

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 397**

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 15175155 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3026119**

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

30 Prioridad:

04.01.2006 US 756131 P

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

16.03.2020

73 Titular/es:

**FUJIREBIO DIAGNOSTICS, INC. (100.0%)
201 Great Valley Parkway
Malvern, PA 19355-1307, US**

72 Inventor/es:

**MOORE, RICHARD y
SOMERS, ELIZABETH**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 748 397 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 de ovario

5 Antecedentes de la descripción

La descripción se refiere generalmente al campo del diagnóstico, clasificación, estadificación y pronóstico del cáncer. Más particularmente, esta descripción se relaciona con el campo de cánceres de ovario. Además, esta descripción se relaciona con el campo del diagnóstico, clasificación, estadificación y pronóstico del cáncer de ovario que implica la expresión de marcadores biológicos. Más particularmente, esta descripción se refiere a un método para evaluar si una paciente está afectada por un cáncer de ovario en estadio I, un método para diferenciar si una masa pélvica en una paciente es benigna o un cáncer de ovario en estadio I, un método para evaluar la respuesta de una paciente aquejada de cáncer de ovario en estadio I a un tratamiento, y un método para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle un cáncer de ovario en estadio I.

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. Como resultado, se han realizado numerosos intentos para desarrollar criterios precisos y confiables para diagnosticar la presencia de una afección 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.

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.

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.

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). Los niveles de CA 125 en suero y otros fluidos biológicos se han medido junto con los niveles de otros marcadores, por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC), antígeno específico polipeptídico tisular (TPS), la mucina sialil TN (STN) y la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), 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).

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 al 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

5 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 (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), incluyendo sus usos en la detección y terapias contra el cáncer, como se describe en el documento WO 00/50900 y en la patente de los Estados Unidos 6,770,445. Existe una necesidad apremiante de marcadores adicionales
10 útiles en el tamizaje diagnóstico de múltiples marcadores.

15 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).

20 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. HE4a exhibe una secuencia que es muy similar a, pero distinta de, HE4. HE4a ha sido descrito en la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0108965 A1, que se incorpora en la presente como referencia, incluidas las designaciones de SEQ ID NO usadas en esta descripción. Para los propósitos de esta descripción, la detección de HE4 o HE4a se considera sinónimo, y la detección de cualquiera de las moléculas puede usarse en los
25 métodos descritos en la presente. No es importante si HE4a es una molécula distinta de HE4 o si la secuencia de HE4a simplemente representa una corrección de la secuencia de HE4 publicada.

30 El documento WO03021273 describe métodos para la detección de afecciones malignas en las que HE4a se sobreexpresa, incluido el cáncer de ovario. Rosen, y otros (2005) describe que CA 125 como un único marcador no es lo suficientemente sensible como para detectar el cáncer de ovario en estadio temprano. El documento US 2005/214826 describe métodos para determinar si una paciente está afectada, responde a la terapia, es probable que desarrolle un cáncer de ovario. También describe un método para diferenciar una masa pélvica benigna de una maligna.

35 Resumen de la descripción

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar si una paciente padece cáncer de ovario en estadio I, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra de fluido biológico obtenida de la paciente, en donde los niveles elevados de los marcadores se correlacionan con una mayor probabilidad de que la
40 paciente padezca cáncer de ovario en estadio I.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para diferenciar si una masa pélvica en una paciente es benigna o un cáncer de ovario en estadio I, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra de fluido biológico obtenida de la paciente, en donde los niveles elevados de los marcadores se correlacionan con una mayor probabilidad de que la masa pélvica sea un cáncer de ovario en estadio I.
45

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar la respuesta de una paciente afectada por cáncer de ovario en estadio I a un tratamiento, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en muestras de fluidos biológicos obtenidas de la paciente en diferentes momentos durante el tratamiento, en donde los niveles disminuidos de los marcadores en el momento posterior indican que la paciente está respondiendo al tratamiento.
50

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle un cáncer de ovario en estadio I, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra de fluido biológico obtenida de la paciente, en donde los niveles elevados de los marcadores se correlacionan con una mayor probabilidad de que la paciente desarrolle un cáncer de ovario en estadio I.
55

60 En una modalidad del primer aspecto, la paciente exhibe una masa pélvica.

En una modalidad del primer, segundo, tercer y/o cuarto aspecto, el método comprende evaluar los marcadores HE4 y CA125. Adecuadamente, cuando el método es de acuerdo el cuarto aspecto, la paciente exhibe niveles normales del marcador CA125 y un nivel elevado del marcador HE4 se correlaciona con una mayor probabilidad de que la paciente
65 desarrolle un cáncer de ovario en estadio I.

En una modalidad del primer, segundo, tercer y/o cuarto aspecto, el método comprende evaluar los marcadores HE4 y SMRP.

5 En una modalidad del tercer aspecto, el tratamiento es quimioterapia intraperitoneal.

En una modalidad del tercer aspecto, el tratamiento comprende la administración a la paciente de un anticuerpo que se une específicamente con CA125.

10 En la presente descripción se describe un método para evaluar si una paciente (por ejemplo, una paciente que muestra una masa pélvica) padece cáncer de ovario. El método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA 125 y CA72-4, en una muestra obtenida de la paciente. Los niveles elevados de los marcadores se correlacionan con una mayor probabilidad de que la paciente padezca cáncer de ovario. A modo de ejemplo, los marcadores HE4 y CA125 o los marcadores HE4 y SMRP se pueden evaluar en una muestra. Tales métodos pueden usarse para diferenciar si una masa pélvica en una paciente es benigna o un cáncer de ovario.

20 En la presente se describe un método para evaluar la respuesta de una paciente con cáncer de ovario a un tratamiento. El método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA 125 y CA72-4, en muestras obtenidas de la paciente en diferentes momentos durante el tratamiento. La disminución de los niveles de los marcadores en el momento posterior indica que la paciente está respondiendo al tratamiento. El tratamiento puede ser quimioterapia intraperitoneal o la administración a la paciente de un anticuerpo que se une específicamente con CA 125, por ejemplo.

25 En la presente se describe un método para evaluar la recurrencia en una paciente que ha sido tratada por cáncer de ovario. El método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA 125 y CA72-4, en una muestra obtenida de la paciente después del tratamiento. Los niveles elevados de los marcadores indican que el cáncer de ovario es recurrente en la paciente. Los marcadores se pueden evaluar varias veces después del tratamiento, y el aumento de los niveles de los marcadores indica que el cáncer de ovario es recurrente en la paciente.

35 En la presente se describe un método para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle un cáncer de ovario. El método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra obtenida de la paciente. Los niveles elevados de los marcadores se correlacionan con una mayor probabilidad de que la paciente desarrolle un cáncer de ovario.

