

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 244**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/25 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2007 E 15175154 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2982761**

54 Título: **Uso de HE4 y otros marcadores bioquímicos para la evaluación de cánceres endometriales y uterinos**

30 Prioridad:

04.01.2006 US 756131 P

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

17.01.2018

73 Titular/es:

**FUJIREBIO AMERICA, INC. (100.0%)
2751 Centerville Road, Suite 3206
Wilmington, DE 19808, US**

72 Inventor/es:

**MOORE, RICHARD;
SOMERS, ELIZABETH y
ALLARD, JEFFREY W.**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 650 244 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 HE4 y otros marcadores bioquímicos para la evaluación de cánceres endometriales y uterinos

5 Antecedentes de la descripción

La descripción se refiere en general al campo del diagnóstico, gradación, estadificación y pronóstico del cáncer. Más particularmente, esta descripción se refiere al campo de cánceres endometriales. Esta descripción se refiere además al campo del diagnóstico, gradación, estadificación y pronóstico mediante el uso de la expresión de proteínas.

10

El cáncer incluye una gama amplia de enfermedades, que afectan aproximadamente a uno de cada cuatro individuos en todo el mundo. La gravedad del impacto adverso del cáncer es profunda, e influye en las políticas y los procedimientos médicos así como también en la sociedad en general. Debido a que la característica distintiva de muchos tipos de cáncer es la proliferación rápida y no regulada de células malignas, un problema global para mejorar las estrategias sobre el cáncer es la necesidad de una detección y diagnóstico tempranos. La detección temprana está bien considerada como el medio mejor para reducir la mortalidad por cáncer. En respuesta, se han realizado numerosos intentos para desarrollar criterios precisos y confiables para diagnosticar la presencia de una condición maligna. En particular, las investigaciones se han dirigido al uso de marcadores antigénicos definidos serológicamente conocidos como antígenos asociados a tumores, los cuales o bien se expresan únicamente por las células cancerosas o bien se presentan a niveles marcadamente más altos en sujetos que tienen una condición maligna.

15

20

Sin embargo, debido a la heterogeneidad alta de la expresión del antígeno asociado al tumor, por ejemplo la extrema diversidad de antígenos de carcinoma, existe la necesidad de marcadores tumorales adicionales que sean útiles en el diagnóstico del cáncer. Se conocen muchos anticuerpos monoclonales reactivos con antígenos asociados a carcinoma. Dichos anticuerpos monoclonales se unen a una variedad de diferentes antígenos asociados a carcinoma que incluyen glicoproteínas, glicolípidos, y mucinas. Muchos de dichos anticuerpos monoclonales reconocen antígenos asociados a tumores que exhiben expresión restringida en algunos tumores, pero no en otros, que se originan en un linaje celular o tipo de tejido dado.

25

30

Existen relativamente pocos ejemplos de antígenos asociados a tumores que parecen ser útiles para identificar un tipo particular de malignidad. El anticuerpo monoclonal B72.3, por ejemplo, se une específicamente a un antígeno de mucina asociado a tumor de masa molecular alta (> 106 Da) que se expresa selectivamente en varios carcinomas diferentes, lo que incluye la mayoría si no todos los carcinomas ováricos y una abrumadora mayoría de carcinomas de pulmón de células no pequeñas, carcinomas de colon y carcinomas de mama. Sin embargo, la detección de marcadores tumorales asociados a células tal como el antígeno de mucina reconocido por B72.3 después de la resección quirúrgica de un tumor puede ser de utilidad limitada para el tamizaje diagnóstico, en el cual se prefiere la detección precoz de una condición maligna antes de la acumulación de masa tumoral sustancial.

35

40

Una alternativa al diagnóstico de un tipo particular de cáncer mediante el tamizaje de especímenes resecados quirúrgicamente para antígenos asociados a tumores, donde la cirugía invasiva suele indicarse solo después de la detección de una masa tumoral acumulada, sería proporcionar composiciones y métodos para detectar dichos antígenos en muestras obtenidas de sujetos mediante procedimientos no invasivos o mínimamente invasivos. En los carcinomas ováricos, endometriales y otros carcinomas, por ejemplo, existen actualmente varios antígenos asociados a tumores solubles que son detectables en muestras de fluidos biológicos obtenidas fácilmente tales como sueros o secreciones mucosas. Uno de dichos marcadores es el CA125, un antígeno asociado a carcinoma que también se vierte en el torrente sanguíneo, donde es detectable en suero (por ejemplo, Bast y otros, 1983 N. Eng. J. Med. 309:883; Lloyd y otros, 1997 Int. J. Canc. 71:842). Se han medido los niveles de CA125 en suero y otros fluidos biológicos junto con los niveles de otros marcadores, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés), antígeno polipeptídico específico tisular (TPS, por sus siglas en inglés), mucina sialil TN (STN, por sus siglas en inglés) y fosfatasa alcalina placentaria (PLAP, por sus siglas en inglés), en un esfuerzo por proporcionar perfiles diagnósticos y/o pronósticos de carcinomas ováricos, endometriales y de otros carcinomas (por ejemplo, Sarandakou y otros, 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou y otros, 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier y otros, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2945; Kudoh y otros, 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind y otros, 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell y otros, 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi y otros, 1997 Tumori 83:594; Meier y otros, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2949; Meier y otros, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):3019).

55

60

Los niveles elevados de CA125 en suero solo o en combinación con otros indicadores conocidos, sin embargo, no proporcionan un diagnóstico definitivo de malignidad, o de una malignidad particular tal como el carcinoma ovárico o endometrial. Por ejemplo, CA125, CEA y SCC elevados en fluido vaginal y suero se correlacionan más fuertemente con la inflamación en enfermedades ginecológicas benignas, con relación a cáncer de cuello uterino y cánceres del tracto genital (por ejemplo, Moore y otros, 1998 Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 6:182; Sarandakou y otros, 1997 Acta Oncol. 36:755). El CA125 sérico elevado puede acompañar además al neuroblastoma, y los niveles elevados de CEA y SCC pueden acompañar al cáncer colorrectal. Otro marcador, el antígeno de diferenciación mesotelina, se expresa en las superficies de las células mesoteliales normales y además en ciertas células cancerosas, lo que incluye tumores ováricos epiteliales y mesoteliomas. Se conocen en la técnica composiciones y métodos relacionados con mesotelina

65

(Chang y otros, 1992 Canc. Res. 52:181; Chang y otros, 1992 Int. J. Canc. 50:373; Chang y otros, 1992 Int. J. Canc. 51:548; Chang y otros, 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:136; Chowdhury y otros, 1998 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 95:669; Yamaguchi y otros, 1994 J. Biol. Chem. 269:805; Kojima y otros, 1995 J. Biol. Chem. 270:21984) y antígeno relacionado con mesotelina relacionado estructuralmente (MRA; ver, por ejemplo, Scholler y otros, 1999 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:11531), lo que incluye su uso en la detección y terapias del cáncer, como se describió en el documento WO 00/50900 y en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 09/513,597. Existe una necesidad apremiante de marcadores adicionales útiles en el tamizaje diagnóstico de múltiples marcadores.

El documento WO2006/089125 describe métodos para detectar cánceres derivados de Müller mediante la detección de polipéptidos Elafina. Rosen y otros, 2005 Gynecologic oncology 99, 267-277 describen marcadores para la detección de cáncer de ovario epitelial donde la expresión de CA125 es baja o está ausente. Shanta y otros, 2004 Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology 25:3 describen diversas perspectivas sobre los tumores ováricos malignos. El documento WO2003/021273 describe el tamizaje para la presencia de una condición maligna mediante el uso de anticuerpos para detectar el polipéptido HE4a. La patente de Estados Unidos núm. 2005/0214826 describe el uso de los marcadores lectina, prolactina, OPN e IGF-II para el diagnóstico de cáncer de ovario. Drapkin y otros, 2005 Cancer Research 65:6 describen que HE4 se sobreexpresa en cánceres de ovario seroso y endometroide. Hellstrom y otros, 2003 Cancer Research 63, 3695-3700 describen que HE4 es un biomarcador para el carcinoma ovárico. Kirchhoff y otros, 1991 Biology of Reproduction 45, 350-357 describen la secuencia y caracterización molecular de HE4. Zorn y otros, 2005 Clinical Cancer Research 11:6422-6430 analizan el perfil de expresión génica de subtipos serosos, endometrioides y de células claras de cáncer de ovario y endometrio.

