

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 786 177**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/US2015/047434**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16033464**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15836342 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3186638**

54 Título: **Serina proteasas como biomarcadores para cáncer de ovario**

30 Prioridad:

28.08.2014 US 201462043290 P

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

09.10.2020

73 Titular/es:

**HACKENSACK UNIVERSITY MEDICAL CENTER
(50.0%)
30 Prospect Avenue
Hackensack, NJ 07601, US y
PECORA, ANDREW L. (50.0%)**

72 Inventor/es:

PECORA, ANDREW, L.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 786 177 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

Serina proteasas como biomarcadores para cáncer de ovario

5 **Campo de la invención**

La invención descrita se refiere en general al cáncer de ovario.

10 **Antecedentes**10 **Cáncer de ovario**

El cáncer de ovario está clasificado como el quinto cáncer más común en mujeres y tiene la mayor tasa de mortalidad entre las neoplasias malignas ginecológicas (Suh KS, Park SW, Castro A, Patel H, Blake P, Liang M, et al. Ovarian cancer biomarkers for molecular biosensors and translational medicine. Expert Rev Mol Diagn 2010;10:1069-83; Landen CN Jr, Birrer MJ, Sood AK. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. J Clin Oncol 2008;26:995-1005). Aunque la tasa de supervivencia a los 5 años del cáncer de ovario es de aproximadamente el 90 % cuando se detecta en los estadios tempranos (I/II), aproximadamente un 80 % de los nuevos casos se diagnostican en estadios avanzados (III/IV) debido a la naturaleza asintomática de la enfermedad en el estadio I y el estadio II temprano. Desafortunadamente, la tasa de supervivencia a los 5 años del cáncer de ovario avanzado es tan solo del 11 % (Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD). Por lo tanto, Existe la necesidad de encontrar biomarcadores fiables para la detección temprana del cáncer de ovario.

25 **Tipos de cáncer de ovario**

El cáncer de ovario no es una enfermedad única, sino que consiste en más de 30 tipos y subtipos de neoplasias malignas, cada una con su propia apariencia histopatológica y comportamiento biológico. En general, los cánceres de ovario se agrupan en 3 categorías principales: (1) tumores epiteliales (tumores que surgen de células que revisten o cubren los ovarios); (2) tumores de células germinales (tumores que surgen de células que están destinadas a formar óvulos en los ovarios; y (3) tumores de células estromales de los cordones sexuales (tumores que comienzan en células conectivas que mantienen juntos los ovarios y producen hormonas femeninas). Los cánceres de ovario más comunes son tumores epiteliales, que representan aproximadamente un 90 % de todos los cánceres de ovario. Los tumores epiteliales de ovario se dividen en subtipos que incluyen tumores serosos, papilares serosos, endometrioides, nucinosos y de células claras.

35 **Tumores epiteliales comunes**40 **Serosos**

El subtipo seroso del carcinoma de ovario representa aproximadamente un 60-80 % de los casos de cáncer de ovario y muestra la histología más agresiva (Levanon K. et al., J. Clinical Oncology, 10 de noviembre de 2008, Vol. 26 n.º 32 5284-5293). Menos de un 25 % de los casos de cáncer seroso de ovario se detecta en un estadio temprano (estadios I y II), lo que tiene un reflejo sombrío en los datos de supervivencia (Seidman J.D. et al., Int. J. Gynecol. Pathol. 23:41-44, 2004). El carcinoma seroso de alto grado implica la superficie del ovario, normalmente bilateralmente y las membranas peritoneales, con una rápida aparición de carcinomatosis, un hecho que restringe las opciones quirúrgicas únicamente a la citorreducción (Levanon K. et al., J. Clinical Oncology, 10 de noviembre de 2008, Vol. 26 n.º 32 5284-5293). A pesar de la introducción de taxanos a los protocolos terapéuticos y a la supervivencia prolongada con la administración de quimioterapia intraperitoneal, ha habido pocos avances en la mejora de las tasas de curación, un parámetro que sigue dependiendo únicamente del estadio de la enfermedad en el momento de la presentación (Levanon K. et al., J. Clinical Oncology, 10 de noviembre de 2008, Vol. 26 n.º 32 5284-5293).