40 En la presente descripción se describen métodos para estadificar y/o clasificar un tumor en una paciente que padece cáncer de ovario. El método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen tanto el marcador HE4 como otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA 125 y CA72-4, en una muestra obtenida de la paciente. Los niveles crecientes de los marcadores se correlacionan con estadios más avanzados de cáncer de ovario y/o con grados más altos de cáncer de ovario.

Breve resumen de varias tablas

45 La Tabla 1 incluye los resultados del Ejemplo 1 resumidos por una comparación de las sensibilidades de los marcadores usados en los niveles de especificidad establecidos.

La Tabla 2 incluye la distribución por edad en sujetos con y sin malignidad, como se describe en el Ejemplo 2.

La Tabla 3 incluye el diagnóstico clínico de sujetos con enfermedad benigna, como se describe en el Ejemplo 2.

50 La Tabla 4 incluye la histología y la distribución de estadios de los sujetos con cánceres de ovario, como se describe en el Ejemplo 2.

La Tabla 5 incluye los valores medios y promedios de los marcadores, comparando tumores de ovario y benignos, como se describe en el Ejemplo 2.

55 La Tabla 6 incluye una comparación de los valores de sensibilidad de las combinaciones de marcadores en los niveles de especificidad establecidos, como se describe en el Ejemplo 2.

La Tabla 7 incluye una comparación de marcadores tumorales para sujetos con cáncer de ovario en estadio I o enfermedad benigna, como se describe en el Ejemplo 2.

60 La Tabla 8 incluye una comparación de las sensibilidades de la combinación de marcadores tumorales a niveles de especificidad establecidos de 90%, 95% y 98% para sujetos con cáncer de ovario benigno y en estadio I como se describe en el Ejemplo 2.

La Tabla 9 resume los valores de sensibilidad para marcadores únicos y combinaciones de marcadores a niveles de especificidad establecidos de 90%, 95% y 98% en sujetos con enfermedad benigna como se describe en el Ejemplo 3.

Descripción detallada

65

El tema de esta descripción se refiere generalmente a la evaluación del cáncer de ovario en mujeres mediante el uso de una combinación de marcadores biológicos. La evaluación de HE4 solo o en combinación con uno o más marcadores adicionales de cáncer de ovario (especialmente los marcadores CA 125, SMRP y CA72-4) se puede usar para diagnosticar la aparición de un cáncer de ovario en una paciente humana y para evaluar la respuesta de ese cáncer a tratamientos de varios tipos (p. ej., quimioterapia intraperitoneal o tratamiento con un anticuerpo anti-CA125 tal como el producto OVAREX® de la compañía ViRexx de Edmonton, Alberta, Canadá). Además, la evaluación de estos marcadores puede usarse para monitorear la recurrencia de un cáncer de ovario en una paciente o para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle un cáncer de ovario.

10 Definiciones

Como se usa en la presente descripción, por el término una "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 que permite probar el primer material para determinar la información sobre la paciente. 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. Si bien, en la mayoría de los ejemplos de los métodos descritos en la presente descripción la paciente es un ser humano, esos métodos no se limitan a su uso con un 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, la paciente podría ser una muestra de tejido no unida a un cuerpo humano, o una línea celular transformada. En ciertos ejemplos, la paciente también podría ser un organismo no humano.

Como se usa en la presente, el término "valor de referencia" se refiere a un valor que se correlaciona estadísticamente con un resultado particular en comparación con el resultado de un ensayo. En los ejemplos preferidos, el valor de referencia se determina a partir de la revisión estadística de estudios que comparan la expresión de HE4a 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 descripción 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 sustancialmente fluida, 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. Ejemplos no limitantes de fluidos corporales son sangre, suero, fluidos serosos, plasma, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, saliva, secreciones mucosas 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 prelude 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

El cáncer de ovario es la neoplasia ginecológica más letal. Se estima que más de 22,000 mujeres serán diagnosticadas y más de 16,000 morirán de la enfermedad en 2005 (Murray y otros, 2005. Ca. Cancer. J. Clin. 2005; 55 (1): 10-30). La mayoría de estas mujeres se presentan con una masa anexial con o sin evidencia de enfermedad en la parte superior del abdomen. Sin embargo, el veinte por ciento de todas las mujeres en los EE. UU. será diagnosticado con una masa o quiste anexial en algún momento, y solo un pequeño porcentaje de estas representará una neoplasia maligna.

El cáncer de ovario se estadia quirúrgicamente, y los estudios muestran que las pacientes operadas por ginecólogos se clasifican y descartan adecuadamente con mayor frecuencia que las operadas por no ginecólogos. Con frecuencia se deben tomar decisiones clínicas sobre cuándo una paciente con una masa anexial debe ser derivada a un ginecólogo para exploración quirúrgica, en lugar de someterse a una cirugía por un ginecólogo benigno. El marcador tumoral CA 125 se puede usar para ayudar a predecir qué pacientes con una masa pélvica pueden tener cáncer de ovario. Desafortunadamente, muchas afecciones ginecológicas y no ginecológicas benignas también elevan el CA125, disminuyendo su especificidad; también se encuentra un CA125 normal en hasta la mitad de las pacientes con cáncer de ovario en estadio temprano. Se necesita una prueba más precisa para determinar el riesgo de malignidad en pacientes que presentan una masa anexial y, por lo tanto, ayudar a clasificar adecuadamente a las pacientes a un ginecólogo.

La baja tasa de supervivencia en el cáncer de ovario se debe en parte a la falta de detección efectiva junto con la falta de síntomas en la etapa inicial de la enfermedad. Como resultado, el 70% de las pacientes tienen enfermedad en estadio III o IV en el momento del diagnóstico con una tasa de supervivencia a 5 años de aproximadamente el 44% (Murry y otros *ibid*). Para la enfermedad en etapa temprana (estadio I), la tasa de supervivencia a cinco años varía del 74 al 90% (Averette y otros, 1995, *Cancer* 76 (6): 1096-1103; Young y otros, 1990 *N. Engl. J. Med.*, 322 (15): 1021-1027). Desafortunadamente, actualmente no existe una prueba de detección efectiva para el cáncer de ovario y se necesitan marcadores tumorales con una mayor sensibilidad y especificidad. Un marcador, o combinación de marcadores, que pueda distinguir adecuadamente las masas benignas de las malignas también sería un buen candidato para la evaluación como posible prueba de detección.

El marcador tumoral sérico CA125 ha sido el marcador más usado en el cáncer de ovario, sin embargo, no es lo suficientemente sensible ni específico para la detección de la enfermedad en estadio temprano (Einhorn y otros, 1992, *Hematol. Oncol Clin. Norte. A.m.* 6 (4): 843-850; Campbell y otros, 1990, *Br. J. Obstet. Gynaecol* 97 (4): 304- 311; Jacobs y otros, 1993, *BMJ* 306 (6884): 1030-1034; DePriest y otros, 1993, *Gynecol. Oncol* 51 (2): 205-209) De manera decepcionante, no se ha demostrado que el uso combinado de imágenes de ultrasonido y niveles séricos de CA125 en la evaluación de pacientes de alto riesgo disminuya la mortalidad por esta enfermedad (Jacobs y otros, 1990, *Br. J. Obstet. Gynaecol* 97 (10): 922-929; Karlan y otros, 1993 *Am. J. Obstet. Gynecol.* 169 (3): 494-501; Bourne y otros, 1993, *BMJ* 306 (6884): 1025-1029; Schwartz y otros, 1991, *Yale J. Biol. Medicina.* 64 (6): 557-571). También se han evaluado varios marcadores tumorales novedosos para determinar su utilidad en la identificación de carcinomas de ovario.