Resumen de la descripción

El objeto de esta invención incluye un método para evaluar si una paciente padece un cáncer endometrial. El método comprende evaluar la expresión de HE4 en una muestra de sangre, suero o plasma obtenida de la paciente. La expresión elevada de HE4 es una indicación de que la paciente padece un cáncer endometrial. Si se desea, el nivel de expresión de HE4 puede compararse con un valor de referencia, tal como un valor de referencia que corresponde a la expresión de HE4 en pacientes que no padecen un cáncer endometrial. Alternativamente, la expresión de HE4 en la muestra puede compararse con la expresión de HE4 en una muestra anterior obtenida en un momento anterior a partir de la paciente.

En una modalidad preferida, el método comprende además evaluar la expresión en la muestra de un segundo marcador (por ejemplo, CA125 y/o SMRP). La expresión elevada del segundo marcador es una indicación adicional de que la paciente padece un cáncer endometrial.

La descripción se refiere además a un método para evaluar la respuesta a un tratamiento de una paciente que padece un cáncer endometrial. El método comprende evaluar la expresión de HE4 en muestras obtenidas de la paciente en momentos diferentes durante el tratamiento. La disminución de la expresión de HE4 en un momento posterior (o una disminución en la expresión a lo largo del tiempo) indica que la paciente responde al tratamiento. Puede evaluarse además en la muestra la expresión de un segundo marcador (por ejemplo, CA125 y/o SMRP). La disminución de la expresión del segundo marcador es una indicación adicional de que la paciente responde al tratamiento.

La descripción se refiere además a un método para evaluar la recurrencia en una paciente que se trató por un cáncer endometrial. El método comprende evaluar la expresión de HE4, solo o en combinación con uno o más segundos marcadores, en muestras obtenidas de la paciente después del tratamiento. La expresión elevada de HE4 indica que el cáncer endometrial es recurrente en la paciente, y la expresión elevada del segundo marcador es una indicación adicional de que el cáncer endometrial es recurrente en la paciente. La expresión de HE4 puede, por ejemplo, evaluarse varias veces después del tratamiento. El aumento de la expresión de HE4 a lo largo del tiempo indica que el cáncer endometrial es recurrente en la paciente.

Esta descripción se refiere además a un método para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle un cáncer endometrial. El método comprende evaluar la expresión de HE4, solo o en combinación con uno o más segundos marcadores, en una muestra obtenida de la paciente. La expresión elevada de HE4 se correlaciona con una mayor probabilidad de que la paciente desarrollará un cáncer endometrial, y la expresión elevada del segundo marcador es una indicación adicional de que la paciente desarrollará un cáncer endometrial.

Esta descripción se refiere además a un método de estadificación y/o gradación de un tumor en una paciente que padece un cáncer endometrial. El método comprende evaluar la expresión de HE4, solo o en combinación con uno o más segundos marcadores, en una muestra obtenida de la paciente. El aumento de la expresión de HE4 (y los segundos marcadores, si se evalúa) indica un estadio más avanzado del cáncer y/o un grado más alto del cáncer.

El objeto divulgado en la presente descripción se refiere además a un método para evaluar la necesidad de una intervención terapéutica (por ejemplo, quimioterapia) en una paciente diagnosticada con cáncer endometrial. El método comprende evaluar la expresión de HE4, solo o en combinación con uno o más segundos marcadores, en una muestra obtenida de la paciente. La expresión elevada de HE4 (y los segundos marcadores, si se evalúan) indica la necesidad de la intervención terapéutica en la paciente.

Breve resumen de las tablas

La Tabla 1 es un resumen del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la curva ROC (Característica Operativa del Receptor) obtenidos en los experimentos descritos en el Ejemplo 1 en la presente descripción.

La Tabla 2 presenta los valores medios de marcadores tumorales en suero y la estadificación determinada para cada conjunto de valores agrupados por cada marcador analizado como se describe en el Ejemplo 2.

La Tabla 3 presenta el ROC-AUC calculado para cada marcador tumoral como se describe en el Ejemplo 2

La Tabla 4 presenta el análisis de regresión logística a una especificidad del 90 % para cada marcador tumoral independientemente en las combinaciones expuestas en el Ejemplo 2

La Tabla 5 presenta el análisis de regresión logística a una especificidad del 95 % para cada marcador tumoral independientemente en las combinaciones expuestas en el Ejemplo 2

La Tabla 6 presenta el análisis de regresión logística a una especificidad del 98 % para cada marcador tumoral independientemente en las combinaciones expuestas en el Ejemplo 2

Descripción detallada

La descripción se relaciona con el descubrimiento de que el antígeno HE4 es un indicador de la existencia, el grado, y el estadio de los cánceres endometriales.

El objeto de esta descripción se refiere generalmente a la evaluación del cáncer endometrial en mujeres mediante el uso del marcador HE4 o una combinación de HE4 y otros marcadores biológicos. La evaluación de HE4 con uno o más marcadores adicionales de cáncer endometrial (especialmente los marcadores CA125 y SMRP) puede usarse para diagnosticar la aparición de dichos cánceres en una paciente humana, y para evaluar la respuesta de dichos cánceres a tratamientos de diversos tipos. Además, la evaluación de estos marcadores puede usarse para monitorear la recurrencia de dichos cánceres en una paciente o para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle dichos cánceres.

Los niveles séricos elevados de CA125 se correlacionan con el estadio del cáncer endometrial y la diseminación del tumor al cuello uterino, los ganglios linfáticos y las superficies peritoneales (Ginath y otros, 2002, Int. J. Gynecol. Cancer, 12(4): 372-375; Vuento y otros, 1997, Gynecol. Oncol., 64(1): 141-146; Sood y otros, 1997, Obstet. Gynecol. 90(3): 441-447; Hsieh y otros, 2002, Gynecol. Oncol., 86(1): 28-33; Powell y otros, 2005, J. Reprod. Med., 50(8): 585-590). El CA125 es actualmente el marcador tumoral sérico más útil para la detección de la enfermedad recurrente. Sin embargo, el uso de CA125 para la detección de enfermedades recurrentes es, en el mejor de los casos, limitado. Solamente del 10 al 20 % de las pacientes con enfermedad en estadio temprano y el 25 % de las pacientes con enfermedad recurrente asintomática tienen un CA125 elevado (Niloff y otros, 2002; Duk y otros, 1986, Am. J. Obstet. Gynecol., 155(5): 1097-1102). Se han estudiado varios marcadores tumorales séricos novedosos para su utilidad clínica en cáncer endometrial, los que incluyen CA15.3, CA19.9, CA72.4, CEA, OVX1 y M-CSF (Cherchi y otros 1999, Eur. J. Gynaecol. Oncol., 20(4): 315-317; Takeshima y otros, 1994, Gynecol Oncol 1994; 54(3):321-326; Hareyama y otros, 1996, J. Clin. Pathol., 49(12): 967-970; Olt y otros, 1996, Am. J. Obstet. Gynecol., 174(4):1316-1319; Beck y otros, 1997, Gynecol. Oncol., 65(2):291-296) Más recientemente se emplearon análisis proteómicos para identificar nuevos marcadores de cáncer endometrial, tal como la chaperonina 10 (Yang y otros., 2004, J. Proteome Res., 3(3):636-643). Muy pocos estudios han empleado la estrategia del análisis de múltiples marcadores para usar en cánceres endometriales. Antes de la descripción de los métodos descritos en la presente, la combinación más prometedor hasta la fecha es CA125 con CA19.9 para la detección de enfermedad recurrente (Lo y otros, 1999, Cancer Detect. Prev. 23(5):397-400).

