleza, por ejemplo, variantes alélicas.

10 Variantes de polipéptidos incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia con al menos el 60 % de identidad con secuencias de aminoácidos conocidas, preferentemente al menos el 70 % o 80 % o 85 % o 90 % de identidad con dichas secuencias, y más preferentemente al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con dicha secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

15 La identidad en porcentaje puede determinarse, por ejemplo, por el programa LALIGN (Huang y Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357) en el sitio de las instalaciones de Expasy ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) usando como parámetros la opción de alineamiento global, matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por abertura de hueco -14, penalización por extensión de hueco -4. Alternativamente, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos pueden determinarse usando programas informáticos adecuados, por ejemplo, el programa GAP del Genetic Computing Group de la Universidad de Wisconsin y se apreciará que la identidad en porcentaje se calcula en relación con polipéptidos cuya secuencia ha sido alineada óptimamente.

20 Preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en un polipéptido.

25 Pueden identificarse restos de unión de polipéptido por medio de un cribado. Un método o cribado adecuado para identificar péptidos u otras moléculas que se unen selectivamente a proteína diana o polipéptido puede comprender poner en contacto la proteína o polipéptido diana con un péptido de prueba u otra molécula en condiciones donde puede producirse la unión, y entonces determinar si la molécula o péptido de prueba se ha unido a la proteína o péptido diana. Métodos de detección de la unión entre dos restos son muy conocidos en la técnica de la bioquímica. Preferentemente, se usa la técnica conocida de presentación en fagos para identificar péptidos u otras moléculas de ligando adecuadas para su uso como restos de unión. Un método alternativo incluye el sistema de dos híbridos de levadura.

30 Más preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno o variante del mismo.

35 Por "anticuerpo" los presentes inventores incluyen moléculas de anticuerpo sustancialmente intactas, además de anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos (en los que al menos un aminoácido está mutado con respecto a los anticuerpos humanos que existen de forma natural), anticuerpos monocatenarios, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas del anticuerpo, cadenas ligeras del anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadena pesadas y/o ligeras de anticuerpo, y fragmentos de unión al antígeno y derivados de los mismos.

40 Por "fragmento de unión al antígeno" los presentes inventores indican un fragmento funcional de un anticuerpo que es capaz de unirse a la proteína Sox11.

45 Preferentemente, el fragmento de unión al antígeno está seleccionado del grupo que consiste en fragmentos Fv (por ejemplo, Fv monocatenario y Fv unido a disulfuro), fragmentos similares a Fab (por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y fragmentos F(ab)<sub>2</sub>), dominios variables individuales (por ejemplo, dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) y anticuerpos de dominio (dAbs, que incluyen formatos individuales y dobles [es decir, dAb-conector-dAb]).

50 Las ventajas de uso de los fragmentos de anticuerpos, en vez de anticuerpos completos, son múltiples. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede conducir a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mejor penetración de tejido sólido. Además, los fragmentos de unión al antígeno tales como los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv, ScFv y dAb pueden expresarse en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

55 También están incluidos dentro del alcance de la divulgación versiones modificadas de anticuerpos y un fragmento de unión al antígeno de los mismos, por ejemplo, modificado por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado.

60 Los métodos de generación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos mediante uno cualquiera de varios métodos que emplean la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpo, cribado de bibliotecas de inmunoglobulina (Orlandi. et al, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:3833-3837; Winter et al., 1991, Nature 349:293-299) o generación de moléculas de anticuerpo monoclonal por líneas celulares en cultivo. Éstos incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos y la técnica de hibridomas del virus de Epstein-Barr (EBV) (Kohler et al., 1975. Nature 256:4950497; Kozbor et al., 1985. J. Immunol. Methods 81:31-42; Cote et al., 1983. Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 80:2026-2030; Cole et al., 1984. Mol. Cell. Biol. 62:109-120).

5 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales adecuados para antígenos seleccionados por técnicas conocidas, por ejemplo, los desvelados en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

10 Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos usando métodos muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow & Lane, 1988, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, New York). Por ejemplo, pueden prepararse fragmentos de anticuerpo según la presente divulgación por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en células de *E. coli* o de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión en proteína) de ADN que codifica el fragmento. Alternativamente, pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos por métodos convencionales.

15 Se apreciará por personas expertas en la materia que para la terapia humana o diagnósticos, se usan preferentemente anticuerpos humanizados. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos genéticamente manipulados o fragmentos de anticuerpos que tienen preferentemente porciones mínimas derivadas de anticuerpos no humanos. Los anticuerpos humanizados incluyen anticuerpos en los que regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano (anticuerpo receptor) están sustituidas con residuos de una región determinante de la complementariedad de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la funcionalidad deseada. En algunos casos, residuos de la región estructural Fv del anticuerpo humano están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en la región determinante de la complementariedad importada o secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones determinantes de la complementariedad se corresponden con aquellas de un anticuerpo no humano y todas, o sustancialmente todas, las regiones estructurales se corresponden con aquellas de una secuencia consenso humana relevante. Los anticuerpos humanizados también incluyen óptimamente al menos una porción de una región constante de anticuerpo, tal como una región Fc, normalmente derivada de un anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Jones et al., 1986. Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-329; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596).

35 Métodos de humanización de anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, el anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos, frecuentemente denominados residuos importados, normalmente se toman de un dominio variable importado. La humanización puede realizarse esencialmente como se describe (véase, por ejemplo, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Reichmann et al., 1988. Nature 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-1536; documento US 4.816.567) sustituyendo regiones determinantes de la complementariedad humanas con regiones determinantes de la complementariedad de roedor correspondientes. Por consiguiente, tales anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos, en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados pueden ser normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región determinante de la complementariedad y posiblemente algunos residuos de la región estructural están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

50 También pueden identificarse anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, que incluyen bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Hoogenboom & Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol, 222:581; Cole et al., 1985, en: Monoclonal antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77; Boerner et al., 1991. J. Immunol. 147:86-95).

Una vez se obtienen anticuerpos adecuados, pueden probarse para actividad, por ejemplo, por ELISA.

55 Otra realización de la presente divulgación proporciona un resto de unión capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Sox11. Preferentemente, el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1 y/o variantes naturales de la misma.

60 Más preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico. Incluso más preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en una molécula de ADN. Ventajosamente, el resto de unión comprende o consiste en un fragmento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:2 (véase la Figura 5), o la secuencia complementaria de la misma, de un fragmento o una variante de la misma. Convenientemente, la molécula de ácido nucleico tiene 5 a 100 nucleótidos de longitud. Más convenientemente, la molécula de ácido nucleico tiene 15 a 35 nucleótidos de longitud.

65 Preferentemente, el resto de unión comprende un resto detectable.

Por un "resto detectable", los presentes inventores incluyen el significado de que el resto es uno que, cuando se localiza en el sitio diana tras la administración del compuesto de la divulgación en un paciente, puede detectarse, normalmente no invasivamente desde fuera del cuerpo y el sitio de la diana localizada. Así, los compuestos de esta realización de la divulgación son útiles en obtención de imágenes y diagnóstico.

5 Normalmente, el resto detectable es o comprende un átomo radiactivo que es útil en obtención de imágenes. Átomos radiactivos adecuados incluyen  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{123}\text{I}$  para estudios escintigráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, etiquetas de espín para imagen por resonancia magnética (IRM) tales como  $^{123}\text{I}$  otra vez,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ , gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, el compuesto de la divulgación debe tener suficiente de los isótopos atómicos apropiados con el fin de que la molécula sea fácilmente detectable.

15 Pueden incorporarse radiomarcas u otras marcas en el compuesto de la divulgación de formas conocidas. Por ejemplo, si el resto de unión es un polipéptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácido adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$  y  $^{111}\text{In}$  pueden unirse, por ejemplo, mediante restos de cisteína en el resto de unión. Puede unirse itrio-90 mediante un resto de lisina. Puede usarse el método IODOGEN (Fraker et al., 1978, Biochem. Biophys. Res. Comm. 80:49-57) para incorporar  $^{123}\text{I}$ . La referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros métodos en detalle.

20 Así, en otra realización de la divulgación, el átomo radiactivo está seleccionado del grupo que consiste en tecnecio-99m, yodo-123, yodo-125, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, fósforo-32, azufre-35, deuterio, tritio, renio-186, renio-188 e itrio-90.

25 Otro aspecto de la invención proporciona un método de diagnóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV) en un individuo, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una muestra de células epiteliales de ovario del individuo; y

(b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra de células.

30 en el que los niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm son indicativos del individuo que tiene cáncer epitelial de ovario (CEV).

35 En particular, altos niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm son indicativos del individuo que tiene cáncer epitelial de ovario (CEV).

En una realización, el método es para diagnosticar CEV que pertenece a un subtipo histológico específico (por ejemplo, célula serosa, mucinosa, endometriode y clara).

40 Asimismo, el método puede ser para diagnosticar CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto).

En una realización, el método comprende además realizar una o más pruebas de diagnóstico adicionales para CEV en las células epiteliales del ovario para confirmar el diagnóstico

45 Otro aspecto de la invención proporciona un método de pronóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV) en un individuo, comprendiendo el método:

(a) proporcionar una muestra de células de cáncer epitelial de ovario del individuo; y (b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra de células.

50 en el que los niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm son indicativos de la probabilidad de supervivencia sin recidivas del individuo.

55 En una realización, el método es para pronosticar CEV que pertenece a un subtipo histológico específico (por ejemplo, célula serosa, mucinosa, endometriode y clara).

Asimismo, el método puede ser para pronosticar CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto).

60 Por "probabilidad de supervivencia sin recidivas" los presentes inventores indican la probabilidad de que el individuo sobreviva durante un periodo dado, tal como un año, dos años, tres años, cinco años, diez años o más.

65 En una realización, altos niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm es indicativo del individuo que tiene supervivencia sin recidivas (RFS, *recurrence-free survival*) mejorada.