Recientemente se ha encontrado que los niveles de péptidos solubles relacionados con mesotelina (SMRP) y HE4 están elevados en mujeres con cáncer de ovario (Schaner y otros, 2003, *Mol. Biol. Celda* 14 (11): 4376- 4386; Hough y otros, 2000, *Cancer Res.* 60 (22): 6281 - 6287; Scholler y otros, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.* 96 (20): 1 1531 - 1 1536; Hellstrom y otros, 2003, *Cancer Res.* 63 (13): 3695-3700). Los péptidos solubles relacionados con la mesotelina son miembros de la familia del factor potenciador de megacariocitos y se han detectado tanto en el suero como en la orina de pacientes con cáncer de ovario. En un estudio preliminar, los niveles séricos de SMRP se elevaron en el 92% de las mujeres con cáncer de ovario en comparación con el 10% de las mujeres con afecciones ginecológicas benignas. Usando un análisis de orina, los niveles de SMRP se elevaron en 67% de las personas con cáncer de ovario en comparación con el 14% de las voluntarias sanas y el 20% de las personas con afecciones ginecológicas benignas (Bones y otros, 2003, *Asociación Americana de Química Clínica*, 55ª Reunión Anual).

La osteopontina se ha identificado recientemente mediante técnicas de micromatrices como un posible marcador de cáncer de ovario, y se ha encontrado que está elevada en el suero de pacientes con cáncer de ovario (Kim y otros, *ibid*). Kim y otros demostraron un aumento de la expresión tisular de osteopontina, así como un aumento de los niveles plasmáticos en pacientes con cáncer de ovario; sin embargo, para obtener una sensibilidad del 80% la especificidad cayó solo al 80% (Kim y otros, *ibid*). CA72-4 es una proteína descrita inicialmente a principios de la década de 1980 que se ha demostrado que está elevada en una variedad de carcinomas (Colcher y otros, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 78 (5): 3199-3203), incluido el ovario, cuando se usa como marcador único y cuando se combina con CA125 (Negishi y otros, 1993, *Gynecol Oncol.* 48: 148-154; Skates y otros, 2004, *J. Clinical Oncology* 22 (20): 4059-4066; Fayed y otros, 1998, *Disease Markers* 14: 155-160). La activina y la inhibina también se han investigado como posibles marcadores, aunque la sensibilidad no ha sido alta en el cáncer epitelial (Robertson y otros, 2002, *Molecular and Cellular Endocrinology* 191 (1): 97-103; Robertson y otros, 2004, *Endocrine-Related Cancer*, 11: 35-49).

HE4 es una proteína de 11kDa que es un precursor de la proteína secretora epididimaria E4 con el gen inicialmente identificado mediante la tecnología de micromatrices. En el tejido ovárico normal solo existe una expresión génica mínima con expresión elevada, en los carcinomas de ovario. Los niveles séricos de HE4 se elevaron en 88% de las mujeres con cáncer de ovario en comparación con el 5% de aquellas con afecciones ginecológicas benignas (Kim y otros, 2003, *JAMA* 287 (13) 1671-1679). Curiosamente, las elevaciones en los niveles de ensayo SMRP y HE4 fueron independientes del estadio de la enfermedad y el estado de la menopausia. Usando el ensayo urinario, los niveles de SMRP se elevaron en 50% de las pacientes en estadio I y el 79% de las pacientes en estadio II, lo que aumenta la posibilidad de una mayor detección de la enfermedad en estadio temprano (Bones y otros, *ibid*).

Los métodos descritos en la presente pertenecen a HE4a, un miembro de la familia de proteínas "núcleo de cuatro disulfuros" como se describe en en la presente, que exhibe una secuencia que es muy similar, pero distinta de, HE4 (Kirchhoff y otros, 1991 *Biol. Reproducir* 45: 350-357). Como se describe en la presente, se muestra inesperadamente que HE4a (y no HE4) se sobreexpresa en ciertos tumores malignos, por ejemplo, en carcinomas endometriales, así como

5 en una serie de otros tejidos humanos, en marcado contraste con el patrón de expresión restringido de HE4 en las células epiteliales del epidídimo humano (Kirchhoff y otros, 1991). Los métodos descritos en la presente descripción también se refieren en parte a composiciones y métodos para la detección de la superficie celular y/o formas solubles de HE4a que ocurren naturalmente en sujetos, incluidos niveles elevados de dichos polipéptidos en sujetos que tienen ciertos carcinomas (p. ej., carcinomas endometriales). Por lo tanto, esta descripción proporciona composiciones y métodos útiles para la detección y diagnóstico de una afección maligna en un sujeto mediante la detección específica de dicha superficie celular y/o polipéptidos HE4a solubles.

10 De acuerdo con los métodos descritos en la presente, un polipéptido antigénico HE4a humano soluble (o polipéptido HE4a) puede detectarse en una muestra biológica de un sujeto o fuente biológica. Las muestras biológicas pueden proporcionarse mediante la obtención de una muestra de sangre, una muestra de biopsia, un explante de tejido, un cultivo de órganos, un fluido biológico o cualquier otra preparación de tejido o células de un sujeto o una fuente biológica. El sujeto o la fuente biológica puede ser un animal humano o no humano, un cultivo celular primario o una línea celular adaptada al cultivo que incluye, pero no se limita a líneas celulares genéticamente modificadas que pueden contener 15 secuencias de ácido nucleico recombinante episomal o cromosómicamente integradas, líneas celulares inmortalizadas o inmortalizables, líneas celulares híbridas de células somáticas, líneas celulares diferenciadas o diferenciables, líneas celulares transformadas y similares. En ciertos ejemplos preferidos de los métodos descritos en la presente, se puede sospechar que el sujeto o la fuente biológica tienen o están en riesgo de tener una afección maligna, que en ciertos ejemplos preferidos adicionales puede ser un cáncer endometrial tal como un carcinoma endometrial y en otros ejemplos preferidos de los métodos descritos en la presente descripción se puede conocer si el sujeto o la fuente biológica están 20 libres de riesgo o presencia de tales enfermedades.