Definiciones

Como se usa en la presente descripción, por el término "muestra" se entiende material que puede relacionarse específicamente con una paciente y a partir del cual puede determinarse, calcularse o inferirse información específica sobre la paciente. Una muestra puede estar compuesta totalmente o en parte de material biológico de la paciente. Una muestra puede ser además material que ha estado en contacto con la paciente de una manera tal que permite realizar pruebas en la muestra las cuales proporcionan información sobre la paciente. Una muestra puede ser además material que ha estado en contacto con otro material que no es de la paciente, pero permite que el primer material se pruebe para determinar la información sobre la paciente, por ejemplo, una muestra puede ser un lavado de una sonda o bisturí. Una muestra puede contactar fuentes de material biológico distintas de la paciente, siempre que un experto en la técnica pueda determinar, sin embargo, la información sobre la paciente a partir de la muestra. Se entiende además que el material extraño o la información que no es la muestra podrían usarse para vincular de manera concluyente a la paciente con la muestra. Para un ejemplo no limitante, una prueba doble ciego requiere una tabla o base de datos para hacer coincidir una muestra con una paciente.

Como se usa en la presente descripción, por el término "paciente" se entiende un organismo biológico que es el sujeto de un ensayo para determinar información sobre el organismo. Aunque, en la mayoría de las modalidades de los métodos descritos en la presente, la paciente es un ser humano, los métodos no se limitan para usarse con un ser humano individual. La paciente puede ser un grupo de seres humanos. La paciente puede ser además parte de un ser humano. Para ejemplos no limitantes de esta modalidad, la paciente podría ser una muestra de tejido no unida a un

cuerpo humano, o una línea celular transformada. En ciertas modalidades, la paciente podría ser además un organismo no humano.

Como se usa en la presente descripción, el término "valor de referencia" se refiere a un valor que se correlaciona estadísticamente con un resultado en particular cuando se compara con un resultado del ensayo. En modalidades preferidas, el valor de referencia se determina a partir de una revisión estadística de estudios que comparan la expresión de HE4 con resultados clínicos conocidos. Algunos de dichos estudios se presentan en la sección de Ejemplos en la presente descripción. Sin embargo, los estudios a partir de la bibliografía y la experiencia de los usuarios de los métodos descritos en la presente pueden usarse además para producir o ajustar un valor de referencia. Los valores de referencia pueden determinarse, además, a partir de la consideración de casos y resultados que son relevantes particularmente para el historial médico de la paciente, la genética, la edad y otros factores.

Como se usa en la presente descripción, el término "fluido corporal" se refiere a un material obtenido de una paciente que tiene consistencia fluida sustancialmente, pero puede tener materia sólida o en partículas asociada con él. Un fluido corporal puede contener además material y partes que no son de la paciente. Por ejemplo, un fluido corporal puede diluirse con agua o contener preservante, tal como EDTA. Los ejemplos no limitantes de fluidos corporales incluyen sangre, suero, fluidos serosos, plasma, linfa, orina, fluido cerebroespinal, saliva, secreciones de la mucosa de los tejidos y órganos secretores, secreciones vaginales, leche materna, lágrimas y fluidos ascíticos tales como los asociados con tumores no sólidos. Los ejemplos adicionales incluyen fluidos de las cavidades pleurales, pericárdicas, peritoneales, abdominales y otras cavidades corporales, y similares. Los fluidos biológicos pueden incluir, además, soluciones líquidas puestas en contacto con un sujeto o fuente biológica, por ejemplo, un medio de cultivo de células y órganos que incluye un medio acondicionado de célula u órgano, fluidos de lavado y similares.

Se obtiene una muestra de una paciente "durante el tratamiento" si la muestra se obtiene como un preludeo a la administración, en el momento de la administración, o después de la administración de una composición o método terapéutico o durante el período de seguimiento que se produce posteriormente. El uso de este término abarca explícitamente situaciones en las cuales se obtienen muestras antes y después de la administración del tratamiento (es decir, para evaluar la eficacia del tratamiento o la recurrencia), así como también situaciones en las cuales se toman múltiples muestras de forma intermitente durante un curso prolongado de tratamiento.

Descripción detallada

Los métodos descritos en la presente pertenecen a HE4 (designado además ocasionalmente en la presente descripción como HE4a), un miembro de la familia de proteínas de "núcleo de cuatro disulfuros" tal como se describe en la presente. La familia de proteínas de "núcleo de cuatro disulfuros" comprende un grupo heterogéneo de pequeñas moléculas estables al ácido y al calor de función divergente y la cual incluye la proteína de núcleo de cuatro disulfuros del epidídimo humano, o "HE4" (Kirchhoff y otros, 1991 Biol. Reprod. 45:350-357; Wang y otros, 1999 Gene 229:101; Schummer y otros, 1999 Gene 238:375).

El ADNc de HE4 se aisló por primera vez del epidídimo humano (Kirchhoff y otros, 1991 Biol. Reprod. 45:350-357), y el ADNc de HE4 se detectó más tarde con frecuencia alta en bibliotecas de ADNc construidas a partir de carcinomas ováricos (Wang y otros, 1999 Gene 229:101; Schummer y otros, 1999 Gene 238:375). HE4a, un nuevo miembro de la familia de proteínas de "núcleo de cuatro disulfuros" se describió en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0108965 A1, solicitud de patente de Estados Unidos núm. 10/233,150. HE4a exhibe una secuencia que es muy similar a, pero distinta de, HE4.

Los métodos descritos en la presente pertenecen a la detección de la superficie celular y/o formas solubles de HE4 de origen natural en sujetos, en particular niveles elevados de dichos polipéptidos en sujetos que tienen carcinomas endometriales. Por lo tanto, esta descripción proporciona composiciones y métodos útiles para la detección y el diagnóstico de una condición maligna en un sujeto mediante la detección específica de dichos polipéptidos HE4 de la superficie celular y/o solubles.

De acuerdo con los métodos descritos en la presente, puede detectarse un polipéptido antigénico HE4 humano soluble (o polipéptido HE4) en una muestra biológica de un sujeto seleccionada de sangre, suero o plasma. Pueden proporcionarse muestras biológicas mediante la obtención de una muestra de sangre, un espécimen de biopsia o un fluido biológico de un sujeto. En los métodos descritos en la presente, se sospecha que el sujeto tiene o está en riesgo de tener una condición maligna, la cual es un cáncer endometrial tal como un carcinoma endometrial.

En algunas modalidades, la muestra biológica incluye al menos una célula de un sujeto. En los métodos descritos en la presente, la muestra biológica es un fluido biológico y puede contener otro marcador tumoral, tal como CA-125 o un polipéptido antigénico relacionado con la mesotelina humana soluble. Los fluidos biológicos son líquidos típicamente a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos de origen natural presentes en, retirados de, expresados o extraídos de cualquier otra manera de un sujeto. Ciertos fluidos biológicos se derivan a partir de tejidos particulares, órganos o regiones localizadas y ciertos otros fluidos biológicos pueden estar más global o sistémicamente situados en un sujeto. Los fluidos biológicos usados en la presente invención se seleccionan de sangre, suero y plasma. En modalidades preferidas, la muestra biológica es una solución líquida libre de células, tal como suero o plasma sanguíneo.

Una "molécula de origen natural en forma soluble" en una muestra puede ser una proteína soluble, polipéptido, péptido, aminoácido o derivado de estos; un lípido, ácido graso o similar, o derivado de este; un carbohidrato, sacárido o similar o derivado de este, un ácido nucleico, nucleótido, nucleósido, purina, pirimidina o molécula relacionada, o derivado de estos, o similares; o cualquier combinación de estos tales como, por ejemplo, una glicoproteína, un glicolípido, una lipoproteína, un proteolípido, o cualquier otra molécula biológica que sea un constituyente soluble o libre de células de una muestra biológica como se proporciona en la presente descripción. Una "molécula de origen natural en forma soluble" se refiere además a una molécula que está en solución o presente en una muestra biológica, lo que incluye un fluido biológico como se proporciona en la presente descripción, y que no se une a la superficie de una célula intacta. Por ejemplo, una molécula de origen natural en forma soluble puede incluir, pero no necesita limitarse a un soluto; un componente de un complejo macromolecular; un material que se desprende, se secreta o se exporta a partir de una célula; un coloide; una micropartícula o nanopartícula u otra partícula en suspensión fina; o similar.