Por "supervivencia sin recidivas mejorada" los presentes inventores indican que la probabilidad de supervivencia sin recidivas es mayor cuando se compara con una población promedio de pacientes con cáncer epitelial de ovario (CEV), por ejemplo, la probabilidad puede aumentarse al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 o más.

- 5 En una realización alternativa, bajos niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm es indicativo del individuo que tiene supervivencia sin recidivas (RFS) reducida.

Por "supervivencia sin recidivas reducida" los presentes inventores indican que la probabilidad de supervivencia sin recidivas es menor cuando se compara con una población promedio de pacientes con cáncer epitelial de ovario (CEV), por ejemplo, la probabilidad puede reducirse al menos 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 o más.

10

Otro aspecto de la invención proporciona un método de detección de un cáncer epitelial de ovario (CEV) en un individuo, comprendiendo el método:

15

(a) proporcionar una muestra de células del individuo; y

(b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra de células.

20

en el que los niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm son indicativos del individuo que tiene células de cáncer epitelial de ovario (CEV).

En una realización, el método es para detectar células de un CEV que pertenecen a un subtipo histológico específico (por ejemplo, célula serosa, mucinosa, endometrioide y clara).

25

Asimismo, el método puede ser para detectar células de un CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto).

En particular, altos niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm son indicativos del individuo que tiene cáncer epitelial de ovario (CEV).

30

Por "altos niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm" los presentes inventores indican que la cantidad de la proteína Sox11 y/o ARNm es al menos el 10 % superior a en células epiteliales del ovario no cancerosas (por ejemplo, sanas), por ejemplo, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 120 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1000 %, 1500 %, 2000 %, 3000 %, 4000 %, 5000 %, 10000 % mayor, o más.

35

Por "bajos niveles de la proteína Sox11 y/o ARNm" los presentes inventores indican que la cantidad de la proteína Sox11 y/o ARNm no es estadísticamente diferente de la de células epiteliales del ovario no cancerosas.

40

Se apreciará por los expertos que los métodos de la invención pueden realizarse *in vivo* o *in vitro*.

En una realización, el método comprende la detección de la expresión de Sox11 como biomarcador único para el diagnóstico o pronóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV) (como se trata anteriormente).

45

Alternativamente, el resto de unión de la divulgación puede usarse en combinación con uno o más restos de unión adicionales para detectar uno o más biomarcadores adicionales para el diagnóstico o pronóstico de CEV. Así, el resto de unión puede usarse en combinación con menos de 20 restos de unión adicionales, por ejemplo, menos de 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos de unión adicionales.

50

En una realización, el método comprende detectar expresión nuclear y/o citoplásmica de Sox11.

Preferentemente, la muestra de células que va a probarse está en forma de una muestra de tejido. Convenientemente, la cantidad de la proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra se determina usando un resto de unión según el primero o segundo aspecto de la divulgación.

55

Otra realización de los métodos de la invención comprende comparar la cantidad de la proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra de células que va a probarse con la cantidad de la proteína Sox11 y/o ARNm en una muestra de control.

60

Ventajosamente, la muestra de control es una muestra de control negativo que comprende o que consiste en células epiteliales del ovario no cancerosas.

Alternativamente, o además, la muestra de control es una muestra de control positivo que comprende o que consiste en células de cáncer epitelial de ovario. Las células epiteliales de ovario pueden ser células de CEV asociadas a alta supervivencia sin recidivas (RFS) o células de CEV asociadas a baja supervivencia sin recidivas (RFS).

65

Normalmente, la etapa (b) de los métodos de la invención se realiza usando un método seleccionado del grupo que

consiste en macromatriz, micromatriz (incluyendo micromatriz de tejido), nanomatriz, PCR con transcripción inversa, PCR en tiempo real o PCR *in situ*.

5 Otra realización del tercer o cuarto aspectos de la invención comprende determinar los niveles de proteínas biomarcadoras de CEV adicionales y/o ARNm en la muestra de células que va a probarse, por ejemplo, p53, receptor de estrógenos y/o receptor de progesterona.

10 Otro aspecto de la invención proporciona un resto de unión para su uso en un método de obtención de imágenes de células de cáncer epitelial de ovario (CEV) en el cuerpo de un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un resto de unión según el primer o segundo aspecto de la divulgación.

En una realización, el método es para la obtención de imágenes de células de un CEV que pertenece a un subtipo histológico específico (por ejemplo, célula serosa, mucinosa, endometriode y clara).

15 Asimismo, el método puede ser para la obtención de imágenes células de un CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto).

20 El término 'cantidad eficaz', como se usa en el presente documento, se refiere a aquella cantidad que proporciona una señal suficientemente detectable para un régimen de administración dado. Ésta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir una intensidad de señal deseada en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un excipiente o vehículo de administración. Como se aprecia por aquellos expertos en la materia, la cantidad de un compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir la intensidad de señal deseada en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y uso para la fabricación de composiciones de la divulgación, se proporciona una cantidad eficaz del componente activo. Una cantidad eficaz puede ser determinada por el médico o veterinario experto habitual basándose en las características del paciente, tales como la edad, peso, sexo, afección, complicaciones, otras enfermedades, etc., como es muy conocido en la técnica.

30 Normalmente, el sexto aspecto de la invención comprende la etapa de detectar la localización del resto de unión en el individuo. Preferentemente, la proteína Sox11 y/o ARNm que codifica la misma se usan como marcador para células de cáncer epitelial de ovario (CEV).

35 Un séptimo aspecto de la divulgación proporciona el uso de un resto de unión como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para diagnosticar o pronosticar cáncer epitelial de ovario (CEV).

La divulgación se refiere además al uso de la proteína Sox11 y/o ARNm que codifica la misma como biomarcador para células de cáncer epitelial de ovario (CEV).

40 En una realización, la proteína Sox11 y/o ARNm que codifica la misma es para su uso como biomarcador para CEV que pertenece a un subtipo histológico específico (por ejemplo, célula serosa, mucinosa, endometriode, clara y no diferenciado o inclasificable).

45 Asimismo, la proteína Sox11 y/o ARNm que codifica la misma puede ser para su uso como un biomarcador para CEV que pertenece a un grado específico (por ejemplo, grado alto).

Se apreciará que Sox11 puede usarse como biomarcador único para cáncer epitelial de ovario (CEV).

50 Alternativamente, Sox11 puede usarse en combinación con uno o más biomarcadores adicionales. Preferentemente, sin embargo, Sox11 se usa en combinación con menos de 20 biomarcadores adicionales se usan en el método, por ejemplo, menos de 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 biomarcadores adicionales.

55 Un noveno aspecto de la divulgación se refiere además a un método de selección de una molécula con eficacia en el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV), comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto una molécula que va a probarse con la proteína Sox11 y/o ARNm que codifica la misma (o con un fragmento de dicha proteína o ARNm); y

60 (b) detectar la presencia de un complejo que contiene la proteína y/o ARNm (o fragmento de la misma) y la molécula que va a probarse.

En una realización, el método es para seleccionar una molécula con eficacia en el diagnóstico y/o pronóstico de CEV que pertenece a un subtipo histológico específico (por ejemplo, seroso, mucinoso, endometriode).

65 Asimismo, el método puede ser para seleccionar una molécula con eficacia en el diagnóstico y/o pronóstico de CEV asociado a células de un grado específico (por ejemplo, grado alto). Métodos de detección y/o medición de la

concentración de proteína y/o ácido nucleico son muy conocidos para aquellos expertos en la materia, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (arriba).

5 Métodos preferidos para la detección y/o medición de proteína incluyen transferencia Western, transferencia Northern, ensayos inmunsorbentes (ELISA), micromatriz de anticuerpos, micromatriz de tejidos (TMA), inmunoprecipitación, hibridación *in situ* y otras técnicas inmunohistoquímicas, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA), que incluyen ensayos de sándwich usando anticuerpos monoclonales y/o policlonales. Ensayos de sándwich a modo de ejemplo se describen por David et al., en las patentes de EE.UU. N.º 4.376.110 y 4.486.530, incorporadas por este documento por referencia. Puede usarse tinción de anticuerpos de células sobre portaobjetos en métodos muy conocidos en las pruebas de diagnóstico de laboratorios de citología, como es muy conocido para aquellos expertos en la materia.

15 Normalmente, ELISA implica el uso de enzimas que dan un producto de reacción coloreado, normalmente en ensayos en fase sólida. Se han empleado ampliamente enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa. Una forma de amplificar la reacción de fosfatasa es usar NADP como sustrato para generar NAD que ahora actúa de coenzima para un segundo sistema de enzima. La pirofosfatasa de *Escherichia coli* proporciona un buen conjugado debido a que la enzima no está presente en tejidos, es estable y da un buen color de reacción. También pueden usarse sistemas quimioluminiscentes basados en enzimas tales como luciferasa.

20 Frecuentemente se usa conjugación con la vitamina biotina, ya que ésta puede ser fácilmente detectada por su reacción con avidina o estreptavidina unida a enzima a la que se une con gran especificidad y afinidad.

25 Métodos preferidos para la detección y/o medición de ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) incluyen transferencia Southern, transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), nanomatriz, macromatriz, autorradiografía e hibridación *in situ*.

30 En una realización típica, la presencia de células de cáncer epitelial de ovario (CEV) se detecta por detección de la proteína Sox11 y/o ácido nucleico en núcleos de células y/o citoplasma. Preferentemente, los núcleos/citoplasma de células de linfoma expresan la proteína Sox11 y/o ácido nucleico en una cantidad relativamente alta, como se indica, por ejemplo, por tinción brillante de los núcleos durante el análisis de hibridación *in situ*.

Ejemplos no limitantes preferidos que incorporan ciertos aspectos de la invención se describirán ahora, con referencia a las siguientes figuras:

35 **Figura 1. Expresión de proteínas Sox11 en cáncer de ovario.**

Tinción inmunohistoquímica de Sox 11 que muestra precisamente la expresión citoplásmica (A) y la expresión citoplásmica y nuclear (B). Imagen de marcas correspondiente del algoritmo de deconvolución que muestra estroma en azul, tinción citoplásmica en amarillo y naranja y expresión nuclear en rojo.