25 En algunos ejemplos, la muestra biológica incluye al menos una célula de un sujeto o fuente biológica, y en ciertos otros ejemplos preferidos, la muestra biológica es un fluido biológico que contiene otro marcador tumoral, tal como CA-125 o un polipéptido del antígeno relacionado con mesotelina humana soluble. Los fluidos biológicos son típicamente líquidos a temperaturas fisiológicas y pueden incluir fluidos naturales presentes en, extraídos de, expresados o de lo contrario extraídos de un sujeto o fuente biológica. 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 o fuente biológica. Los ejemplos no limitantes de fluidos corporales incluyen sangre, suero y fluidos serosos, plasma, linfa, 30 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, 35 fluidos de lavado y similares. En otros ejemplos preferidos, la muestra biológica es una solución líquida libre de células, tal como suero sanguíneo, plasma o el sobrenadante de orina centrifugada.

40 En ciertos otros ejemplos preferidos, la muestra biológica comprende una célula intacta, y en ciertos otros ejemplos preferidos, la muestra biológica comprende un extracto celular que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido antigénico HE4a que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en las SEQ ID NOS: 11 o 13, o un fragmento o variante de estas. En aún otros ejemplos de los métodos descritos en la presente descripción, se desea que las células se rompan o lisen física o químicamente antes del ensayo para proporcionar el contenido celular para el análisis.

45 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 50 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 55 micropartícula o nanopartícula u otra partícula en suspensión fina; o similar.

60 La presencia de una afección 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. A modo de ilustración y no de limitación, en el contexto de los presentes métodos descritos en la presente, una afección maligna puede referirse además a la presencia en un sujeto de células cancerosas que son capaces de secretar, diseminar, exportar o liberar un polipéptido de antígeno HE4a (o un polipéptido HE4a) de manera que se puedan detectar niveles elevados de dicho polipéptido en una muestra biológica del sujeto. En modalidades preferidas, por ejemplo, las células cancerosas son células epiteliales malignas tales como células de carcinoma, y en ejemplos particularmente preferidos las células cancerosas son células de mesotelioma maligno, las cuales son variantes transformadas de células epiteliales escamosas o células mesoteliales que se encuentran, por 65 ejemplo, en el revestimiento de cavidades pleurales, pericárdicas, peritoneales, abdominales y otras cavidades corporales.

En los ejemplos más preferidos de los métodos descritos en la presente descripción, las células tumorales, cuya presencia significa la presencia de una afección maligna, son células de carcinoma endometrial, que incluyen 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. En otros ejemplos, la afección maligna puede ser mesotelioma, carcinoma pancreático, carcinoma de pulmón de células no pequeñas u otra forma de cáncer, que incluye cualquiera de los diversos carcinomas, tales como carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas, y también incluye sarcomas y neoplasias hematológicas (p. ej., leucemias, linfomas, mielomas, etc.). La clasificación de estas y otras afecciones malignas es conocida por aquellos que están familiarizados con la técnica, y la presente descripción proporciona la determinación de la presencia de un polipéptido HE4a en una afección maligna de este tipo sin experimentación excesiva.

Los valores de referencia se proporcionan en los ejemplos contenidos en la presente descripción. Los valores son adecuados para la práctica de los métodos descritos en la presente descripción. Sin embargo, debe señalarse que el uso de los métodos descritos en la presente descripción 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. Un valor de referencia de este tipo puede obtenerse mediante el análisis de la expresión de HE4a de las pacientes a medida que se someten a procedimientos de biopsia para masas endometriales o uterinas 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 afección maligna en un sujeto cuenta con el uso de un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a o un anticuerpo específico para un polipéptido HE4a.

Los anticuerpos que son específicos para un polipéptido de antígeno HE4a (o un polipéptido HE4a) se generan fácilmente como anticuerpos monoclonales o como antisueros policlonales, o pueden producirse como inmunoglobulinas (Ig) genéticamente modificadas que están diseñadas para tener propiedades deseables usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, los anticuerpos pueden incluir IgG recombinantes, proteínas de fusión quiméricas que tienen secuencias derivadas de inmunoglobulina o anticuerpos "humanizados" (ver, por ejemplo, las patentes núms. 5,693,762; 5,585,089, 4,816,567; 5,225,539; 5,530,101; y referencias citadas allí) que pueden usarse para la detección de un polipéptido HE4a humano de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción. Los anticuerpos pueden prepararse como se proporciona en la presente descripción, lo que incluye la inmunización con polipéptidos HE4a como se describe más abajo. Por ejemplo, como se proporciona en la presente descripción, se describen secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos HE4a, 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, que se describen con mayor detalle más abajo, pueden usarse para practicar ciertos métodos de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción.

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 HE4a. Los anticuerpos se definen como "inmuno-específicos" o específicamente unidos si se unen al polipéptido HE4a 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 HE4a 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 No. 5,283, 173 y la patente de Estados Unidos núm. 5,468,614, o el equivalente. Los métodos descritos en la presente descripción también incluyen el uso de un polipéptido HE4a y péptidos basados en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido HE4a, para preparar parejas de unión y anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido HE4a.

Los anticuerpos generalmente pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). En una de esas técnicas, un inmunógeno que comprende un polipéptido HE4a, por ejemplo, una célula que tiene un polipéptido HE4a en su superficie o un polipéptido HE4a 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 HE4a pueden purificarse después a partir de tales antisueros, por ejemplo, por cromatografía de afinidad con el uso del polipéptido acoplado a un soporte sólido adecuado.

Los anticuerpos monoclonales específicos para polipéptidos HE4a o variantes de los mismos pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein (1976 Eur. J. Immunol. 6:511-519), y mejoras a los mismos. 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 HE4a 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 algunos ejemplos, 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 EP-B1-0318554, la patente de Estados Unidos núm. 5,132,405, la patente de Estados Unidos núm. 5,091,513 y la 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.

Los anticuerpos de cadena sencilla para usar en los métodos descritos en la presente pueden generarse y seleccionarse además 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 estos). 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 and Smith, Science 249:386-390, 1990; Smith and 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 HE4a. 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 HE4a se seleccionan por unión a un polipéptido HE4a 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 descripción. 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 HE4a, 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 HE4a, el reactivo de detección es típicamente un anticuerpo, el cual puede prepararse como se describe en la presente descripción. 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 HE4a objetivo y eliminarlo del resto de la muestra. El polipéptido HE4a unido puede detectarse después mediante el uso de un segundo anticuerpo reactivo con un determinante antigénico del polipéptido HE4a diferente, por ejemplo, un reactivo que contiene una fracción indicadora detectable. Como un ejemplo no limitante, de acuerdo con este ejemplo, el anticuerpo inmovilizado y el segundo anticuerpo que reconocen determinantes antigénicos diferentes pueden ser dos cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente seleccionados de los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4. Alternativamente, puede usarse un ensayo competitivo, en el cual un polipéptido HE4a se marca con una fracción indicadora detectable y se permite que se una al anticuerpo específico del polipéptido HE4a 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 HE4a 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 ciertos ejemplos preferidos, el ensayo para la detección del polipéptido antigénico HE4a 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 HE4a (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 HE4a, 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 HE4a (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 particular, ya que aquellos que están familiarizados con los inmunoensayos apreciarán que existen numerosos reactivos y configuraciones para la detección inmunológica de un antígeno particular (por ejemplo, un polipéptido de mesotelina) en un inmunoensayo sándwich de dos anticuerpos.