La presencia de una condición maligna en un sujeto se refiere a la presencia de células displásicas, cancerosas y/o transformadas en el sujeto, que incluyen, por ejemplo, células neoplásicas, tumorales, células inhibidas sin contacto o transformadas oncogénicamente, o similares. En el contexto de los métodos descritos en la presente, una condición maligna se refiere a la presencia en un sujeto de células cancerosas que son capaces de secretar, desprender, exportar o liberar un polipéptido antigénico HE4 (o un polipéptido HE4) de tal manera que los niveles elevados de dicho polipéptido son detectables en una muestra biológica que comprende sangre, suero o plasma del sujeto. En modalidades preferidas, por ejemplo, dichas células cancerosas son células epiteliales malignas tales como células de carcinoma, y en modalidades preferidas particularmente dichas células cancerosas son células de mesotelioma maligno, las cuales son variantes transformadas de células epiteliales escamosas o células mesoteliales que se encuentran, por ejemplo, en el recubrimiento de las cavidades pleurales, pericárdicas, peritoneales, abdominales y otras cavidades corporales.

En los métodos descritos en la presente, las células tumorales, cuya presencia significa la presencia de una condición maligna, son células de carcinoma endometrial, lo que incluye células de carcinoma endometrial primario y metastásico. Los criterios para clasificar un tumor maligno como carcinoma endometrial se conocen bien en la técnica, como lo son el establecimiento y la caracterización de líneas celulares de carcinoma endometrial humano a partir de tumores primarios y metastásicos. La presente descripción proporciona la determinación de la presencia de un polipéptido HE4 en tal condición maligna sin una experimentación excesiva.

Los valores de referencia se proporcionan en los ejemplos contenidos en la presente descripción. Dichos valores son adecuados para la práctica de los métodos descritos en la presente. Sin embargo, debe señalarse que el uso de los métodos descritos en la presente no se limitan a esos valores de referencia o esos datos. Los expertos en la técnica pueden obtener un valor de referencia para sus necesidades particulares. Dicho valor de referencia puede obtenerse mediante el análisis de la expresión de HE4 de las pacientes a medida que se someten a procedimientos de biopsia para masas endometriales sospechosas de ser malignas. Los métodos para obtener dichos valores de referencia se incluyen en la presente descripción y se proporcionan en los ejemplos. Los usuarios de los métodos descritos en la presente pueden desear obtener un valor de referencia diferente del proporcionado en la presente descripción para centrarse en categorías específicas de pacientes. Se prevé que dichas categorías pueden incluir edad, antecedentes genéticos, riesgo de cáncer, historial médico, tipo de sangre, características físicas tales como la masa corporal, y otras categorías.

Como se proporciona en la presente descripción, el método de tamizaje para la presencia de una condición maligna en un sujeto cuenta con el uso de un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 o un anticuerpo específico para un polipéptido HE4.

Los anticuerpos que son específicos para un polipéptido antigénico HE4 (o un polipéptido HE4) se generan fácilmente como anticuerpos monoclonales o como antisuero policlonal, o pueden producirse como inmunoglobulinas modificadas genéticamente (Ig) que se diseñan para tener propiedades deseables mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, a modo de ilustración y sin limitación, los anticuerpos pueden incluir IgG recombinantes, proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias derivadas de inmunoglobulina o anticuerpos "humanizados" (ver, por ejemplo, patentes de Estados Unidos núms. 5,693,762; 5,585,089; 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; y referencias citadas en estas) que pueden usarse todos para la detección de un polipéptido HE4 humano de acuerdo con los métodos descritos en la presente. Dichos anticuerpos pueden prepararse como se proporciona en la presente descripción, lo que incluye la inmunización con polipéptidos HE4 como se describe más abajo. Por ejemplo, como se proporciona en la presente descripción, se describen secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos HE4, de manera que los expertos en la técnica pueden preparar rutinariamente estos polipéptidos para su uso como inmunógenos. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales tales como 2H5, 3D8 y 4H4, los cuales se describen con mayor detalle más abajo, pueden usarse para practicar ciertos métodos de acuerdo con los métodos descritos en la presente.

El término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de estos tales como F(ab')₂ y fragmentos Fab, así como también cualquier pareja de unión de origen natural o producida recombinantemente, las cuales son moléculas que se unen específicamente a un polipéptido HE4. Los anticuerpos se

definen como "inmunespecíficos" o específicamente unidos si se unen al polipéptido HE4 con una K_a mayor que o igual a aproximadamente $10^4 M^{-1}$, preferentemente mayor que o igual a aproximadamente $10^5 M^{-1}$, con mayor preferencia mayor que o igual a aproximadamente $10^6 M^{-1}$ y aún con mayor preferencia mayor que o igual a aproximadamente $10^7 M^{-1}$. Las afinidades de las parejas de unión o anticuerpos pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, por ejemplo, las descritas por Scatchard y otros, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660 (1949). La determinación de otras proteínas como parejas de unión de un polipéptido HE4 puede realizarse mediante el uso de cualquiera de una serie de métodos conocidos para identificar y obtener proteínas que interactúan específicamente con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, un sistema de tamizaje de dos híbridos de levadura tal como el descrito en la patente de Estados Unidos núm. 5,283,173 y la patente de Estados Unidos núm. 5,468,614, o el equivalente. Los métodos descritos en la presente incluyen además el uso de un polipéptido HE4, y péptidos basados en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido HE4, para preparar anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido HE4.

Los anticuerpos pueden prepararse generalmente mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En una de dichas técnicas, un inmunógeno que comprende un polipéptido HE4, por ejemplo una célula que tiene un polipéptido HE4 en su superficie o un polipéptido HE4 aislado, se inyecta inicialmente en un animal adecuado (por ejemplo, ratones, ratas, conejos, ovejas y cabras), preferentemente de acuerdo con un esquema predeterminado que incorpora una o más inmunizaciones de refuerzo, y los animales se sangran periódicamente. Los anticuerpos policlonales específicos para el polipéptido HE4 pueden purificarse después a partir de dichos antisueros, por ejemplo, por cromatografía de afinidad mediante el uso del polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos HE4 o variantes de estos, por ejemplo, mediante el uso de la técnica de Kohler y Milstein (1976 Eur. J. Immunol. 6:511-519), y mejoras de esta. Brevemente, estos métodos implican la preparación de líneas celulares inmortales capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada (es decir, reactividad con el polipéptido de mesotelina de interés). Dichas líneas celulares pueden producirse, por ejemplo, a partir de células de bazo obtenidas de un animal inmunizado como se describió anteriormente. Las células del bazo se immortalizan después, por ejemplo, por fusión con una pareja de fusión de células de mieloma, preferentemente una que es singénica con el animal inmunizado. Por ejemplo, las células del bazo y las células de mieloma pueden combinarse con un agente promotor de fusión de membranas tal como el polietilenglicol o un detergente no iónico durante pocos minutos, y sembrarse después a baja densidad en un medio selectivo que soporta el crecimiento de células híbridas, pero no de las células de mieloma. Una técnica de selección preferida usa la selección HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina). Después de un tiempo suficiente, usualmente de aproximadamente 1 a 2 semanas, se observan colonias de híbridos. Las colonias individuales se seleccionan y prueban para la actividad de unión contra el polipéptido. Se prefieren los hibridomas que tienen alta reactividad y especificidad. Los hibridomas que generan anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a los polipéptidos HE4 se contemplan por los métodos descritos en la presente.

Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse a partir de los sobrenadantes de las colonias de hibridomas en crecimiento. Además, pueden emplearse diversas técnicas para mejorar el rendimiento, tales como la inyección de la línea celular de hibridoma en la cavidad peritoneal de un huésped vertebrado adecuado, tal como un ratón u otro huésped adecuado. Los anticuerpos monoclonales pueden cosecharse después a partir del fluido de ascitis o la sangre. Los contaminantes pueden eliminarse de los anticuerpos mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía, filtración en gel, precipitación, y extracción. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse mediante cromatografía sobre Proteína G o Proteína A inmovilizada mediante el uso de técnicas estándar.

Dentro de ciertas modalidades, puede preferirse el uso de fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno. Dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab, los cuales pueden prepararse mediante el uso de técnicas estándar (por ejemplo, mediante digestión con papaína para producir fragmentos Fab y Fc). Los fragmentos Fab y Fc pueden separarse mediante cromatografía de afinidad (por ejemplo, en columnas de proteína A inmovilizada), mediante el uso de técnicas estándar. Dichas técnicas se conocen bien en la técnica, ver, por ejemplo, Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston.