40 **Figura 2. Expresión de proteínas Sox11 y supervivencia en cáncer de ovario.**

Expresión de Sox11 clasificada en baja, media y alta basada en el histograma (A). Estimación de Kaplan Meier de RFS basada en the tres grupos de Sox11 (B). Estimación de Kaplan Meier de RFS basada en comparación de niveles altos y medios de Sox11 con niveles bajos de Sox11 (C).

45 **Figura 3. Secuencia de aminoácidos de la proteína Sox11 de *Homo sapiens*.**

**Figura 4. Secuencia de ácidos nucleicos de ARNm de *SOX11* de *Homo sapiens*.**

**Figura 5. Supervivencia global (25 años) en cáncer de ovario endometroide**

50 Se compara la supervivencia global a los 25 años de pacientes con más o menos del 10 % de células tumorales positivas para Sox11. Cuando se censura un paciente (se saca del estudio por otro motivo distinto a muerte) esto se indica con una marca de verificación en la línea.

**Figura 6. Supervivencia global (5 años) en cáncer de ovario endometroide**

55 Se compara la supervivencia global a los 5 años de pacientes con más o menos del 10 % de células tumorales positivas para Sox11. Cuando se censura un paciente (se saca del estudio por otro motivo distinto a muerte) esto se indica con una marca de verificación en la línea.

**Figura 7. Supervivencia específica de cáncer (5 años) en cáncer de ovario endometroide**

60 Se compara la supervivencia específica de cáncer a los 5 años de pacientes con más o menos del 10 % de células tumorales positivas para Sox11. Cuando se censura un paciente (se saca del estudio por otro motivo distinto a muerte) esto se indica con una marca de verificación en la línea.

**Figura 8. Supervivencia global (25 años) para CEV de grado alto**

65 Se compara la supervivencia global a los 25 años de pacientes de grado alto con más o menos del 10 % de células tumorales positivas para Sox11. Cuando se censura un paciente (se saca del estudio por otro motivo

distinto a muerte) esto se indica con una marca de verificación en la línea.

**Figura 9. Supervivencia específica de cáncer (25 años) para CEV de grado alto**

Se compara la supervivencia específica de cáncer a los 25 años de pacientes de grado alto con más o menos del 10 % de células tumorales positivas para Sox11. Cuando se censura un paciente (se saca del estudio por otro motivo distinto a muerte) esto se indica con una marca de verificación en la línea.

**EJEMPLO A**

**10 Introducción**

El factor de transcripción Sox11 es un miembro de la familia de los genes Sox y se ha mapeado con el cromosoma 2p25.3 (Azuma T, Ao S, Saito Y, et al. Human SOX11, an upregulated gene during the neural differentiation, has a long 3' untranslated region. DNA research 1999;6:357-60). Se identifican proteínas Sox como proteínas que contienen un dominio de grupo de alta movilidad de unión a ADN (HMG) con fuerte homología de aminoácidos (normalmente >50 %) con el dominio HMG del gen de determinación del sexo masculino, Sry (Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic acids research 1999;27:1409-20). Se han identificado más de 20 genes Sox ortólogos en los genomas humano y de ratón, y los miembros de la familia se dividen en ocho subgrupos según el grado de homología dentro y fuera del dominio HMG (Schepers GE, Teasdale RD, and Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. Developmental cell 2002;3:167-70). Las proteínas Sox actúan de factores de transcripción uniéndose al surco menor de ADN e introduciendo una flexión aguda de ADN que les permite desempeñar una función arquitectónica clave en el ensamblaje de complejos potenciadores transcripcionales (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, et al. The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008;36:3101-17; van de Wetering M and Clevers H. Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. The EMBO journal 1992;11:3039-44). Además de interacciones proteína-ADN, las proteínas Sox también interaccionan con diversos otros factores de transcripción para aumentar su eficiencia y especificidad de acción (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, et al. The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008;36:3101-17).

Sox11 pertenece al subgrupo C, junto con Sox4 y Sox12 (Schepers GE, Teasdale RD, and Koopman P. Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. Developmental cell 2002;3:167-70), y las tres proteínas demuestran un alto grado de homología dentro de tanto el dominio de transactivación del extremo C como el dominio HMG (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, et al. The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008;36:3101-17; Jay P, Goze C, Marsollier C, et al. The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. Genomics 1995;29:541-5). Sox11 y Sox 4 desempeñan funciones importantes en procesos cardíacos, neuronales y otros procesos embrionarios importantes, aunque se sabe menos de Sox12 (Dy P, Penzo-Mendez A, Wang H, et al. The three SoxC proteins Sox4, Sox11 and Sox12 exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. Nucleic acids research 2008;36:3101-17).

Los presentes inventores han demostrado recientemente que Sox11 nuclear está específicamente regulado por incremento en linfoma de células del manto (MCL) y distingue MCL de otros linfomas de linfocitos B (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, and Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008;111:800-5). Sox4 es un factor de transcripción importante en linfocitos de tanto el linaje de linfocitos B como T (Wegner M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic acids research 1999;27:1409-20; van de Wetering M, Oosterwegel M, van Norren K, and Clevers H. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. The EMBO journal 1993;12:3847-54) y es crucial para la linfopoyesis B (Smith E and Sigvardsson M. The roles of transcription factors in B lymphocyte commitment, development, and transformation. Journal of leukocyte biology 2004;75:973-81), mientras que Sox11 no tiene función linfopoyética conocida y no se expresa en linfocitos B (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, and Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008;111:800-5). Tanto Sox4 como Sox11 se expresan en meduloblastoma (Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, and Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. Journal of neuro-oncology 2002;57:201-14) y Sox11 también se expresa en exceso en glioma maligno (Weigle B, Ebner R, Temme A, et al. Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. Oncology reports 2005;13:139-44). Adicionalmente, Sox4 se expresa en cáncer de vejiga con elevados niveles de expresión asociados a desenlace del paciente mejorado (Aaboe M, Birkenkamp-Demtroder K, Wiuf C, et al. SOX4 expression in bladder carcinoma: clinical aspects and *in vitro* functional characterization. Cancer research 2006;66:3434-42).

Este estudio resume la expresión de ARNm de Sox11 a través de un gran número de tejidos normales y tumores, y revela que el ARNm de Sox11 va a expresarse en exceso en un gran número de tejidos malignos. Además, los presentes inventores examinaron específicamente la expresión de Sox11 de proteínas en CEV y demostraron que los elevados niveles de la proteína Sox11, como se ha determinado por análisis de imágenes, se asociaron a una supervivencia libre de recidivas (RFS) mejorada.

**Materiales y métodos**

Perfil transcripcional

5 Se recuperaron niveles de expresión de ARNm del gen SOX11 a través de un gran número de tejidos humanos de la base de datos In Silico Transcriptomics (IST), que contiene datos de un metanálisis de 14.095 muestras analizadas usando micromatrices de expresión génica de Affymetrix.

Pacientes y muestras de tumores

10 La TMA, usada en este estudio, se construyó a partir de una cohorte consecutiva de 76 pacientes diagnosticados con cáncer epitelial de ovario invasivo primario en el Hospital Nacional de Maternidad, Dublín, con una mediana del seguimiento de 4,3 años. La cohorte de pacientes se resume en la Tabla 1. El enfoque quirúrgico estándar fue una histerectomía abdominal total, salpingo-ooforectomía bilateral y omentectomía con evaluación citológica de líquido del peritoneo o lavados. La enfermedad residual se reseccionó a menos de 2 cm cuando fue posible. Se registró el estado y volumen de la enfermedad residual (enfermedad no residual, enfermedad residual mayor o inferior a 2 cm) en todos los casos. La quimioterapia adyuvante consistió en cisplatino o carboplatino antes de 1992 y combinada con paclitaxel desde 1992 hasta 2002. Ningún paciente recibió quimioterapia neo-adyuvante. Se excluyeron del estudio cánceres de ovario benigno o incierto, cáncer no epitelial de ovario y casos con características histológicas típicas de cáncer de ovario secundario. Los especímenes de diagnóstico se fijaron todos en formalina y se incorporaron en parafina en el Departamento de Patología en el Hospital Nacional de Maternidad, Dublín, Irlanda. Todos los bloques de tejido se almacenaron en este departamento antes de la construcción del TMA. Se obtuvo autorización ética completa del comité ético del Hospital Nacional de Maternidad, Dublín.

25 Micromatrices de tejido e inmunohistoquímica

Se usaron setenta y seis especímenes de tumor incorporados en parafina para la construcción de la micromatriz de tejido (TMA). Se marcaron áreas representativas de cáncer invasivo sobre portaobjetos teñidos con hematoxilina y eosina y se construyó la TMA, usando un robot para la fabricación de micromatrices de tejido manual (MTA-1, Beecher Inc, WI). La matriz consistió en cuatro núcleos por paciente. Se extrajeron dos núcleos de 1,0 mm de cada bloque de donante y se ensamblaron en un bloque de receptor. Los bloques de receptor se limitaron a aproximadamente 100 núcleos cada uno. En general, se tomaron núcleos de la parte periférica del tumor en los casos en los que el tumor tenía límites bien definidos. En tumores de crecimiento más difuso, las áreas con la mayor densidad de células tumoral fueron principalmente elegidas como diana. Se evitó tejido necrótico.

35 Se secaron secciones de TMA (4 µm), se desparafinaron, se rehidrataron y se pusieron a través de concentraciones descendentes de etanol. Se realizó la recuperación de antígeno mediada por calor en un BORGdecloaker (Biocare, Concord, CA, EE.UU.) a pH 9,0 y entonces las secciones se tiñeron con el anticuerpo anti-Sox11 humana de conejo primario (1:100) a temperatura ambiente durante 25 minutos. Este anticuerpo específico se produjo, como se describe previamente (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, and Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008; 111:800-5) y se eligieron como dianas las siguientes secuencias de proteínas:

FMVWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWMLKDSEKIPFIREAERLRLKHMADYP  
DYKYRPRKKPKMDPSAKPSASQSPEKSAAGGGGGSAGGGAGGAKTSKGSSKK

[SEQ ID NO:3]

45 La señal se detectó, usando el sistema de detección Dako REAL, que contiene el anticuerpo anti-conejo/ratón de cabra biotinilado secundario, el complejo de estreptavidina/peroxidasa de rábano picante y 3,3-diaminobencidina, según el protocolo del fabricante. Los portaobjetos se contratificaron con hematoxilina de Mayers (Sigma-Aldrich, St Louis, MO).