En ciertos ejemplos preferidos de los métodos descritos en la presente descripción que usan el ensayo sandwich de dos anticuerpos descrito anteriormente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal. Podría usarse cualquier combinación de anticuerpos HE4a no competitivos con los métodos descritos en la presente descripción. Lo que incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y combinaciones de estos. En ciertos otros ejemplos de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal. En ciertos otros ejemplos de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo policlonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal. En ciertos otros ejemplos altamente preferidos de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal y el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a es un anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, en estos ejemplos se debe tener en cuenta que los anticuerpos monoclonales 2H5, 3D8 y 4H4, como proporcionan en la presente descripción, reconocen determinantes antigénicos distintos y no competitivos (por ejemplo, epítomos) en los polipéptidos HE4a, de modo que se puede emplear

5 cualquier combinación por pares de estos anticuerpos monoclonales. En otros ejemplos preferidos de los métodos descritos en la presente, el primer anticuerpo inmovilizado específico para un polipéptido antigénico HE4a y/o el segundo anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a 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. Los fragmentos F(ab¹).sub.2, proteínas de fusión de la región V de inmunoglobulina o anticuerpos monocatenarios. Aquellos familiarizados con la técnica apreciarán que los métodos descritos en la presente abarcan el uso de otras formas de anticuerpos, fragmentos, derivados y similares en los métodos descritos y reivindicados en la presente descripción.

10 En ciertos ejemplos particularmente preferidos, 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. Cualquier fracción indicadora o marcador podría usarse 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). Se pueden usar métodos espectroscópicos para detectar colorantes (incluidos, por ejemplo, productos colorimétricos de reacciones enzimáticas), grupos luminiscentes y grupos fluorescentes, la biotina se puede detectar usando avidina o estreptavidina, junto con un grupo indicador diferente (comúnmente un grupo radioactivo 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.

25 En otros ejemplos, los métodos descritos en la presente implican el uso de un polipéptido antigénico HE4a como se proporciona en la presente para detectar la presencia de una afección maligna mediante la detección de anticuerpos inmuno-específicamente reactivos en una muestra biológica de una fuente o sujeto biológico. De acuerdo con este ejemplo, un polipéptido antigénico HE4a (o un fragmento o variante del mismo que incluye un polipéptido antigénico HE4a truncado como se proporciona en la presente) se marca de manera detectable y se pone en contacto con una muestra biológica para detectar la unión al polipéptido antigénico HE4a de un anticuerpo de origen natural en forma soluble en la muestra. Por ejemplo, el polipéptido antigénico HE4a puede marcarse biosintéticamente usando las secuencias descritas en la presente junto con métodos bien conocidos, tales como la incorporación durante la traducción in vitro de un aminoácido fácilmente detectable (por ejemplo, marcado radiactivamente), o usando otras fracciones indicadoras detectables tales como las descritas anteriormente. Sin desear limitarse a la teoría, este ejemplo de los métodos descritos en la presente contempla que ciertos polipéptidos HE4a tales como los polipéptidos de fusión HE4a descritos en la presente, pueden proporcionar péptidos que son particularmente inmunogénicos y dan lugar a anticuerpos específicos y detectables. Por ejemplo, de acuerdo con esta teoría, ciertos polipéptidos de fusión HE4a pueden representar antígenos "no propios" que provocan una respuesta inmune ávida, mientras que los polipéptidos HE4a que carecen de dominios de fusión pueden ser vistos por el sistema inmune como más parecidos a los antígenos "propios" que no provoca fácilmente inmunidad humoral o mediada por células.

Como se señaló anteriormente, los presentes métodos descritos pertenecen en parte al sorprendente hallazgo de que las formas solubles de polipéptidos antigénicos HE4a se producen naturalmente en sujetos, incluyendo niveles elevados de esos polipéptidos HE4a solubles en sujetos que tienen ciertos carcinomas.

45 Un método de detección para la presencia de una afección maligna 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, en ciertos ejemplos, los métodos descritos en la presente proporcionan un método de detección que, además de detectar la reactividad de un componente de muestra soluble de origen natural con un anticuerpo específico para un polipéptido antigénico HE4a, también incluye la detección de al menos un marcador soluble adicional de una afección maligna usando métodos establecidos conocidos en la técnica y proporcionados en la presente descripción. Como se señaló anteriormente, actualmente hay una serie de antígenos asociados a tumores solubles que son detectables en muestras de fluidos biológicos fácilmente obtenidos, por ejemplo, ciertos ejemplos de los métodos descritos en la presente se refieren a polipéptidos de mesotelina humana, que incluyen polipéptidos como el nuevo polipéptido antigénico relacionado a mesotelina (MRA) soluble 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, un "polipéptido de mesotelina" es un polipéptido soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que incluye la secuencia de polipéptidos EVEKTACPSGKKAREIDES (SEQ ID NO: 14) y además tiene 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; MAb K-1 está disponible de, 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 6,770,445.

65 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 al menos una afección maligna como se proporciona en la presente descripción.

Alternativamente, se pueden detectar secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos HE4a, usando técnicas de hibridación estándar y/o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los expertos en la técnica pueden diseñar sondas y cebadores adecuados basados en las secuencias de ADNc de HE4a proporcionadas en la presente descripción. Los ensayos generalmente se pueden realizar usando cualquiera de una variedad de muestras obtenidas de una fuente biológica, tal como células eucariotas, bacterias, virus, extractos preparados a partir de dichos organismos y fluidos encontrados dentro de organismos vivos.

15

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).

25

El significado de las abreviaturas es el siguiente: "h" significa hora(s), "min" significa minuto(s), "seg" significa segundo(s), "d" significa día(s), "mL" significa mililitros, "L" significa litros, "U" significa unidades, "pM" significa picomolar.

30

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

Ejemplo 1

Desarrollo de un ensayo de marcadores múltiples usando marcadores tumorales séricos novedosos para la detección de carcinoma de ovario.

35

Veinte por ciento de todas las mujeres en los EE. UU. recibirán un diagnóstico de una masa o quiste anexial, y un pequeño porcentaje de estas representará una neoplasia maligna. El cáncer de ovario se estadia quirúrgicamente, y los estudios muestran que las pacientes operadas por ginecólogos se clasifican y descartan adecuadamente con mayor frecuencia que las operadas por no ginecólogos. El marcador tumoral CA125 puede ayudar a predecir qué pacientes con una masa pélvica pueden tener cáncer de ovario. Sin embargo, muchas afecciones ginecológicas benignas también elevan el CA125, disminuyendo su especificidad. Se necesita una prueba más precisa para ayudar a los centros con experiencia en el tratamiento de esta enfermedad a clasificar a estos pacientes. Este enfoque aplica varios marcadores tumorales novedosos para desarrollar un ensayo de marcadores múltiples para predecir el riesgo de cáncer de ovario y ayudar a un ginecólogo a clasificar a las pacientes con masa pélvica.