55 **Papilares serosos**

El carcinoma papilar seroso del ovario es uno de los tumores malignos más comunes y letales (Tong G-X et al., Modern Pathology (2007) 20, 856-863). La histología papilar serosa representa un 75 % de los cánceres de ovario y su patrón histológico simula al revestimiento de las trompas de Falopio (Jelovac D. y Armstrong D. K., CA: A Cancer Journal for Clinicians, Vol. 61, 3.ª edición, págs. 183-203, mayo/junio de 2011). La mayoría de casos de cáncer de ovario papilar seroso se diagnostican en estadios avanzados, cuando los tumores ya se han metastatizado (Kim J. et al., PNAS, 6 de marzo de 2012, Vol. 109, n.º 10, págs. 3921-3926). A pesar de la mejora progresiva de la cirugía y la quimioterapia, más de un 90 % de las mujeres con cánceres de ovario avanzados fallecen tras una recidiva (Bukowski R. M. et al. (2007) Semin. Oncol. 34(Supl. 2):S1-S15). La detección temprana de estos carcinomas serosos de alto grado es por tanto clave para reducir las muertes por cáncer de ovario (Bast R. C. Jr. et al. (2009) Nat. Rev. Cancer 9:415-428).

Endometrioides

Los carcinomas endometrioides de ovario representan únicamente un 10 % de los carcinomas de ovario (McConechy M. K. et al., *Modern Pathology* (2007) 27, 128-134). La mayoría de los carcinomas endometrioides de ovario son carcinomas de bajo grado con un buen pronóstico (Chen S. et al., *Modern Pathology* (2005) 18:903-911).

Mucinosos

El tipo celular mucinoso representa aproximadamente un 10 % de todos los carcinomas epiteliales de ovario primarios (Chan J. K. et al., *Gynecol. Oncol.* 2008; 109:370-376). La mayoría de los carcinomas mucinosos epiteliales de ovario se diagnostican de manera temprana (estadios I-IIA de la International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO)) y están confinados a un ovario. En los carcinomas mucinosos epiteliales de ovario en estadio I, la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es de aproximadamente el 90 %, que es ligeramente mejor que la del 76 % observada para pacientes con carcinomas serosos epiteliales de ovario (Vergote I. et al., *Lancet* 2001; 357:176-182). Con menor frecuencia, el carcinoma mucinoso epitelial de ovario primario se asocia con carcinomatosis peritoneal y/o metástasis extraperitoneales (estadios IIB-IV de la FIGO). A diferencia de los tumores de estadio I de la FIGO, los carcinomas mucinosos epiteliales de ovario avanzados al parecer tienen un peor pronóstico que los carcinomas serosos epiteliales de ovario (Omura G. A. et al., *J. Clin. Oncol.* 1991; 9:1138-1150; Teramukai S. et al., *J. Clin. Oncol.* 2007; 25:3302-3306).

Células claras

Los adenocarcinomas de ovario de células claras representan <5 % de todas las neoplasias malignas de ovario y un 3,7-12,1 % de todos los carcinomas epiteliales de ovario (Tan D. S. P. y Kaye S., *J. Clin. Pathol.* abril de 2007; 60(4): 355-360). En comparación con otros subtipos de cáncer epitelial de ovario (EOC), cuando se encuentran en un estadio avanzado, se asocian con un peor pronóstico y son relativamente resistentes a la quimioterapia convencional basada en platino (Sugiyama T. et al., *Cancer.* 1 de junio de 2000; 88(11):2584-9). Por el contrario, el cáncer de ovario de células claras en estadio temprano tiene un pronóstico relativamente bueno (Tan D. S. P. y Kaye S., *J. Clin. Pathol.* abril de 2007; 60(4): 355-360). Por lo tanto, la detección temprana es clave para mejorar el pronóstico y reducir las muertes asociadas con este tipo de cáncer de ovario.