Adquisición de imágenes, tratamiento y análisis automatizado

55 Se usó el sistema Aperio ScanScope XT Slide Scanner (Aperio Technologies, Vista, CA) para capturar imágenes digitales de portaobjetos completos con un objetivo 20X. Se des-matrizaron los portaobjetos para visualizar núcleos individuales, usando TMA Lab (Aperio). Se usó un algoritmo de deconvolución del color (Aperio) para desarrollar un modelo de puntuación cuantitativa para la expresión de Sox11.

Análisis estadístico

60 Se usó la correlación de la rho de Spearman para estimar la relación entre núcleos de tumores individuales. Se evaluaron diferencias en la distribución de datos clínicos y características tumorales entre muestras con una expresión alta y baja de Sox11 (descrita a continuación) usando la prueba de  $\chi^2$ . Se usaron análisis de Kaplan-Meier

y la prueba de rangos logarítmicos para ilustrar diferencias entre RFS. Se usaron modelos de riesgo proporcional de la regresión de Cox para estimar la relación con RFS y Sox11, etapa y grado. Todos los cálculos se realizaron usando SPSS versión 11.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 5 Resultados

### Expresión de ARNm de Sox11 en tejidos normales y tumorales

10 Se realizó un metanálisis de los niveles de expresión de ARNm de Sox11 en 14.095 muestras analizadas usando las micromatrices de expresión génica Affymetrix.

Fueron evidentes elevados niveles de expresión de ARNm de Sox11 en muestras de carcinoma epitelial de ovario (datos no mostrados).

### 15 Expresión de proteínas Sox11 en cáncer de ovario

Habiendo identificado Sox11 como un gen que se expresó en exceso en células de carcinoma epitelial de ovario, se examinó la expresión de la proteína Sox11 usando IHC en CEV como se ilustra en la Figura 1. La expresión de Sox11 se observó exclusivamente en epitelio de tumor y la señal de IHC fue evidente en tanto el núcleo como el citoplasma. Solo estuvo presente expresión nuclear de Sox11 cuando se acompañó de señal citoplásmica, mientras que una proporción (49 %) de tumores demostraron expresión citoplásmica en ausencia de señal nuclear (Fig. 1).

### Determinación cuantitativa de la expresión de Sox11 como se ha determinado por análisis de imágenes

25 Entonces se determinó la determinación cuantitativa de la expresión de Sox11, usando un enfoque de análisis de imágenes, en particular mediante el uso de un algoritmo de deconvolución de color comercial (Aperio). Se generó una imagen de "marcas" en pseudo-color como resultado del algoritmo, permitiendo así la confirmación de que el algoritmo estaba identificando con exactitud píxeles epiteliales y de estroma (Fig. 1). Recientemente se publicó una descripción completa del algoritmo (Brennan DJ, Rexhepaj E, O'Brien SL, et al. Altered Cytoplasmic-to-Nuclear Ratio of Survivin Is a Prognostic Indicator in Breast Cancer. Clinical cancer research 2008;14:2681-9).

30 El algoritmo se usó para calcular una intensidad total (TI) para Sox11 para cada núcleo. Hubo una fuerte correlación entre núcleos por cuadruplicado de tumores individuales para TI ( $\rho$  de Spearman = 0,858,  $p < 0,001$ ), que indica que Sox11 tiene un patrón de expresión homogéneo en cáncer de ovario y es adecuado para el análisis basado en TMA. Como los tumores se dispusieron en matriz por cuadruplicado, la mediana del valor para cada tumor se usó para análisis adicionales. El algoritmo distinguió con exactitud entre tinción nuclear y citoplásmica en todos los núcleos, como se ha confirmado por un histopatólogo.

40 Se muestra un histograma de datos del análisis de imágenes de Sox11 para la cohorte entera en la Figura 2a. Usando este histograma, los tumores se dispusieron en tres categorías - nivel alto, medio y bajo de la expresión de Sox11, como se ha determinado por análisis de imágenes. Basándose en la clasificación del análisis de imágenes, se clasificó que el 20 % ( $n = 17$ ) de los tumores tenían niveles altos, el 43 % ( $n = 35$ ) niveles medios y el 29 % ( $n = 24$ ) niveles bajos / negativos de la expresión de Sox11, como se ha determinado por análisis de imágenes. Los tumores en el grupo de expresión alta mostraron todos expresión de Sox11 nuclear y citoplásmica, mientras que aquellos en el grupo medio generalmente presentaron solo Sox11 citoplásmica. No se encontró asociación entre la expresión de Sox11 y la edad, grado o etapa de la enfermedad.

### Asociaciones entre la expresión de Sox11 como se ha determinado por análisis de imágenes automático y supervivencia

50 El análisis de Kaplan Meier de la RFS basada en la expresión de Sox11 reveló una disminución escalonada en la RFS entre los grupos alto, medio y bajo ( $p = 0,033$ ) (Fig. 2b). Análisis de subconjuntos adicionales revelaron una RFS marcadamente reducida en pacientes con bajos niveles de expresión de Sox11, como se ha determinado por el análisis de imágenes en comparación con los expresores de Sox11 altos y medios ( $p = 0,02$ ) (Fig. 2c). Los presentes inventores continuaron realizando un análisis de regresión de Cox multifactorial de RFS, que reveló que la expresión de Sox11 era un factor pronóstico independiente de RFS cuando se compara con la etapa y el grado (HR = 0,56, IC del 95 % = 0,319 - 0,997,  $p = 0,049$ ).

### *Discusión*

60 En este estudio, los presentes inventores combinaron un metanálisis de datos transcriptómicos, TMAs y análisis de imágenes automáticos para identificar y validar Sox11 como biomarcador de pronóstico en carcinoma epitelial de ovario (CEV). Este estudio es el primero en describir la relación entre la expresión de Sox11 y el pronóstico en CEV. Habiendo identificado previamente Sox11 como un nuevo marcador de diagnóstico en MCL (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, and Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008;111:800-5), los presentes inventores continuaron usando la base de

datos IST que contenía datos de un metanálisis de 14.095 muestras analizadas, usando las micromatrices de expresión génica Affymetrix para describir la expresión de ARNm de Sox11 en células CEV.

Los presentes inventores continuaron entonces usando TMA's y un análisis automático cuantitativo de IHC para evaluar la expresión de Sox11 de proteínas en CEV en relación con la supervivencia sin recidivas. Esto reveló la expresión de Sox11 específica del epitelio en tanto compartimentos nucleares como citoplásmicos. Los elevados niveles de Sox11, particularmente Sox11 nuclear, se asociaron a un aumento de RFS y los análisis multifactoriales de la regresión de Cox revelaron que Sox11 era un factor pronóstico independiente de RFS cuando se controla para el grado y la etapa (véase la Tabla 2).

Sox11 desempeña una función importante en la embriogénesis y el remodelado de tejido, y por consiguiente está presente durante la gastrulación y el desarrollo temprano post-gastrulación en todo el embrión (Hargrave M, Wright E, Kun J, et al. Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. Developmental dynamics 1997;210:79-86; Sock E, Rettig SD, Enderich J, et al. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. Molecular and cellular biology 2004;24:6635-44). Después durante el desarrollo, Sox11 se expresa prominentemente en el sistema nervioso en desarrollo y en muchos sitios en todo el embrión donde se producen las interacciones epitelial-mesenquimatosa (Hargrave M, Wright E, Kun J, et al. Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. Developmental dynamics 1997;210:79-86). En los sitios de tales interacciones epitelial-mesenquimatosa, Sox11 puede encontrarse en el compartimento mesenquimatoso o epitelial, y se ha propuesto que participa en el remodelado inductivo (Hargrave M, et al., 1997, arriba). La expresión de Sox11 en la mayoría de los tejidos es transitoria y, como consecuencia, se ha encontrado poca expresión de Sox11 en tejidos adultos terminalmente diferenciados, a diferencia de su amplia expresión durante la embriogénesis (Sock E, Rettig SD, Enderich J, et al. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. Molecular and cellular biology 2004;24:6635-44). Los hallazgos de los inventores complementan estos datos, por lo que la expresión de Sox11 estuvo ausente en tejido normal. Queda por esclarecer completamente la función desempeñada por Sox11 en la tumorigénesis. Como se ha mencionado previamente, fue evidente una marcada regulación por incremento de ARNm de Sox11 en células de CEV. La función funcional exacta de Sox11 en tejidos adultos no se ha entendido completamente, aunque parece que las proteínas Sox desempeñan una función doble (i) unión a ADN y (ii) selección de componente transcripcional, que puede permitir el reclutamiento selectivo de proteínas Sox individuales para genes específicos (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, and Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008;111:800-5). Mientras que varios estudios han descrito la expresión de Sox11 en gliomas (Weigle B, Ebner R, Temme A, et al. Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. Oncology reports 2005;13:139-44), neuroblastomas (Lee CJ, Appleby VJ, Orme AT, Chan WI, and Scotting PJ. Differential expression of SOX4 and SOX11 in medulloblastoma. Journal of neuro-oncology 2002;57:201-14) y MCL (Ek S, Dictor M, Jerkeman M, Jirstrom K, and Borrebaeck CA. Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. Blood 2008;111:800-5), su función funcional en estos tumores no se ha entendido completamente.

En resumen, esta es la primera descripción de la expresión diferencial de Sox11 en CEV. Los hallazgos de los inventores demuestran que Sox11 es un factor pronóstico independiente de RFS mejorado en CEV.