45

Los métodos usados en los experimentos de este ejemplo se describen ahora.

Este fue un ensayo prospectivo aprobado por el IRB. Después de obtener el consentimiento informado, se obtuvieron muestras de suero preoperatorio de mujeres sometidas a cirugía por una masa anexial y se analizaron los niveles de CA125, SMRP, HE4, CA72-4 y osteopontina. Todos los resultados de la patología se compararon con los marcadores tumorales. Se estimaron modelos de regresión logística para cada marcador individualmente, y todas las combinaciones de estos marcadores. Se realizó un análisis de validación cruzada para obtener la sensibilidad con una especificidad de 95% y 98%.

55

Los resultados obtenidos de los experimentos de este ejemplo se describen ahora.

Se analizaron 179 pacientes; 50 cánceres de ovario (14 Estadio I) y 129 masas ováricas benignas. Los valores para HE4, SMRP, CA125 y CA72-4 diferían entre masas benignas y cáncer. La combinación de todos los marcadores, HE4, SMRP y CA 125 siguió siendo predictiva con un AUC del 92%. Cuando todas las combinaciones de marcadores potenciales se compararon con una especificidad del 95%, la combinación de CA125 y HE4 tuvo la sensibilidad más alta con 74,5%. La adición de HE4 a CA125 aumentó la sensibilidad de la prueba en un 7,4%.

60

Los datos se resumen en la Tabla 1.

65

Tabla 1

	Paneles	Sensibilidad validada cruzada	
		Especificidad 95%	Especificidad 98%
5	<i>sencilla</i>		
	CA125	66 %	36 %
10	HE4	68 %	51 %
	SMRP	31 %	25 %
	CA72-4	25 %	23 %
15	Osteopontina	14 %	4 %
	<i>Combinado con CA125</i>		
	CA125 + HE4	74 %	68 %
20	CA125 + SMRP	57%	46 %
	CA125 + CA72-4	63 %	51 %
	CA125 + Osteopontina	66 %	38 %
	<i>Óptimo 3</i>		
25	CA125 + HE4 + CA72-4	70 %	66 %
	<i>Óptimo 4</i>		
30	CA125 + HE4 + CA72-4 + SMRP	66 %	66 %
	<i>Todos</i>		
35	CA125 + HE4 + CA72-4 + SMRP + Osteopontina	66 %	63 %

Ejemplo 2

Estos son los métodos que se usaron en este ejemplo.

Se obtuvieron muestras de suero y orina antes de la operación después del consentimiento. La orina se recogió por cateterismo de una muestra de micción preoperatoria. Se recogió una muestra de sangre completa de 30 ml y una muestra de orina de > 10 ml. La sangre completa se recogió en tres tubos separadores de suero de 10 ml (SST). Los tubos SST se centrifugaron, se separaron y el sobrenadante se congeló dentro de las 3 horas posteriores a la recolección a <-80 °C. La muestra de orina de 10 ml se recogió o se transfirió a un tubo apropiado para su envío y almacenamiento, y también se congeló el día de la recolección a <-80 °C. Las muestras de suero y orina se enviaron en lotes al laboratorio de diagnóstico de Fujirebio para su análisis y almacenamiento a largo plazo. Los siguientes niveles de marcadores tumorales en suero se analizaron para CA125, HE4, SMRP, CA72-4, activina, inhibina y osteopontina, así como SMRP urinario.

Después de la operación, se revisaron los informes de patología para todas las pacientes y se clasificaron como benignos o malignos. También se registró el tipo histológico de malignidad y el diagnóstico específico para las personas con enfermedad benigna, al igual que la etapa de la enfermedad para todas las pacientes con cáncer de ovario. Todos los marcadores tumorales se compararon con los resultados finales de la patología. Los valores medios y medianos se compararon entre aquellos con enfermedad benigna y aquellos con cáncer usando la prueba t y el chi-cuadrado según corresponda. También se realizó un análisis de subconjuntos que comparaba solo a aquellos con cáncer en estadio I con aquellos con enfermedad benigna. Se estimaron modelos de regresión logística para cada marcador individualmente y todas las combinaciones de marcadores. El análisis de validación cruzada se realizó para obtener la sensibilidad a 90, 95% y 98% de especificidad para cada marcador individualmente, así como en combinación. El análisis de sensibilidad también se realizó para el subconjunto en Estadio I.

Estos son los resultados de este ejemplo.

Se inscribieron doscientos cuarenta y cuatro pacientes con masas anexiales. Se excluyeron dos mujeres que no tenían suero obtenido preoperatoriamente, y siete fueron excluidas que tenían metástasis de cánceres primarios distantes. 235 pacientes fueron elegibles para el análisis. Los resultados de la patología en estas mujeres revelaron 69 cánceres de

ovario (14 estadios I) y 166 masas ováricas benignas. La distribución de edad en aquellos con y sin malignidad se muestra en la Tabla 2, y las pacientes con cáncer no eran sorprendentemente mayores que aquellas con enfermedad benigna.

5 Los diagnósticos exactos encontrados en las mujeres con enfermedad benigna se muestran en la Tabla 3. El diagnóstico más común fue el cistadenoma benigno o el cistadenofibroma que representa aproximadamente un tercio de las mujeres con enfermedad benigna. La distribución histológica y por estadios de los cánceres de ovario se muestra en la Tabla 4. De acuerdo con la epidemiología del cáncer de ovario, la mayoría de las mujeres (71%) tenían tumores serosos y se descubrió que tenían enfermedad en estadio III (67%).

10 Los valores medios y medianos para HE4, SMRP, CA 125, CA72-4, activina e inhibina diferían significativamente entre las masas benignas y el cáncer. No se encontró que los niveles de osteopontina fueran significativamente diferentes. Los datos se muestran en la Tabla 5.

15 La sensibilidad a 90, 95 y 98% de especificidad se calculó para todos los marcadores individualmente y para las combinaciones de marcadores como se muestra en la Tabla 6. CA 125 y HE4 fueron los mejores predictores individuales de malignidad. No están estrechamente relacionados entre sí, lo que sugiere que ellos están identificando diferentes subpoblaciones de enfermedades. Cuando las combinaciones de marcadores potenciales se compararon, la combinación de CA125 y HE4 tuvo la sensibilidad más alta con 77% a una especificidad establecida de 95%. La inclusión de marcadores adicionales no aumentó significativamente la sensibilidad.