Se conocen en la técnica proteínas de fusión multifuncionales que tienen afinidades de unión específicas para antígenos preseleccionados en virtud de dominios de la región V de inmunoglobulina codificados por secuencias de ADN unidas en marco a secuencias que codifican diversas proteínas efectoras, por ejemplo, como se describe en el documento EP0318554B1, patente de Estados Unidos núm. 5,132,405, patente de Estados Unidos núm. 5,091,513 y patente de Estados Unidos núm. 5,476,786. Dichas proteínas efectoras incluyen dominios polipeptídicos que pueden usarse para detectar la unión de la proteína de fusión mediante cualquiera de una variedad de técnicas con las cuales los expertos en la técnica estarán familiarizados, que incluyen, pero no se limitan a, una secuencia mimética de biotina (ver, por ejemplo, Luo y otros, 1998 J. Biotechnol. 65:225 y referencias citadas en esta), modificación covalente directa con una fracción marcadora detectable, unión no covalente a una molécula indicadora marcada específica, modificación enzimática de un sustrato detectable o inmovilización (covalente o no covalente) sobre un soporte en fase sólida.

Pueden generarse y seleccionarse además anticuerpos de cadena sencilla para usar en los métodos descritos en la presente por un método tal como presentación de fagos (ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos núm. 5,223,409; Schlebusch y otros, 1997 Hybridoma 16:47; y referencias citadas en estas). Brevemente, en este método, las

secuencias de ADN se insertan en el gen III o el gen VIII de un fago filamentoso, tal como M13. Se desarrollaron varios vectores con sitios de multiclonación para la inserción (McLafferty y otros, Gene 128:29-36, 1993; Scott y Smith, Science 249:386-390, 1990; Smith y Scott, Methods Enzymol. 217:228-257, 1993). Las secuencias de ADN insertadas pueden generarse aleatoriamente o pueden ser variantes de un dominio de unión conocido por unirse a un polipéptido HE4. Los anticuerpos de cadena simple pueden generarse fácilmente mediante el uso de este método. Generalmente, los insertos codifican de 6 a 20 aminoácidos. El péptido codificado por la secuencia insertada se muestra en la superficie del bacteriófago. Los bacteriófagos que expresan un dominio de unión para un polipéptido HE4 se seleccionan por unión a un polipéptido HE4 inmovilizado, por ejemplo un polipéptido recombinante preparado mediante el uso de métodos bien conocidos en la técnica y secuencias codificantes de ácidos nucleicos como se describe en la presente. Los fagos no unidos se eliminan mediante un lavado, que contiene típicamente 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, y sin sal o con una baja concentración de sal. Los fagos unidos se eluyen con un tampón que contiene sal, por ejemplo. La concentración de NaCl se incrementa paso a paso hasta que se eluyen todos los fagos. Típicamente, los fagos unidos con mayor afinidad se liberarán mediante concentraciones de sal más elevadas. Los fagos eluidos se propagan en el huésped bacteriano. Pueden realizarse rondas de selección adicionales para seleccionar unas pocas uniones a fago con alta afinidad. Se determina entonces la secuencia de ADN del inserto en el fago unido. Una vez que se conoce la secuencia de aminoácidos predicha del péptido unido, puede prepararse suficiente péptido para usar en la presente descripción como un anticuerpo específico para un polipéptido HE4, mediante medios recombinantes o sintéticamente. Los medios recombinantes se usan cuando el anticuerpo se produce como una proteína de fusión. El péptido puede generarse además como una serie en tándem de dos o más péptidos similares o diferentes, para maximizar la afinidad o la unión.

Para detectar un determinante antigénico reactivo con un anticuerpo específico para un polipéptido HE4, el reactivo de detección es típicamente un anticuerpo, el cual puede prepararse como se describe en la presente. Existe una variedad de formatos de ensayo conocidos por los expertos en la técnica para usar un anticuerpo para detectar un polipéptido en una muestra, que incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorimetría, inmunoprecipitación, diálisis de equilibrio, inmunodifusión y otras técnicas. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston. Por ejemplo, el ensayo puede realizarse en un formato Western blot, en donde una preparación de proteína a partir de la muestra biológica se somete a electroforesis en gel, se transfiere a una membrana adecuada y se deja reaccionar con el anticuerpo. La presencia del anticuerpo en la membrana puede detectarse entonces mediante el uso de un reactivo de detección adecuado, como es bien conocido en la técnica y se describe más abajo.

En otra modalidad, el ensayo implica el uso de un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido para unirse al polipéptido HE4 objetivo y retirarlo del resto de la muestra. El polipéptido HE4 unido puede detectarse después mediante el uso de un segundo anticuerpo reactivo con un determinante antigénico del polipéptido HE4 diferente, por ejemplo, un reactivo que contiene una fracción indicadora detectable. Como un ejemplo no limitante, de acuerdo con esta modalidad, el anticuerpo inmovilizado y el segundo anticuerpo los cuales reconocen determinantes antigénicos diferentes pueden ser dos cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente seleccionados a partir de los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4. Alternativamente, puede usarse un ensayo competitivo, en el cual un polipéptido HE4 se marca con una fracción indicadora detectable y se permite que se una al anticuerpo específico del polipéptido HE4 inmovilizado después de la incubación del anticuerpo inmovilizado con la muestra. El grado al cual los componentes de la muestra inhiben la unión del polipéptido marcado al anticuerpo es indicativo de la reactividad de la muestra con el anticuerpo inmovilizado, y como resultado, es indicativo del nivel de HE4 en la muestra.

El soporte sólido puede ser cualquier material conocido por los expertos en la técnica a los cuales puede unirse el anticuerpo, tal como un pocillo de prueba en una placa de microtitulación, un filtro de nitrocelulosa u otra membrana adecuada. Alternativamente, el soporte puede ser una tira o disco, tal como vidrio, fibra de vidrio, látex o un plástico tal como poliestireno o polivinilcloruro. El anticuerpo puede inmovilizarse en el soporte sólido mediante el uso de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica, las cuales se describen ampliamente en la bibliografía científica y de patentes.

En ciertas modalidades preferidas, el ensayo para la detección del polipéptido antigénico HE4 en una muestra es un ensayo sándwich de dos anticuerpos. Este ensayo puede realizarse al poner en contacto primero un anticuerpo específico para el polipéptido HE4 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 2H5, 3D8 o 4H4) inmovilizado sobre un soporte sólido, comúnmente el pocillo de una placa de microtitulación, con la muestra biológica, de manera que una molécula soluble de origen natural en la muestra y que tiene un determinante antigénico que es reactivo con el anticuerpo se deja que se una al anticuerpo inmovilizado (por ejemplo, es suficiente generalmente un tiempo de incubación de 30 minutos a temperatura ambiente) para formar un complejo antígeno-anticuerpo o un complejo inmune. Los constituyentes no unidos de la muestra se eliminan entonces de los complejos inmunes inmovilizados. A continuación, se añade un segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4, en donde el sitio de combinación del antígeno del segundo anticuerpo no inhibe competitivamente la unión del sitio de combinación del antígeno del primer anticuerpo inmovilizado a un polipéptido HE4 (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como 2H5, 3D8 o 4H4 que no es el mismo que el anticuerpo monoclonal inmovilizado en el soporte sólido). El segundo anticuerpo puede marcarse de manera detectable como se proporciona en la presente descripción, de manera que se puede detectar directamente. Alternativamente, el segundo anticuerpo puede detectarse indirectamente mediante el uso de un anti-anticuerpo secundario marcado de manera detectable (o "segunda etapa"), o mediante el uso de un reactivo de

detección específico como se proporciona en la presente descripción. Los métodos descritos en la presente no se limitan a ningún procedimiento de detección en particular, ya que aquellos que están familiarizados con los inmunoensayos apreciarán que existen numerosos reactivos y configuraciones para detectar inmunológicamente un antígeno en particular (por ejemplo, un polipéptido de mesotelina) en un inmunoensayo sándwich de dos anticuerpos.