**Tabla 1. Características de pacientes y tumores**

<b>Edad</b>	
Mediana (intervalo)	52 (31-77)
<hr/>	
<b>Histología</b>	
Seroso	50
Mucinoso	4
Endometroide	17
Célula clara	1
Otro	4
<hr/>	
<b>Grado</b>	
Bien diferenciado	12
Moderadamente diferenciado	29
Mal diferenciado	35
<hr/>	
<b>Etapa</b>	
1	0
2	21
3	54
4	1

**Tabla 2. Análisis multifactorial\* de la regresión de Cox de RFS**

HR IC del 95 % Valor de p

45

<b>Sox11</b> (alto / medio frente a bajo)	0,56	0,319 - 0,997	0,049
<b>Etapa</b> (continua)	1,92	0,971 - 3,800	0,061
<b>Grado</b> (Bien y moderadamente diferente a mal diferenciado)	1,08	0,740 - 1,562	0,702

\*Ajustado para todas las otras variables en la tabla  
Abreviaturas: HR = razones de riesgo, IC del 95 % = intervalos de confianza del 95 %

**EJEMPLO B**

**Introducción**

5 El cáncer epitelial de ovario (CEV) comprende tres subtipos histológicos principales (seroso, mucinoso y endometriode) y también puede clasificarse en subgrupos basándose en el estado y grado. Los tumores endometrioides constituyen aproximadamente del 2 al 4 por ciento de todos los tumores de ovario y la mayoría de ellos (aproximadamente el 80 por ciento) son malignos, representando del 10 al 20 por ciento de todos los  
10 carcinomas de ovario.

**Material y métodos**

15 Se tiñeron secciones de CEV de grado alto y de CEV endometriode para Sox11 y se analizaron como se describe previamente (Brennan et al., 2009, European Journal of Cancer, 45(8):1510-1517).

**Resultados y discusión**

20 Como se muestra en las Figuras 5, 6 y 7, la supervivencia global y específica de cáncer puede predecirse usando Sox11 para CEVs endometrioides. Por tanto, como se muestra en las Figuras 8 y 9, la supervivencia global y específica de cáncer puede predecirse usando Sox11 para CEVs de alto grado.

25 Cuando se calcula la probabilidad de supervivencia específica de cáncer, solo se usan los datos de muertes relacionadas con el cáncer, a diferencia de cuando se calcula la supervivencia global.

Estos datos indican que Sox11 puede usarse en tanto CEV de grado alto como cáncer de ovario endometriode para estratificar pacientes en grupos clínicamente relevantes basándose en la supervivencia global y específica de cáncer.

30 En conclusión, Sox11 no es solo un biomarcador útil para CEV como grupo, sino que puede usarse para subgrupos de pacientes con diferentes características clínicas y/o histológicas.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo*.
- 10 2. El uso de un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro*.
- 15 3. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según la reivindicación 1 o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según la reivindicación 2, en donde el CEV pertenece a un subtipo histológico seleccionado del grupo que consiste en células serosa, mucinosa, endometriode y clara.
- 20 4. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según las reivindicaciones 1 o 3, o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según las reivindicaciones 2 o 3 en la detección de la expresión de Sox11 como biomarcador único para diagnosticar o pronosticar cáncer epitelial de ovario (CEV).
- 25 5. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según las reivindicaciones 1, 3 o 4, o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según las reivindicaciones 2, 3 o 4, en donde el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11.
- 30 6. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según las reivindicaciones 1, 3, 4 o 5 o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según las reivindicaciones 2, 3, 4 o 5, en donde el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 35 7. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde el resto de unión comprende o consiste en un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 40 8. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según las reivindicaciones 1, 3 o 4, o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Sox11.
- 45 9. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 4 u 8, o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 u 8, en donde el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
- 50 10. Un resto de unión para su uso en el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vivo* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9, o un uso para el diagnóstico, el pronóstico y/o la detección de cáncer epitelial de ovario (CEV) *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en donde el resto de unión comprende un resto detectable.
- 55 11. Un método *in vitro* de diagnóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV) en un individuo, comprendiendo el método:  
 (a) proporcionar una muestra de células epiteliales del ovario del individuo; y  
 (b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o de ARNm en la muestra de células.  
 en el que los niveles de proteína Sox11 y/o de ARNm son indicativos del individuo que tiene cáncer epitelial de ovario (CEV).
- 60 12. Un método *in vitro* de pronóstico de cáncer epitelial de ovario (CEV) en un individuo, comprendiendo el método:  
 (a) proporcionar una muestra de células de cáncer epitelial de ovario del individuo; y  
 (b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o de ARNm en la muestra de células.  
 65 en el que los niveles de proteína Sox11 y/o de ARNm son indicativos del individuo que tiene una mayor supervivencia sin recidivas (RFS).

13. Un método *in vitro* de detección de células de cáncer epitelial de ovario (CEV) en un individuo, comprendiendo el método:

- 5       (a) proporcionar una muestra de células epiteliales del ovario del individuo; y  
      (b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o de ARNm en la muestra de células.

en el que los niveles de proteína Sox11 y/o de ARNm son indicativos del individuo que tiene células de cáncer epitelial de ovario (CEV).

- 10   14. Un resto de unión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 10 para su uso en un método de obtención de imágenes de células de cáncer epitelial de ovario (CEV) en el cuerpo de un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de dicho resto de unión.

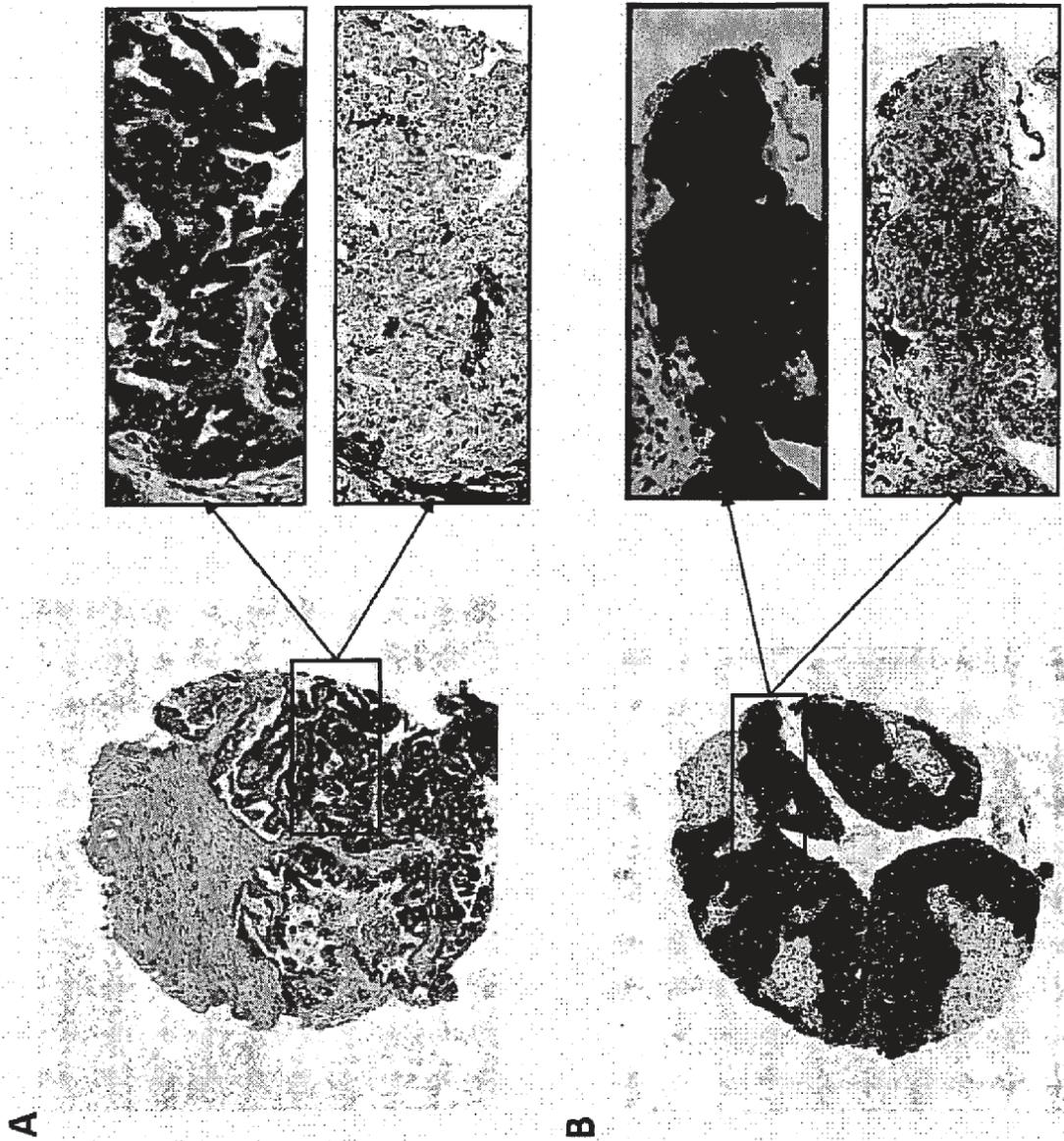


FIGURA 1

FIGURA 2 (A)