Estadificación del cáncer de ovario

El proceso usado para determinar si el cáncer de ovario se ha diseminado en los ovarios o a otras partes del cuerpo (es decir, metastatizado) se denomina estadificación. Es importante determinar el estadio del cáncer de ovario debido a que el estadio determinará el tipo de plan de tratamiento seleccionado para combatir la enfermedad. Los resultados de las pruebas empleadas para diagnosticar el cáncer de ovario normalmente se usan para estadificar la enfermedad. Dichas pruebas incluyen ultrasonidos, escáner por tomografía computarizada (TC), escáner por tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), rayos X y biopsia. Se han desarrollado guías de estadificación del cáncer de ovario por la International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO). El sistema de estadificación de la FIGO para el cáncer de ovario se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Estadificación del cáncer de ovario de la FIGO

Estadio	Área implicada
IA	Tumor limitado a 1 ovario, cápsula intacta, sin tumor en la superficie, lavados negativos
IB	El tumor implica ambos ovarios; por lo demás como IA
IC1	Derrame quirúrgico
IC2	Ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie ovárica
IC3	Células malignas en ascitis o lavados peritoneales
IIA	Extensión y/o implante en el útero y/o trompas de Falopio
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales
IIIA1	Solo ganglios linfáticos retroperitoneales positivos IIIA1(i) - Metástasis ≤ 10 mm IIIA1(ii) - Metástasis > 10 mm
IIIA2	Implicación peritoneal microscópica extrapélvica (por encima del borde) + ganglios linfáticos retroperitoneales positivos
IIIB	Metástasis peritoneal macroscópica extrapélvica ≤ 2 cm ± ganglios linfáticos retroperitoneales positivos; incluye extensión a la cápsula del hígado/bazo
IIIC	Metástasis peritoneal macroscópica extrapélvica > 2 cm ± ganglios linfáticos retroperitoneales positivos; incluye extensión a la cápsula del hígado/bazo

45

(continuación)

Estadio	Área implicada
IVA	Efusión pleural con citología positiva
IVB	Metástasis parenquimatosa hepática y/o esplénica, metástasis a órganos extraabdominales (incluyendo ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal).

Graduación del cáncer puntuación ovario

- 5 Además de la estadificación, un tumor de ovario también puede describirse por su grado (G). La graduación determina el grado de similitud del tejido de cáncer de ovario con el tejido normal. El grado del tumor se determina mediante el examen microscópico del tejido canceroso; apareciendo las células sanas como bien diferenciadas. Es decir, cuanto más diferenciado esté el tumor de ovario, mejor es el pronóstico. El sistema de graduación del cáncer de ovario se muestra en la tabla 2.

10

Tabla 2. Graduación del cáncer puntuación ovario

Grado	Descripción
GX	No puede evaluarse el grado
GB	El tejido se considera canceroso de baja malignidad; bajo potencial maligno
G1	El tejido está bien diferenciado (células sanas)
G2	El tejido está moderadamente modificado (más anormal que las células sanas)
G3 a G4	El tejido está poco diferenciado o está no diferenciado (todas o la mayoría de las células parecen anormales)

- 15 El cáncer seroso de ovario no se gradúa de este modo y solo se considera una clasificación de bajo grado y de alto grado. Los carcinomas serosos de bajo grado muestran núcleos de bajo grado con infrecuentes figuras mitóticas. Evolucionan desde adenofibromas o tumores de baja malignidad, tienen mutaciones frecuentes de los genes KRAS, BRAF o ERBB2 y carecen de mutaciones TP53 (vía de tipo I). Los tumores de bajo grado son indolentes y tienen un mejor resultado que los tumores de alto grado. Por el contrario, los carcinomas serosos de alto grado tienen núcleos de alto grado y numerosas figuras mitóticas (véase, Vang R. et al., Adv. Anat. Pathol. septiembre de 2009; 16(5):267-282).

20

Tratamiento para el cáncer de ovario**Cáncer de ovario en estadio temprano (estadio I-II de la FIGO)**

- 25 Debido a la ausencia de programas de detección sistemática eficaces, el cáncer de ovario se diagnostica en estadio temprano únicamente en aproximadamente un 25 % de los casos (Kim A. et al., Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2012, 31:14). En la mayoría de estos casos, la cirugía es capaz de curar la enfermedad y la tasa de supervivencia a los cinco años para el cáncer de ovario en estadio temprano (estadio I o II) es de aproximadamente el 90 % (Hennessey BT, et al., Lancet 2009, 374: 1371-82). La quimioterapia adyuvante para el
- 30 cáncer de ovario en estadio temprano sigue siendo controvertida, pero algunos estudios han demostrado su beneficio en condiciones confinadas. De acuerdo con estos estudios, los pacientes con un estadio IA o IB de la FIGO, la histología no de células claras, los tumores bien diferenciados (G1) y una cirugía "óptima" (es decir, llevada a cabo de acuerdo con las directrices internacionales, con valoración pélvica y retroperitoneal), parecen no beneficiarse de la quimioterapia (Trimbos JB et al., J Natl Cancer Inst 2003, 95:105-112). Por lo tanto, comúnmente
- 35 se cree que, al menos en estos casos, es probable evitar la quimioterapia y se puede recomendar a los pacientes que se sometan a un seguimiento clínico e instrumental. En todos los demás pacientes (en estadio temprano), está indicada la quimioterapia (adyuvante) (Hennessey BT, et al., Lancet 2009, 374: 1371-82).