5 En ciertas modalidades preferidas de los métodos descritos en la presente mediante el uso del ensayo sándwich de dos anticuerpos descrito anteriormente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal. Podría usarse cualquier combinación de anticuerpos HE4 no competitivos con los métodos descritos en la presente. Lo que incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y combinaciones de estos. En ciertas otras modalidades de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal. En ciertas otras modalidades de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal. En ciertas otras modalidades muy preferidas de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, en estas modalidades, debe señalarse que los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4 como se proporcionan en la presente descripción reconocen determinantes antigénicos diferentes y no competitivos (por ejemplo, epítomos) en polipéptidos HE4, de manera que puede emplearse cualquier combinación por pares de estos anticuerpos monoclonales. En otras modalidades preferidas de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4 y/o el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4 puede ser cualquiera de los tipos de anticuerpos conocidos en la técnica y referidos en la presente descripción, por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, proteínas de fusión de la región V de inmunoglobulina o anticuerpos de cadena simple. Aquellos familiarizados con la técnica apreciarán que los métodos descritos en la presente abarcan el uso de otras formas de anticuerpos, fragmentos y similares en los métodos descritos y reivindicados en la presente descripción.

30 En ciertas modalidades particularmente preferidas, el segundo anticuerpo puede contener un marcador o fracción indicadora detectable tal como una enzima, colorante, radionucleido, grupo luminiscente, grupo fluorescente o biotina, o similares. Podría usarse cualquier fracción indicadora o marcador con los métodos descritos en la presente siempre que la señal de los mismos se relacione directamente o sea proporcional a la cantidad de anticuerpo que permanece en el soporte después del lavado. La cantidad del segundo anticuerpo que permanece unida al soporte sólido se determina después mediante el uso de un método apropiado para el marcador o la fracción indicadora detectable específica. Para los grupos radioactivos, el conteo por centelleo o los métodos autorradiográficos son apropiados generalmente. Los conjugados anticuerpo-enzima pueden prepararse mediante el uso de una variedad de técnicas de acoplamiento (para revisión ver, por ejemplo, Scouten, W. H., *Methods in Enzymology* 135:30-65, 1987). Los métodos espectroscópicos pueden usarse para detectar colorantes (que incluyen, por ejemplo, productos colorimétricos de reacciones enzimáticas), grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. La biotina puede detectarse mediante el uso de avidina o estreptavidina, acoplada a un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Los grupos indicadores de enzimas pueden detectarse generalmente mediante la adición de sustrato (generalmente durante un período de tiempo específico), seguido de análisis espectroscópico, espectrofotométrico u otro análisis de los productos de reacción. Pueden usarse estándares y adiciones estándar para determinar el nivel de antígeno en una muestra, mediante el uso de técnicas bien conocidas.

45 Como se indicó anteriormente, los métodos descritos en la presente se refieren en parte al hallazgo sorprendente de que las formas solubles de los polipéptidos antigénicos HE4 ocurren naturalmente en sujetos, lo que incluye niveles elevados de dichos polipéptidos HE4 solubles en sujetos que tienen carcinomas endometriales.

50 Un método de tamizaje para la presencia de cáncer endometrial de acuerdo con los métodos descritos en la presente puede mejorarse adicionalmente mediante la detección de más de un marcador asociado a tumor en una muestra biológica de un sujeto. Por consiguiente, ciertas modalidades de los métodos descritos en la presente proporcionan un método de tamizaje que, además de detectar la reactividad de un componente de muestra soluble de origen natural con un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4, incluye además la detección de al menos un marcador soluble adicional de cáncer endometrial mediante el uso de métodos establecidos como se conoce en la técnica y proporcionados en la presente descripción. Como se indicó anteriormente, existen actualmente varios antígenos asociados a tumores solubles que son detectables en muestras de fluidos biológicos obtenidas fácilmente. Por ejemplo, ciertas modalidades de los métodos descritos en la presente se refieren a polipéptidos de mesotelina humanos, los cuales incluyen polipéptidos tales como el novedoso polipéptido antigénico relacionado con la mesotelina soluble (MRA) descrito en Scholler y otros (1999 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:11531) y como se describe además en la patente de Estados Unidos núm. 6,770,445.

60 Como se proporciona en la presente descripción, un "polipéptido de mesotelina" es un polipéptido soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye el péptido:

65 1. 1 EVEKTACPSGKKAREIDES Sec. con núm. de ident.:14

y que tiene además al menos un determinante antigénico reactivo con al menos un anticuerpo que tiene un sitio de combinación de antígeno que inhibe competitivamente la unión inmuno-específica de MAb K-1 (Chang y otros, 1996 Proc. Nat. Acad. Sci. Estados Unidos 93:136; el MAb K-1 está disponible en, por ejemplo, Signet Laboratories, Inc., Dedham, Mass.) o de los anticuerpos monoclonales OV569, 4H3, 3G3 o 1A6 como se proporciona en la patente de Estados Unidos núm. 6,770,445.

Por lo tanto, estos antígenos adicionales asociados a tumores solubles para usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente pueden incluir, pero no necesitan limitarse a, antígeno relacionado con mesotelina y mesotelina, CEA, CA125, sialil TN, SCC, TPS y PLAP (ver, por ejemplo, Bast y otros, 1983 N. Eng. J. Med. 309:883; Lloyd y otros, 1997 Int. J. Canc. 71:842; Sarandakou y otros, 1997 Acta Oncol. 36:755; Sarandakou y otros, 1998 Eur. J. Gynaecol. Oncol. 19:73; Meier y otros, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2945; Kudoh y otros, 1999 Gynecol. Obstet. Invest. 47:52; Ind y otros, 1997 Br. J. Obstet. Gynaecol. 104:1024; Bell y otros, 1998 Br. J. Obstet. Gynaecol. 105:1136; Cioffi y otros, 1997 Tumori 83:594; Meier y otros. 1997 Anticanc. Res. 17(4B):2949; Meier y otros, 1997 Anticanc. Res. 17(4B):3019) y puede incluir además cualquier marcador conocido cuya presencia en una muestra biológica pueda correlacionarse con la presencia de cáncer endometrial como se proporciona en la presente descripción.

Ejemplos

Métodos generales

Las técnicas de recombinación estándar de ADN y de clonación molecular usadas en los ejemplos se conocen bien en la técnica y se describen por Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, (1989) (Maniatis) y por T. J. Silhavy, M. L. Bannan, y L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1984) y por Ausubel, F. M. y otros, Current Protocols in Molecular Biology, pub. por Greene Publishing Assoc. y Wiley-Interscience (1987).

El significado de las abreviaturas es el siguiente: "h" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "sec" significa segundo(s), "d" significa día(s), "ml" significa mililitros, "L" significa litros, "U" significa unidades, "pM" significa picomolar, "ROC" significa característica operativa del receptor, "AUC" significa área bajo la curva, "DE" significa desviación estándar, "Mín" significa mínimo, "Máx" significa máximo y "p" significa valor de p.

El objeto de esta descripción se describe a continuación con referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solo con fines de ilustración.

Ejemplo 1

Utilidad de un nuevo marcador tumoral sérico HE4 frente a CA-125 en pacientes con cáncer endometrial.

Existen aproximadamente 40 880 casos nuevos de cáncer de útero diagnosticados en los Estados Unidos, lo que resulta anualmente en 7310 muertes. El cáncer endometrial se estadia quirúrgicamente con aproximadamente el 75 % de las pacientes que presentan enfermedad en estadio I. Los niveles séricos de CA-125 son elevados en el 75 % de las pacientes que presentan enfermedad en estadio avanzado y en solo el 17 % de las pacientes con enfermedad en estadio temprano. El uso de CA-125 para la detección de enfermedades recurrentes es, en el mejor de los casos, limitado. Solo el 25 % de las pacientes con enfermedad recurrente asintomática tienen un CA-125 elevado. Se necesita un mejor marcador que indique enfermedad recurrente temprana. El objetivo de este estudio fue examinar el valor de un nuevo marcador de tumor sérico HE4 y compararlo con CA-125 como marcador de cáncer endometrial.

Los métodos usados en este ejemplo se describen a continuación.

Este fue un estudio prospectivo aprobado por el IRB que comparó HE4 y CA-125 en pacientes que debieron someterse a cirugía con extirpación del útero y los ovarios para una enfermedad benigna o un cáncer de útero. Se obtuvo el consentimiento informado de todas las pacientes. Las muestras de sangre se tomaron antes de la operación y el suero se recolectó y se congeló a -80 °C dentro de las cuatro horas posteriores a su extracción. Los niveles de HE4 y CA-125 se determinaron mediante el uso de ensayos de Fujirebio Diagnostics Inc. Los resultados patológicos quirúrgicos se compararon después con los niveles de marcador tumoral. Se construyeron curvas ROC para cada marcador tumoral.