20 Luego se realizó un análisis de subconjuntos que comparaba solo a aquellas con enfermedad en estadio I con aquellas con enfermedad benigna. Los valores medios y medianos se muestran en la Tabla 7. HE4, CA125 y SMRP fueron significativamente diferentes entre aquellas con cáncer de ovario y aquellas con enfermedad benigna. Las sensibilidades a especificidades establecidas variables se muestran en la Tabla 8. HE4 es el marcador único más sensible, con una sensibilidad del 50% con una especificidad del 95%. La adición de CA125, o cualquiera de los otros marcadores, no mejoró significativamente la sensibilidad de detección de la enfermedad en estadio I.

Tabla 2

30

Distribución por edad en casos y benignos		
Grupo Etario	Grupo	
(años)	Benigno	Cáncer
<30	4 (2%)	2 (3%)
30 - 39	19 (12%)	3 (5%)
40 - 49	58 (35%)	7 (10%)
50 - 59	45 (27%)	13 (19%)
60 - 69	26 (16%)	16 (23%)
70 - 79	9 (5%)	18 (26%)
>=80	5 (3%)	9 (13%)
Faltante	0 (0%)	1 (1%)
Total	166	69

50

55

60

65

Tabla 3

Distribución de diagnósticos en benignos	
Diagnóstico	N (%)
Endometriosis	23 (13,9%)
Cistadenoma	30 (18,2%)
Cistadenofibroma	15 (9%)
Endosalpingiosis	4 (2,4%)
Mioma	8 (4,8%)
Quiste	10 (6%)
Enfermedad inflamatoria pélvica	3 (2%)
Profiláctico	2 (2%)
Otra afección inicial	71 (42,8%)
Total	166

Tabla 4

Histología por casos de cáncer de Stagein					
Histología	Estadio				Total
	I	II	III	IV	
Suero	4	1	38	6	49(71%)
Mucinoso	3	0	1	0	4(5,8%)
Endometrioide	3	0	2	0	5(7,2%)
Célula clara	0	1	1	0	2(2,9%)
MMMT	0	0	1	0	1(1,4%)
Mezclados	4	0	1	0	5(7,2%)
Neuroendocrino	0	0	1	0	1(1,4%)
Poco diferenciado	0	1	1	0	2(2,9%)
Total	14(20%)	3(4%)	46(67%)	6(9%)	69

Tabla 5

	Media benigna (mediana)	Media del cáncer de ovario (mediana)	prueba t valor p	Chi ² valor p
HE4	50(40)	531(231)	<0,0001	<0,001
SMRP	0,8(0,6)	4,5(1,9)	<0,0001	<0,001
CA125	67(14)	627(262)	<0,0001	<0,001
CA72-4	3,5(1,5)	32,1(3,3)	<0,0001	<0,001
SMRP en orina	0,6(0,1)	2,2(0,4)	0,0269	<0,001
CA125 en orina	5(2,4)	8,5(4,4)	0,0297	<0,001
Activina	0,7 (0,5)	1,1(1,0)	0,0003	0,001
Inhibina	45(26)	25(9)	0,0045	0,005
Osteopontina	66(37)	95(53)	0,2591	0,031

Tabla 6

	Promedio del análisis Leave-One-Out	Cáncer benigno contra cáncer de ovario: Sensibilidad a			
	Combinación de marcador	ROC- AUC(95% CI)	Especificidad 90%	Especificidad 95%	Especificidad 98%
5					
10	CA125	82,7% (76,8 - 88,7)	59,4%	42,0%	23,2%
	HE4	90,6% (85,9 - 95,2)	76,8%	71,3%	62,3%
15	SMRP	82,7% (76,3 - 89,1)	60,9%	53,6%	43,5%
	CA72-4	76,7% (69,8 - 83,6)	42,0%	31,1%	22,8%
20	Osteopontina	64,5% (57,0 - 72,0)	22,6%	7,6%	5,4%
	SMRP en orina	71,0% (62,8 - 79,3)	36,5%	32,0%	25,4%
25	CA125 en orina	72,6% (65,2 - 79,9)	30,6%	15,5%	3,2%
	Activina	69,0% (61,6 - 76,4)	30,4%	23,2%	13,0%
30	Inhibina	35,2% (27,8 - 42,6)	7,1%	0,0%	0,0%
	CA125 + HE4	91,1% (86,5 - 95,7)	81,0%	76,8%	68,3%
35	CA125 + SMRP	86,4% (80,8 - 91,9)	73,9%	57,7%	50,7%
	CA125 + CA72-4	85,3% (80,1 - 90,5)	60,9%	44,9%	30,5%
40	CA125 + Osteopontina	82,5% (75,4 - 88,5)	58,8%	41,1%	23,5%
	CA125 y SMRP en orina	79,9% (72,5 - 87,3)	59,8%	36,9%	23,9%
45	CA125 + CA125 en orina	79,2% (71,6 - 86,9)	59,9%	39,7%	22,4%
	CA125 + Activina	80,9% (74,4 - 87,4)	62,3%	43,0%	25,9%
50	CA125 + Inhibina	80,9% (74,2 - 87,5)	62,8%	41,9%	23,2%
	HE4 + SMRP	91,5% (87,2 - 95,7)	78,5%	71,0%	63,8%
55	HE4 + CA72-4	90,7% (86,1 - 95,3)	76,8%	68,1%	65,2%
	HE4 + Osteopontina	90,5% (85,7 - 95,3)	78,0%	73,5%	62,8%
60	HE4 y SMRP en orina	89,6% (84,5 - 94,7)	74,6%	66,0%	58,7%

65

(continuación)

5	Promedio del análisis Leave-One-Out	Cáncer benigno contra cáncer de ovario: Sensibilidad a			
	Combinación de marcador	ROC-AUC(95% CI)	Especificidad 90%	Especificidad 95%	Especificidad 98%
10	HE4 + CA125 en orina	89,5% (84,4 - 94,6)	74,6%	68,1%	60,3%
	HE4 + Activina	90,8% (86,3 - 95,3)	76,8%	71,1%	62,3%
15	HE4 + Inhibina	90,4% (85,8 - 94,9)	79,6%	73,8%	62,5%
	CA125 y HE4 + SMRP	91,1% (86,4 - 95,7)	79,7%	72,5%	69,6%
20	CA125 + HE4 + CA72-4	91,1% (86,5 - 95,7)	81,2%	77,1%	68,2%
	CA125 + HE4 + Osteopontins	91,2% (86,5 - 95,9)	80,7%	77,9%	70,6%
25	CA125 + HE4 + SMRP en orina	90,3% (85,2 - 95,4)	77,9%	71,5%	68,2%
	CA125 + HE4 + CA125 en orina	90,0% (84,7 - 95,3)	77,8%	72,8%	66,7%
30	CA125 + HE4 + Activina	91,1% (86,4 - 95,7)	81,2%	73,9%	68,2%
	CA125 + HE4 + Inhibina	91,3% (86,8 - 95,7)	79,8%	75,5%	66,8%
35	CA125 + HE4 + SMRP + CA72-4	91,2% (86,6 - 95,8)	81,0%	72,5%	69,6%
	CA125 + HE4 + CA72-4 + SMRP en orina	90,3% (85,2 - 95,4)	77,9%	71,6%	67,4%
40	CA125 + HE4 + CA72-4 + SMRP + Osteopontina	91,3% (86,6 - 95,9)	80,5%	74,2%	70,6%