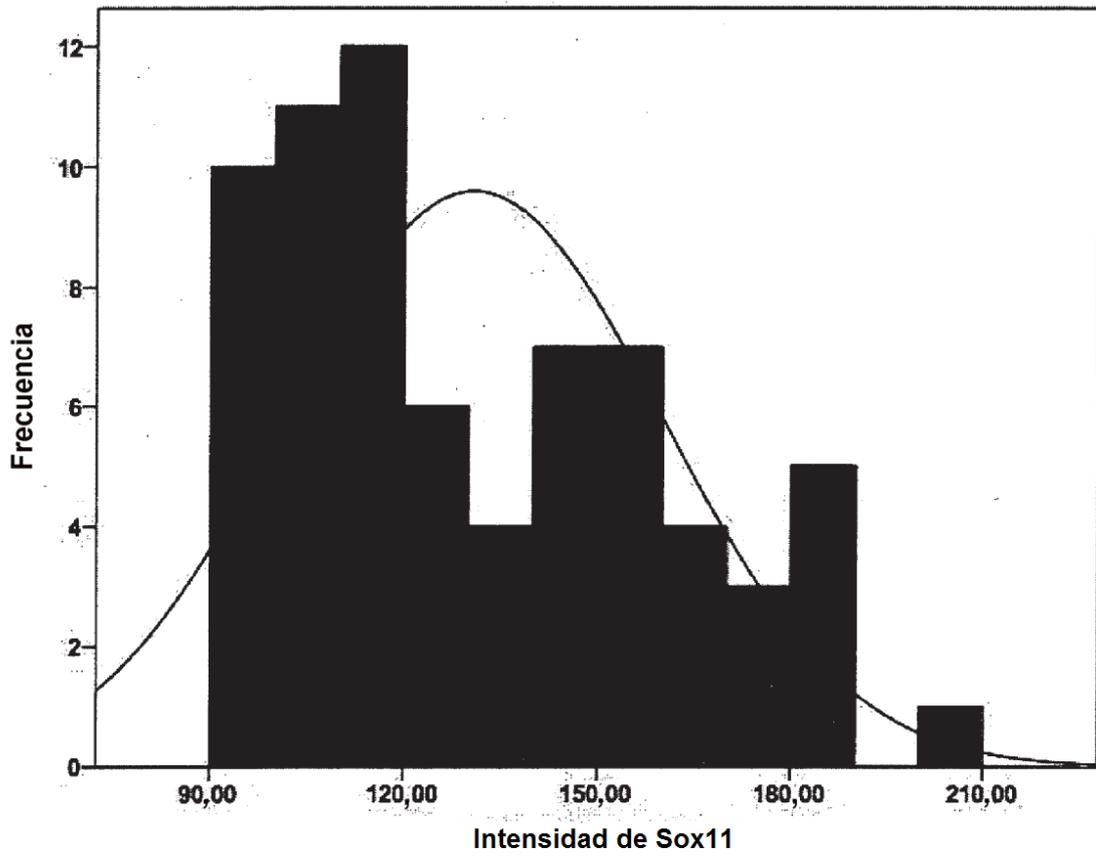


FIGURA 2 (B)

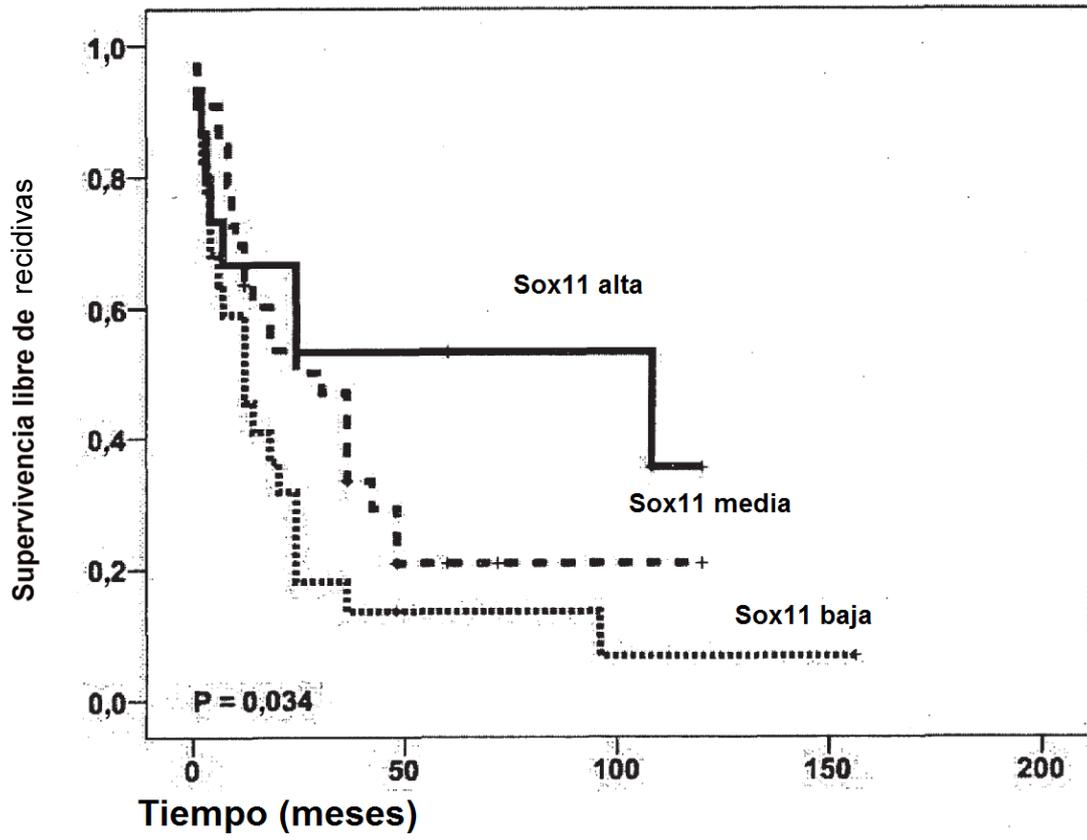
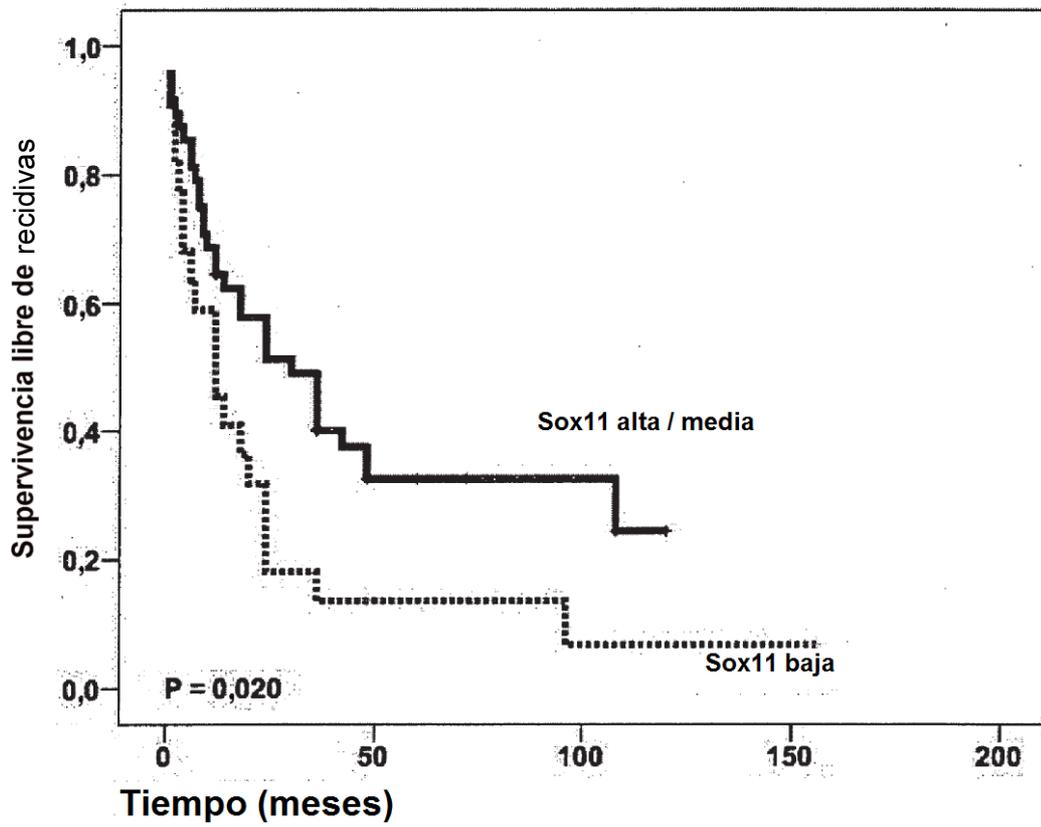


FIGURA 2 (C)



MVQQAESLEAESNLPREALDTEEGEFMACSPVALDESDPDWCKTASGHIKRPM  
NAFMVWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKMLKDSEKIPFIREAERLRL  
KHMADYPDYKYRPRKKPKMDPSAKPSASQSPEKSAAGGGGGSAGGGAGGAK  
TSKGSSKKCGKLGKAPAAAGAKAGAGKAAQSGDYGGAGDDYVLGSLRVSGSGG  
GGAGKTVKCVFLDEDDDDDDDELQLQIQEPDEEDEEPPHQQLLQPPGQQ  
PSQLLRRYNVAKVPASPTLSSSAESPEGASLYDEV RAGATSGAGGGSRLYYSF  
KNITKQHPPPLAQPALSPASSRSVSTSSSSSSGSSSGSSGEDADDLMFDLSLNF  
SQSAHSASEQQLGGGAAAGNLSLSLVDKDLDSFSEGLGSHFEFPDYCTPELS  
EMIAGDWLEANFSDLVFTY