Los resultados de los experimentos de este ejemplo se describen a continuación.

Un total de 221 pacientes se inscribieron en el protocolo; 128 casos benignos y 93 cánceres endometriales. Las pacientes con cáncer endometrial tuvieron los siguientes estadios quirúrgicos; 62 estadio I, 4 estadio II, 19 estadio III y 8 estadio IV. La media de HE4 para pacientes con cáncer endometrial fue de 161 pM (15 a 1052) y para pacientes con enfermedad benigna de 49.3 pM (14 a 254). La media de CA-125 para pacientes con cáncer endometrial fue de 52 U/ml (3 a 1427) y la enfermedad benigna fue de 46 U/ml (3 a 773). La curva ROC con AUC se calculó para HE4 y CA-125 y se comparó para cada categoría (Tabla 1).

Tabla 1

AUC de la curva ROC			
	HE4 (AUC)	CA-125 (AUC)	valor de p
Benigno-Endometrial	79 %	54 %	< 0,001
Benigno-Estadio I	76 %	48 %	< 0,001
Benigno-Estadio II	88 %	69 %	0.253
Benigno-Estadio III	86 %	66 %	0.002
Benigno-Estadio IV	86 %	66 %	0.006

De la información proporcionada en la presente descripción, puede concluirse que HE4 se eleva en todas las etapas del cáncer endometrial y tiene una sensibilidad mayor que CA-125 para la detección de cáncer endometrial en todos los estadios. HE4 puede usarse como un marcador de enfermedad recurrente temprana en pacientes con cáncer endometrial.

Ejemplo 2

Los métodos usados en este ejemplo se describen a continuación.

La muestra de suero se obtuvo de pacientes inscritas en un protocolo prospectivo aprobado por el IRB en el Hospital Women and Infants / Universidad de Brown y del banco de suero aprobado por el IRB en el Centro Oncológico MD Anderson en la Universidad de Texas. Todas las pacientes que ingresaron al protocolo firmaron el consentimiento informado antes de la recolección de las muestras de sangre del estudio. Todas las muestras de sangre se recolectaron en el período preoperatorio inmediato, se centrifugaron y el suero se extrajo y se congeló a -80°C dentro de las 4 horas de recolección. Posteriormente, todas las pacientes se sometieron a una cirugía que consiste de una laparotomía exploradora con histerectomía bilateral con salpingooforectomía con estadificación quirúrgica completa que incluye lavado, linfadenectomía pélvica y periaórtica. Las muestras de suero obtenidas del Hospital Women and Infants se analizaron en los laboratorios de Fujirebio Diagnostics Inc. Las muestras obtenidas del Centro Oncológico MD Anderson se analizaron in situ. Se obtuvieron muestras de control normal de pacientes sanas. Los niveles de marcadores tumorales séricos para CA125, HE4, CA72.4 SMRP y los niveles urinarios de SMRP se determinaron mediante el uso de ensayos de Fujirebio Diagnostic Inc. Se construyeron curvas ROC para cada marcador tumoral y se determinó la sensibilidad a una especificidad establecida del 95 %.

Los resultados de este ejemplo se describen a continuación

Doscientos treinta y tres muestras de suero de pacientes con cáncer endometrial estadificado quirúrgicamente se obtuvieron junto con 156 muestras de suero de controles sanos.

En el grupo de pacientes con cáncer endometrial estadificado quirúrgicamente hubo 151 estadio I, 21 estadio II, 47 estadio III y 14 estadio IV. Los niveles medios de marcador tumoral sérico para cada marcador analizado se calcularon para los controles sanos, pacientes en estadio quirúrgico I y pacientes en estadio quirúrgico II-IV y se muestran en la Tabla 2. El área bajo las curvas ROC (ROC-AUC) para CA125, HE4, CA72.4, SMRP y los niveles urinarios de SMRP se determinaron para cada marcador (Tabla 3). Se usó el análisis de regresión logística para comparar cada marcador tumoral independientemente y en diversas combinaciones a especificidades establecidas del 90 %, 95 % y 98 % para la muestra de cáncer endometrial frente a los controles (Tablas 4, 5 y 6). La sensibilidad para la diferenciación de los controles frente al cáncer endometrial para los marcadores individuales reveló que HE4 tiene el mejor rendimiento. Para todos los estadios del cáncer endometrial HE4 tenía una sensibilidad del 44,9 % a una especificidad establecida del 95 % en comparación con el 25,2 % para CA125 ($p = 0,0001$). Para los casos del estadio I, HE4 mostró una mejora en la sensibilidad del 20,5 % en comparación con solo CA125 (37,1 % frente a 16,6 %, $p = 0,0001$) (Tabla 3). Para pacientes con enfermedad en estadio II-IV, la sensibilidad para HE4 aumentó a 59,8 % con una especificidad establecida de 95 %, un aumento de 18,3 % sobre la de CA125 ($p = 0,0001$)

Al analizar la combinación de dos marcadores cualquiera, el acoplamiento de HE4 y CA125 o HE4 y el SMRP urinario aumentan la sensibilidad a 48,7 y 49,6 respectivamente para todos los estadios del cáncer endometrial. El análisis de la combinación de HE4 y CA125 en pacientes con enfermedad en estadio II-IV resultó en una sensibilidad del 69,5 % a una especificidad establecida del 95 %. Esto representó un aumento del 24,4 % en la sensibilidad sobre solo CA125 ($p = 0,0001$). La combinación de HE4, CA125 y SMRP urinario produjo la mayor ganancia en la sensibilidad del 26,1 % sobre la de solo CA125 en todas las pacientes con cáncer endometrial. Sin embargo, esto fue solo una ganancia del 2,6 % en la sensibilidad sobre la combinación de HE4 y CA125 y no fue significativamente significativo. También se encontró que HE4 tiene una sensibilidad más alta en pacientes con cáncer endometrial en estadio I que CA125 con una sensibilidad de 37,1 % frente a 16,6 % respectivamente. De nuevo, la combinación de HE4 y CA-125 aumentó la sensibilidad al 39,1 % sobre CA125. Sin embargo, la combinación de HE4, CA125 y SMRP urinario fue la mejor en las

pacientes con enfermedad en estadio I con una sensibilidad del 44,7 %, lo que aumenta la sensibilidad sobre la de solo CA125 en un 28,1 % (p = 0,0001).

Tabla 2

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Diagnóstico	CA125 sérico					
	N	Promedio	DE	Mín	Máx	Mediana
Normal	156	13.9	9.8	3.3	73.6	11.2
Cáncer Endometrial (Estadio I)	151	22.4	35.4	3.0	402.2	13.9
Cáncer Endometrial (Estadios II-IV)	82	75.5	178.5	1.8	1426.6	24.0
Todos los cánceres endometriales	234	41.0	112.0	1.8	1426.6	16.5
Diagnóstico	HE4 sérico					
	N	Promedio	DE	Mín	Máx	Mediana
Normal	156	39.7	18.7	18.0	127.8	35.4
Cáncer Endometrial (Estadio I)	151	107.9	172.3	1.1	1523.0	61.0
Cáncer Endometrial (Estadios II-IV)	82	221.6	487.9	9.2	4062.7	95.4
Todos los cánceres endometriales	234	147.3	323.9	1.1	4062.7	70.7
Diagnóstico	CA72-4 sérico					
	N	Promedio	DE	Mín	Máx	Mediana
Normal	153	3.0	3.6	0.9	24.4	1.6
Cáncer Endometrial (Estadio I)	151	4.4	22.8	0.8	280.3	1.8
Cáncer Endometrial (Estadios II-IV)	82	5.3	11.1	0.5	69.5	2.4
Todos los cánceres endometriales	234	4.7	19.5	0.5	280.3	1.9
Diagnóstico	SMRP sérico					
	N	Promedio	DE	Mín	Máx	Mediana
Normal	156	0.7	0.4	0.1	2.2	0.6
Cáncer Endometrial (Estadio I)	151	0.8	1.2	0.0	13.3	0.6
Cáncer Endometrial (Estadios II-IV)	82	0.6	0.5	0.0	3.4	0.6
Todos los cánceres endometriales	234	0.8	1.0	0.0	13.3	0.6
Diagnóstico	SMRP en orina					
	N	Promedio	DE	Mín	Máx	Mediana
Normal	104	0.0	0.1	0.0	0.5	0.0
Cáncer Endometrial (Estadio I)	150	0.3	0.6	0.0	4.0	0.1
Cáncer Endometrial (Estadios II-IV)	81	0.4	0.9	0.0	4.7	0.1
Todos los cánceres endometriales	232	0.3	0.7	0.0	4.7	0.1