45 Tabla 7

	Media benigna (mediana)	Media del cáncer de ovario Estadio 1 (mediana)	prueba t valor p	Chi ² valor p	
50	HE4	50(40)	207(98)	<0,0001	0,012
	SMRP	0,8(0,6)	1,2(0,8)	0,068	0,651
	CA125	67(14)	847(68)	0,0005	0,051
55	CA72-4	3,5(1,5)	66(2,3)	<0,0001	0,015
	Osteopontina	66(37)	158(50)	0,1008	0,404

60

65

Tabla 8

Promedio del análisis Leave-One-Out		Cáncer benigno versus cáncer de ovario Estadio 1: Sensibilidad a		
Combinación de marcador	ROC-AUC(95% CI)	Especificidad 90%	Especificidad 95%	Especificidad 98%
CA125	67,6% (53,4 - 81,8)	19,7%	7,7%	7,1%
HE4	77,8% (63,2 - 92,3)	50,0%	49,2%	28,6%
SMRP	66,2% (51,6 - 80,7)	28,6%	28,5%	14,3%
CA72-4	74,8% (61,7 - 87,8)	34,8%	34,7%	21,4%
Osteopontina	57,6% (42,9 - 72,2)	7,6%	7,6%	7,1%
CA125 + HE4	76,6% (61,1 - 92,0)	50,0%	42,7%	35,7%
CA125 + SMRP	72,6% (59,9 - 85,4)	35,7%	28,5%	21,4%
CA125 + CA72-4	70,7% (57,2 - 84,2)	28,1%	21,4%	21,4%
CA125 + Osteopontina	63,9% (51,8 - 76,1)	21,3%	14,9%	14,2%
CA125 + HE4 + CA72-4	76,9% (61,6 - 92,1)	50,0%	35,8%	35,7%
CA125 + HE4 + SMRP + CA72-4	76,9% (62,3 - 91,6)	50,6%	35,7%	35,7%
CA125 + HE4 + CA72-4 + SMRP + Osteopontina	77,0% (62,4 - 91,6)	50,4%	35,8%	35,6%

Ejemplo 3

Estos son los métodos usados en este ejemplo.

Se recopilaron datos de dos ensayos prospectivos aprobados por el IRB por separado de dos instituciones. Después de obtener el consentimiento informado, se obtuvieron muestras de suero preoperatorio de mujeres sometidas a cirugía por una masa anexial y se analizaron los niveles de CA125, SMRP, HE4 y CA72-4. Todos los resultados de la patología se compararon con los marcadores tumorales. Las sensibilidades a especificidades establecidas de 90, 95 y 98% se determinaron mediante regresión logística para cada marcador individualmente y todas las combinaciones de 2, 3 y 4 marcadores.

Estos son los resultados de este ejemplo.

Se analizaron 448 muestras. Hubo 267 casos benignos y 181 cánceres de ovario (27 estadios I, 20 estadios II, 115 estadios III y 19 estadios IV). Los valores medianos para HE4, SMRP, CA125 y CA72-4 diferían significativamente entre las masas benignas y el cáncer ($p < 0,001$). En la diferenciación de masas benignas y neoplasias en estadio I, la adición de HE4 a CA125 aumentó la sensibilidad en un 22,2% con una especificidad del 90%. La combinación de HE4 y CA125 para todos los estadios fue superior a HE4 o CA125 solo ($p < 0,003$). Los resultados se resumen en la Tabla 9.

Tabla

5	Paneles	Sensibilidad para benigno frente a todos los estadios		
		Especificidad 90%	Especificidad 95%	Especificidad 98%
	<i>Marcadores individuales</i>			
	CA125	65,7	58,0	32,6
10	HE4	69,6	58,0	45,9
	SMRP	54,1	45,3	40,3
	CA72-4	52,2	35,6	32,2
15	<i>Combinaciones óptimas</i>			
	CA125 + HE4	74,0	68,5	60,8
	CA125 y HE4 + SMRP	75,1	70,2	64,6
20	CA125 + HE4 + CA72-4	75,6	70,0	63,3
	CA125 + HE4 + CA72-4 + SMRP	77,2	70,6	66,7

25

Si bien este tema se ha descrito con referencia a modalidades específicas, es evidente que otras modalidades y variaciones pueden ser concebidas por otros expertos en la técnica.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar si una paciente padece cáncer de ovario en estadio I, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen el marcador HE4 y otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra de fluido biológico obtenida de la paciente, en donde los niveles elevados de los marcadores se correlacionan con una mayor probabilidad de que la paciente sufra cáncer de ovario en estadio I.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la paciente exhibe una masa pélvica.
- 15 3. Un método para diferenciar si una masa pélvica en una paciente es benigna o un cáncer de ovario en estadio I, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen el marcador HE4 y otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra de fluido biológico obtenida de la paciente, en la que los niveles elevados de los marcadores están correlacionados con una mayor probabilidad de que la masa pélvica sea un cáncer de ovario en estadio I.
- 20 4. Un método para evaluar la respuesta de una paciente con cáncer de ovario en estadio I a un tratamiento, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen el marcador HE4 y otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en muestras de fluido biológico obtenidas de la paciente en diferentes momentos durante el tratamiento, en donde los niveles disminuidos de los marcadores en el momento posterior indican que la paciente está respondiendo al tratamiento.
- 25 5. Un método para evaluar la probabilidad de que una paciente desarrolle un cáncer de ovario en estadio I, el método comprende evaluar al menos dos marcadores, que incluyen el marcador HE4 y otro marcador seleccionado del grupo que consiste en SMRP, CA125 y CA72-4, en una muestra de fluido biológico obtenida de la paciente, en donde los niveles elevados de los marcadores están correlacionados con una mayor probabilidad de que la paciente desarrolle un cáncer de ovario en estadio I.
- 30 6. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende evaluar los marcadores HE4 y CA125.
7. El método de cualquier reivindicación anterior, que comprende evaluar los marcadores HE4 y SMRP.
8. El método de la reivindicación 4, en donde el tratamiento es quimioterapia intraperitoneal.
- 35 9. El método de la reivindicación 4, en donde el tratamiento comprende la administración a la paciente de un anticuerpo que se une específicamente con CA125.
- 40 10. El método de la reivindicación 6 como dependiente de la reivindicación 5, en donde la paciente exhibe niveles normales del marcador CA125 y un nivel elevado del marcador HE4 se correlaciona con una mayor probabilidad de que la paciente desarrolle un cáncer de ovario en estadio I.