**SEQ ID NO:1**

**FIGURA 3**





ccgtttccagatttgaatTTTTctgttctttatTTTtaacgctgcatcttcgcgtgtgc  
tcagaggtggttgttggcggagaacgccgccgagtgttgacctctagcggggaagggg  
gaaggggaagaggaaaggagagaagtggctcgggtgtctgtttccttctgtccccggggcc  
gtggagctgtcggaggggaaggaggacggtgccccggccgagggggcgccccgcggcgg  
gaccaggtctacgagcgggagggaggcgggagtcgggggaagacgcggcaggccggccga  
ggcaccgccgaggaacatggcatggcctctgtgcatccgagtcgcggtctccggggtgc  
ctgggagggccgaaccactggtgagggcgtggggagcagggggtggcagagggcaccgg  
gcggtagtccgggacgcgcaaggcagagccctgacgctccgggtccccgtgcctggctct  
tcttgctcgcaccgcgtgctcctgggcgcgccccgccgcgggcccttgaggcgcgcg  
agacaccagcgtggcttccccggccccggccccggggaggggaagcctcggggctgcggg  
gtgagaggaagaaagcaaacccggggagcaggcggctgccgacccgcgacccccgggcc  
ctcaccacgcctccccgcgcgccccgctcaggggctgccccggaatcagctccccggggc  
cgccgcaacgaaggtggatccgcatcttgattgttctccgggagcctcctgggggctccg  
gccccggcgcggggcgacccatcccgtggcgctccccgctcgtgaaccccgtttgcc  
tgtccacacccccctcgtccccaccatTTTTctgaccggcctgtgtccccgagccctcg  
cggcagggcccgagcaggcgtcgcggccccggcacgcgcgccccgggctccccccccctt  
ccgagcatccgccgcctctTTTTctgtgggtctgggaggagggaggctgggagggcgtc  
ggggcccagcgtgccagccccggagttcagcctcccgagctgcggcgcgccgcagcggagg  
aggttttcagtggtgattgaaactcactgcaaaatcaccacgactctttcacctactga  
gatgattgaccgaggttggccttccatTTTTactgagatttggcgagaccgaatggaag  
cgtccgcacagtaactgcagctgctaggccagagggccccggcgcccttccccgctccc  
ctccccgcttgcTTTTgccttactgatcttaccaccacccctccccggccccccgactg  
agaactcgggcctctcaccgccccccagcctcccgctctgggcgagcctcctccccagc  
ccccaccctgggatgccaagccagcaagctTTTTgctgcagatggacaggtttctttct  
gtggctTTTTcctttcgataaacatcagatttcagtagtacatttgggaaaagaagggg  
ctgatggcgttaaccaggttctcaatatagaactggatttctggagttgtttaccttacc  
ccacacccccctcaacatgtagactaatgcagccattgggtggtacatttattttagccacg  
gataattgaaccagcggtttacaattgacacgtgctccgtgctgggtgattttatgtggca  
gccctctgctgcagttccgaaactgttggcaacgtaaaccattgataggctgatctat

FIGURA 4 (CONT.)

ES 2 605 254 T3

gtat t t t t g a a g c c t g a a a a c t t g g c a t g t c t t t t c t g t t t t a a t c a t a g a t g a a t c t t g  
g a c a t t t t t c t g t g g t g a g g t g g a a c t t t a a g t a a a t t a g t a a a g t a a t a a t t t g g c t t c  
a g a a t g g g a a g a g a t a g t c a a g a t t t t t t t t t t t t a a a g c c a t g t g g c c t a a c t t g a t a c  
a a a a t a a a a g t a a t t g t t t g g c a a t c t a a a t t t a a a a c c t g t t a g a a c t c a g g a c a g g c  
g c t t c a a t g c g c t t t t t a a c a a t a t t t a a g g c t g t t t t g a t g a g t g c g t t g t g a g a a t c a  
t c t t a a t g a a t t c t t t a t t g a g t g t c t a a a c a t a g t a t a a t a c a c a t g g t a t t c t t g c c  
a c t g g a t a g t c t t c a a t a a a a g t t t a a t t g a t t t t t t t t g t t g g t c t c t t a a g t a a g t c  
t t a t t t t t a a c t a a g c a t t g a c a g a a t a t c t t a a a t g g t a a c c t g g g g g t g g c g g g t g g  
g t g c t g t g t g c a c g g c a g c c t a g c c a g t g g g g a t c c t g c t g t t a t t a t a a g t a g t t c a c  
a g a c t c t g a t g g c a t t t t g g t a a g c t t t c c a t c t t t a a g a a a t t g a a c c a g c a t t c t c t t  
a t t a a t t c t t t a a a c t g t g g a a g t a a t t t c c a g t t c t t a c a c t c t g a t a c g c a t c c c t t t  
t a t t t a a a a a a a a a a a a t g c t a a t a a a a g g c a g t g t a c t t a a a c t g t g c t t t g c a a a t  
a t t g t g t a t g t t a t g a a t g a c t a c a g a c a c t g g g c a a a t t a t t t g t a g a a t g a t t a t c c t  
t t a g c t a g a g a a a g a a a t c a t t a c a a c t c t t t t g g g c a g a g a t g t t t c t t t t t a a t g t t a  
a t c a a g g g g a a g t g a t t t a a a t a t g c a t a a a t g t a g c a g t c a g g g t g a t t t a g t t g c t t t  
t t t c a t g a a a g a a a a g a c t c a a a a g a c a a g a c t t a t t t t t c t c t t c t g g g a c t t g a a a t  
c a t a a t c a t c t g a t a t t a g t a c a g t a c a a g a a a t t a c a t t t g t t t t t a c t t c a g a a t t  
t a a g t g a c t t t t g c c c a a g g a a t t t g a g a a a t a a g g c a a a t a a g t t g c t c t a t t t t a a a g  
t a g t c a t t c a a t a t a a a t a t a t t a t a t c a a t c t t a a c t t t t t a t t c t c t g a t a t g a t t a  
a t a a t a t g t a t a t t c t t a c t t t t c t t c t a a t g g g c a t a t g t a t c c t t g t g g a c a c t t t g a  
g a g a g g t t t t c t t g g a c t c t c c c a t t t a t a g a a t c t t t a t a c t c t t t t a c t g t g t g g t t c  
c c t g c t t t t a a c a g a t t t c t g a g g c a a a t a t a t t t g t g c t t t t t c t t a t g t a g g a a g a c  
c a g c g a a a a t a g t t t a c t g a g t t g t c a a t t t t a t c a g t a g a t a a g a a a c t t t c t t t a t t a  
c a g t t t c a g g g a a g a t t t t t t c a g g a t a t t t c t c a g t t a t t c t a a g g g c c a a a t t t t g t a  
a a a t t t c a t t a g g a a t g t c a g t t t c a a a t a c c c t t t g t a t a g c c t a a g c c t g t g a g g a t  
a a c a a g a a t g a g c c t t a c c t a t c c t a a c a c a g g g a t t t a c a a g t t c c c a a g t a a c c g t c  
t c c a t g t a a c t c t t g a c a t a c t t t t c t g a g a t t t g g c t t a t t t t t a t t a t t g g t t a t t t c  
t c a c t g t t c a t t c t a t t t g a t t t a t t c t a c a a c a t c c c c t t t t a t t t a a t g a t c t g g a a a  
a t t c t g c t c t t t g a t a a a c t c a g g a t t t t t t t g t t c a g t t t t g g t t t t t g c c c c t t c c

FIGURA 4 (CONT.)

tgtggagcctacatTTTTcaaccacaataaagatgaaacaaaatTTtatgaaactgagctct  
 cttccatTTTacttactgctggctTTTTTTTTTTTTTTTTTccttgattcctaccatacc  
 ttcgTTTTTTTcattgtactTTTTtaacactacctatatccattagctgcctaattagtt  
 ttatctgttccatgtggatgcagtgagtttataagagaatTTcacaacaagtagtTTTT  
 tagtgaacttaaaataaacagaatTTtaaggagacctatTTTTtatactcaataaaagca  
 caaaagtgcagaaagtataaaacggcttacaaggagacacaagctcataatgttccat  
 gtataaaagtaataactTTtattgggtagagatattcTTacaagatctagcacctctgcc  
 gtgcacagataggactgtTTTaaatgattTgggaactTTTggttgctgcagttgtgaac  
 agagaacttctctacagagaaacaaaccactaaaagcaatatgaccgagttgagatgtgg  
 TTTccaatgagcaattgggtgaattTaaagcaacctggatgtgcatatgtggaggctcccgt  
 ctactgTTTgatcaaacttTTTTatgtagtcacgtagacttgattTTTTctgctgtga  
 aatgaaaaataaagcaatatgacaaaaagTTtaaaaatgcataaaaaataggattTcc  
 tctaggctcctcgaagagatTTTTtaatatgatgcttTcttactTTcttagacacgTT  
 acattTcccctTccaaaaaaaaaaaaaaaaaggacaactggaagtaatttatcatataaagaa  
 TTTTgatcaaatagatattgacaaaaggccctctgtcacattTTTTcttcatccagctTTT  
 gttcaaaaacagtatgcctcctccctTgaatcacataggagaaacgTTatactccattc  
 tcattaattTcccatTTTgtctactTTTactctTgtacatatgtTgtgggTTtaagagtc  
 TTTTgcattTgtTctgtgacacctTTTTTTgaattgactgtTTTaaacggaggcctatt  
 TTTTccggtTgggactcctagtggTtatggcatcccataatgctTcgTgacggccacca  
 ggacagaaccacctgatgtTTtagagcagTttTcagcatgacactgtTaaacagTgtgta  
 TTTTccaaggccacatgaaactTactTTcttagccactccaggTTTgggagcagaaaagc  
 TgaaaaaccctTTTgtgtagaagtctgagTggTTTgtgggggggacctTTTTtagagTtt  
 gcatgccagcgcacggcctattgctgtgaaacagagagaaggTaaagctacctgaggcag  
 TgcgctggaggatgaagtgtTTgatagcactaggggggaaagaaaatgcatggcaaagtt  
 tcgtctTctcgtagactatctagcatgcagagTgtagTgtgtTgaaacggTgtatgacat  
 TgctgtatcaaagTtgTaaaattaagcattattTattgaaaactatgtatTTTTTTgtaa  
 aaacctgatcacatagagaatatcagTggctTgtgctTgtgctTcgatctaaccagctTc  
 ttgaccacccccctTggTatgcagTgTaatgctcagggtTgaaaatagtactcca  
 atgtctctTTTgcaagagTTTTTcacagaggattacattTgtTcaaaagactctaataaa