Tabla 3

	Marcador	ROC-AUC (Normal frente a Cáncer endometrial)		
		Estadio I	Estadios II-IV	Todos los estadios
5	CA125	61,5 %	76,3 %	66,7 %
	HE4	76,5 %	83,5 %	78,7 %
10	CA72-4	49,5 %	60,9 %	53,5 %
	SMRP	52,2 %	50,6 %	51,0 %
	SMRP en orina	70,4 %	74,2 %	71,6 %
15	CA125 y HE4	76,4 %	85,9 %	79,1 %
	CA125 y CA72-4	60,8 %	76,7 %	66,2 %
	CA125 y SMRP	61,0 %	79,3 %	66,9 %
20	CA125 y SMRP en orina	75,9 %	81,5 %	77,6 %
	HE4 y CA72-4	76,8 %	83,6 %	78,9 %
	HE4 y SMRP	76,6 %	84,4 %	78,8 %
25	HE4 y SMRP en orina	77,3 %	84,6 %	79,5 %
	CA125 y HE4 y CA72-4	76,6 %	85,7 %	79,3 %
	CA125 y HE4 y SMRP	76,6 %	88,3 %	79,6 %
30	CA125 y HE4 y SMRP en orina	78,0 %	85,9 %	80,3 %
	CA125 y CA72-4 y SMRP	60,1 %	79,6 %	66,2 %
	HE4 y CA72-4 y SMRP	76,8 %	84,3 %	79,0 %
35	HE4 y CA72-4 y SMRP en orina	77,4 %	84,7 %	79,5 %
	CA125 y CA72-4 y SMRP en orina	75,3 %	81,2 %	77,1 %
	CA125 y HE4 y CA72-4 y SMRP	76,8 %	88,0 %	79,7 %
40	CA125 y HE4 y CA72-4 y SMRP en orina	77,9 %	85,9 %	80,1 %
	CA125 y HE4 y CA72-4 y SMRP y SMRP en orina	78,4 %	89,7 %	81,0 %

Tabla 4

	Combinación de marcador	Normal frente a Todos los cánceres endometriales: Sensibilidad a		
		Especificidad del 90 %	Especificidad del 95 %	Especificidad del 98 %
45	CA125	35,9 %	25,2 %	16,7 %
	HE4	55,6 %	44,9 %	35,5 %
	CA72-4	9,4 %	6,8 %	3,4 %
50	SMRP	9,8 %	6,8 %	3,4 %
	SMRP en orina	37,5 %	25,9 %	19,8 %
	CA125 y HE4	59,8 %	48,7 %	39,7 %
55	CA125 y CA72-4	35,0 %	24,8 %	17,1 %
	CA125 y SMRP	35,0 %	24,4 %	17,1 %
60	CA125 y SMRP en orina	44,0 %	35,3 %	24,6 %

ES 2 650 244 T3

5	HE4 y CA72-4	56,0 %	44,4 %	33,8 %
	HE4 y SMRP	53,4 %	43,6 %	35,0 %
	HE4 y SMRP en orina	59,9 %	49,6 %	48,3 %
	CA125 y HE4 y SMRP en orina	61,6 %	51,3 %	46,1 %
10	HE4 y CA72-4 y SMRP en orina	58,6 %	50,0 %	47,4 %

Tabla 5

		Normal frente a Todos los cánceres endometriales (I): Sensibilidad a		
Combinación de marcador		Especificidad del 90 %	Especificidad del 95 %	Especificidad del 98 %
15	CA125	26,5 %	16,6 %	8,6 %
20	HE4	49,0 %	37,1 %	28,5 %
	CA72-4	6,6 %	4,6 %	2,0 %
25	SMRP	11,9 %	7,9 %	4,6 %
	SMRP en orina	36,0 %	23,3 %	16,7 %
	CA125 y HE4	51,7 %	39,1 %	29,8 %
30	CA125 y CA72-4	26,5 %	16,6 %	10,6 %
	CA125 y SMRP	27,2 %	13,2 %	9,9 %
	CA125 y SMRP en orina	36,0 %	28,7 %	20,0 %
35	HE4 y CA72-4	49,7 %	37,1 %	27,2 %
	HE4 y SMRP	47,7 %	37,1 %	27,2 %
	HE4 y SMRP en orina	54,0 %	43,3 %	40,0 %
40	CA125 y HE4 y SMRP en orina	56,7 %	44,7 %	40,7 %
	HE4 y CA72-4 y SMRP en orina	54,0 %	42,0 %	40,0 %

Tabla 6

		Normal frente a Todos los cánceres endometriales (II-IV): Sensibilidad a		
Combinación de marcador		Especificidad del 90 %	Especificidad del 95 %	Especificidad del 98 %
45	CA125	53,7 %	41,5 %	31,7 %
50	HE4	68,3 %	59,8 %	48,8 %
	CA72-4	14,6 %	11,0 %	6,1 %
55	SMRP	6,1 %	4,9 %	1,2 %
	SMRP en orina	40,7 %	30,9 %	25,9 %
	CA125 y HE4	73,2 %	65,9 %	52,4 %
60	CA125 y CA72-4	46,3 %	39,0 %	32,9 %
	CA125 y SMRP	56,1 %	40,2 %	29,3 %
65	CA125 y SMRP en orina	53,1 %	45,7 %	42,0 %

5	HE4 y CA72-4	69,5 %	59,8 %	48,8 %
	HE4 y SMRP	68,3 %	56,1 %	46,3 %
	HE4 y SMRP en orina	69,1 %	67,9 %	59,3 %
	CA125 y HE4 y SMRP en orina	74,1 %	66,7 %	56,8 %
10	HE4 y CA72-4 y SMRP en orina	69,1 %	67,9 %	60,5 %

Listado de secuencias

- 15
- <110> FUJIREBIO AMERICA, INC.
MOORE, Richard
SOMERS, Elizabeth
ALLARD, Jeffrey
- 20
- <120> Uso de HE4 y otros marcadores bioquímicos para la evaluación de cánceres endometriales y uterinos
- 25
- <130> D4496-00110
- <140> PCT/US07/00215
<141> 2007-01-04
- 30
- <150> US 60/756,131
<151> 2006-01-04
- <160> 14
- 35
- <170> Patent In versión 3.3
- <210> 1
- <400> 1
000
- 40
- <210> 2
- <400> 2
000
- 45
- <210> 3
- <400> 3
000
- 50
- <210> 4
- <400> 4
000
- 55
- <210> 5
- <400> 5
000
- 60
- <210> 6
- <400> 6
000
- 65
- <210> 7

ES 2 650 244 T3

5 <400> 7
000

5 <210> 8

10 <400> 8
000

10 <210> 9

15 <400> 9
000

15 <210> 10

20 <400> 10
000

20 <210> 11

25 <400> 11
000

25 <210> 12

30 <400> 12
000

30 <210> 13

35 <400> 13
000

35 <210> 14
<211> 19
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido de mesotelina

45 <400> 14

45 Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1 5 10 15

50 Asp Glu Ser

55

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para evaluar si una paciente sospechosa de tener un cáncer endometrial padece un cáncer endometrial, el método comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de fluido corporal de la paciente, en donde la muestra es una muestra de sangre, suero o plasma, con un anticuerpo específico para el antígeno de HE4 o un fragmento de unión a antígeno de este; y
- 10 (b) detectar la formación del complejo antígeno-anticuerpo por dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en donde la expresión elevada en dicha muestra del antígeno al que se une dicho anticuerpo o fragmento es una indicación de que la paciente padece un cáncer endometrial.
- 15 2. Un método de conformidad con la reivindicación 1, que comprende además evaluar la expresión de CA125 en la muestra, en donde la expresión elevada de CA125 es una indicación adicional de que la paciente padece un cáncer endometrial.