**FIGURA 4 (CONT.)**

attgtgtgatcaatcttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

**SEQ ID NO:2**

**FIGURA 4 (CONT.)**

FIGURA 5

Funciones de supervivencia

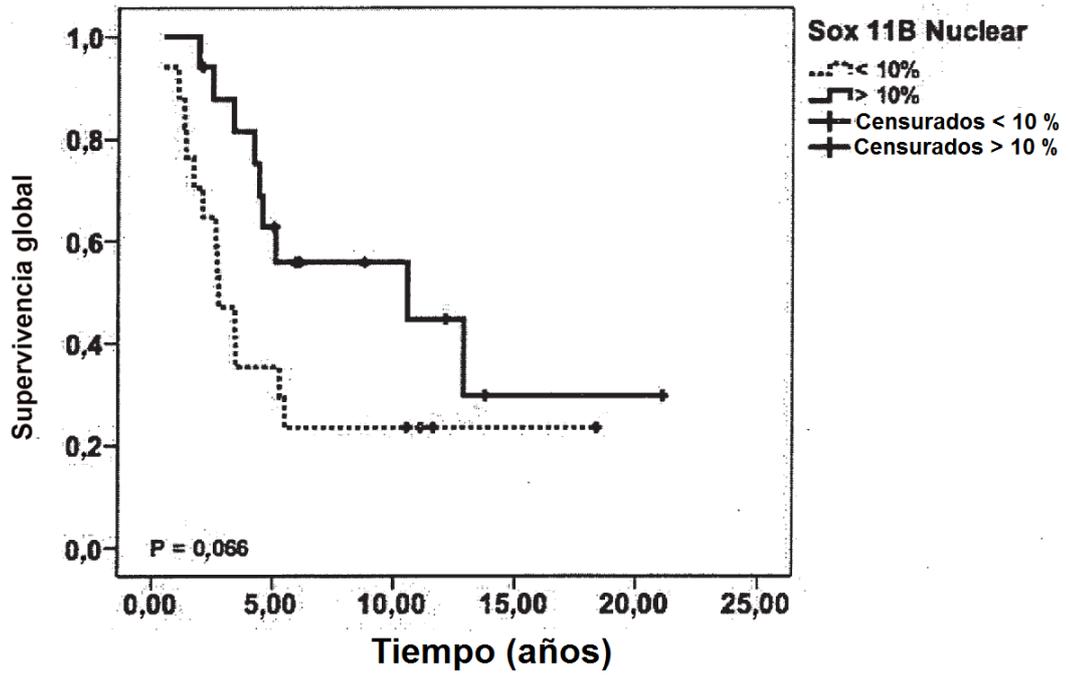


FIGURA 6

Funciones de supervivencia

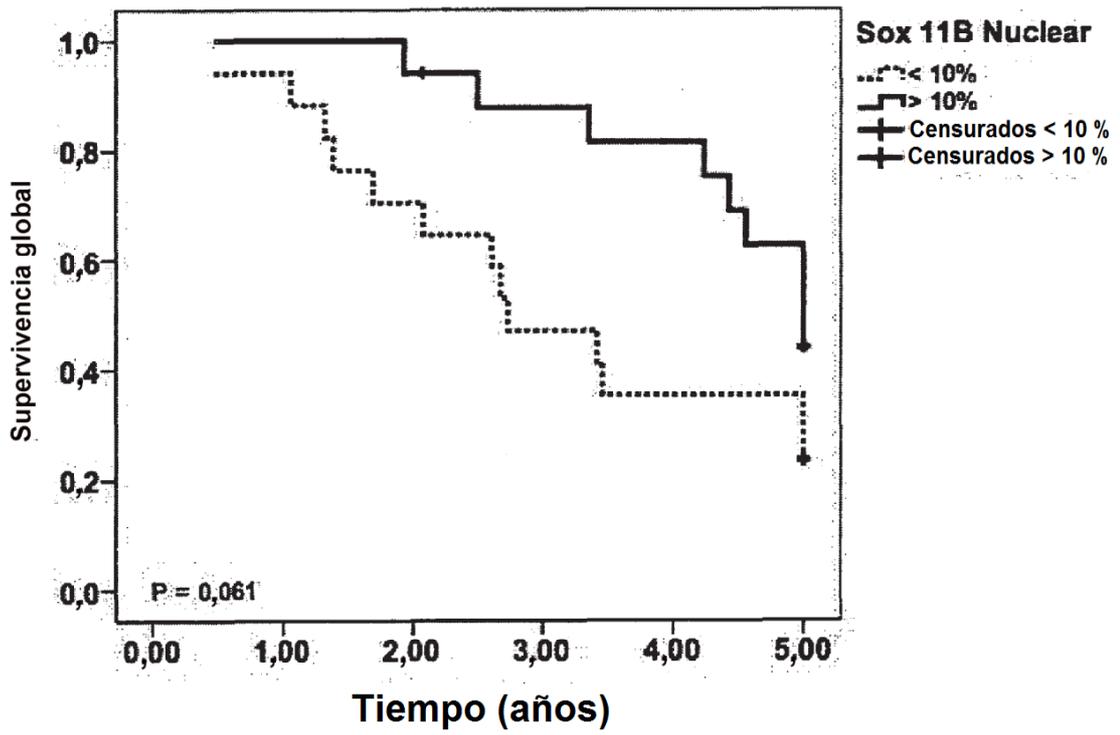


FIGURA 7

Funciones de supervivencia

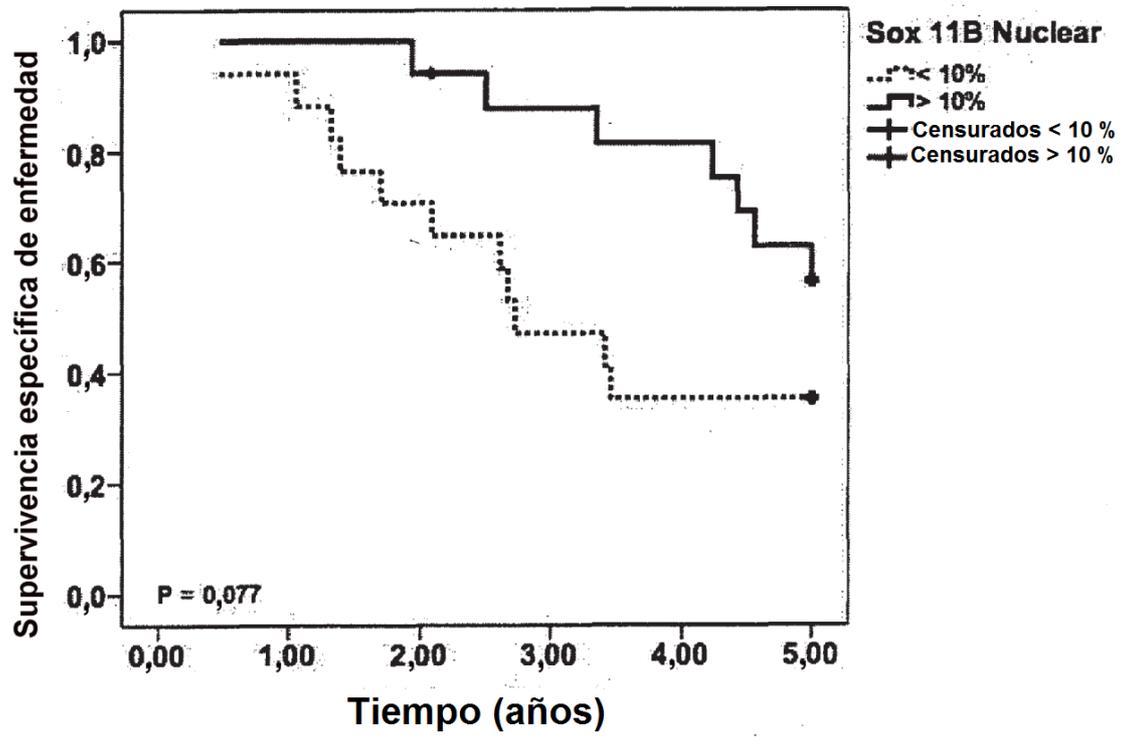


FIGURA 8

Funciones de supervivencia

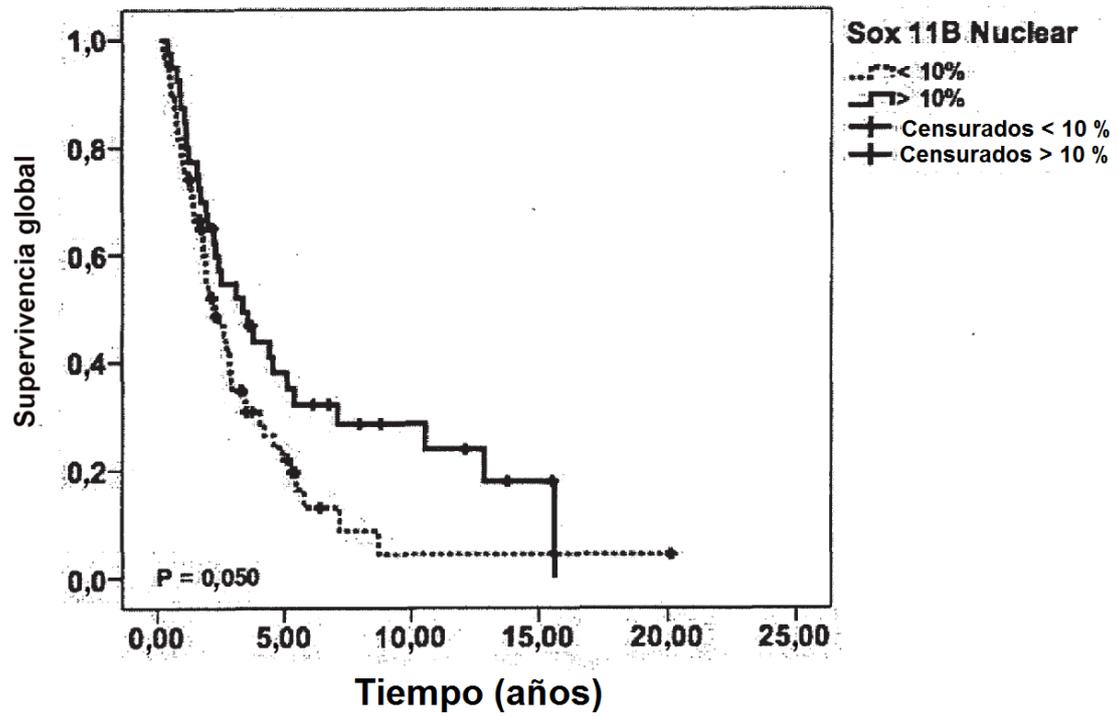


FIGURA 9

Funciones de supervivencia