Cáncer de ovario avanzado (estadio III-IV de la FIGO)

40

- El tratamiento estándar para pacientes con cáncer de ovario avanzado es una citorreducción quirúrgica máxima (es decir, histerectomía abdominal total, salpingooforectomía bilateral, linfadenectomía y omentectomía pélvica y paraaórtica) seguida de quimioterapia a base de platino sistémica (por ejemplo, cisplatino seguido de combinaciones a base de carboplatino, cisplatino con paclitaxel, cisplatino con ciclofosfamida, cisplatino con doxorubicina, etc.). La
- 45 supervivencia a los 5 años esperada para estos pacientes es del 10-30 % (Hennessey BT et al., Lancet 2009, 374:1371-82). El concepto de la cirugía citorreductora primaria es reducir la carga tumoral residual hasta un punto en el que la terapia adyuvante tenga una eficacia óptima. El porcentaje de pacientes con cáncer de ovario avanzado que pueden someterse de manera óptima a una cirugía citorreductora parece variar en un 17 %-87 % (Ramirez I et al., Cancer Control 2011; 18(1): 22-30). Este porcentaje puede depender en gran medida en la experiencia del
- 50 cirujano.

Nuevas estrategias de tratamiento para el cáncer de ovario

Hay grandes expectativas de un pronóstico mejorado en el cáncer de ovario relacionadas con el uso de nuevos agentes biológicos. El conocimiento en profundidad de la biología del cáncer de ovario ha dado lugar a la identificación de múltiples dianas moleculares, tales como receptores de factores de crecimiento, vías de transducción de señales, reguladores del ciclo celular y mecanismos angiogénicos (Kim A et al., Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2012, 31:14).

Bevacizumab

Bevacizumab es una IgG1 monoclonal humanizada recombinante de 149 kDa dirigida contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ha recibido la aprobación por la FDA para el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico, de mama y de pulmón no microcítico y es prometedor en el tratamiento del cáncer de ovario. Varios estudios de fase II han demostrado que bevacizumab es activo en el cáncer de ovario recurrente (Ellis LM, Hiclin DJ, Nat Rev Cancer 2008, 8:579-591; Raspollini MR et al., Int J Surg Pathol 2005, 13:135-142).

La expresión de VEGF es mayor en los tumores de cáncer de ovario que en el tejido ovárico normal o los tumores ováricos benignos y se considera que el aumento de la expresión de VEGF en las fracciones citosólicas procedentes de tumores de cáncer de ovario o los niveles séricos de VEGF en suero preoperatorio están asociados con un estadio avanzado y un mal pronóstico (Kim A et al., Journal of Experimental & Clinical Cancer Research 2012, 31:14).

Para inhibir la vía de VEGF, hay dos estrategias principales: (1) inhibición del ligando de VEGF con anticuerpos o receptores solubles y (2) inhibición del receptor de VEGF (VEGFR) con inhibidores de tirosina cinasa (TKI) o anticuerpos receptores. De las terapias de direccionamiento a VEGF, la más empleada ha sido la inhibición del ligando de VEGF con bevacizumab (Avastin®).

Dos ensayos de fase II (GOG218, ICON 7) han evaluado recientemente el papel de bevacizumab en la quimioterapia de primera línea como adyuvante para el carboplatino y el paclitaxel. Se ha demostrado que bevacizumab más quimioterapia (carboplatino-paclitaxel) y el mantenimiento con bevacizumab prolongan la supervivencia libre de enfermedad (PFS) en aproximadamente 4 meses (10,3 meses frente a 14,1 meses) en comparación con solo carboplatino-paclitaxel (Burger RA et al., N Engl J Med 2011, 365:2473-83; Perren TJ et al., N Engl J Med 2011,365:2484-96). Un tercer ensayo (el ensayo OCEANS) demostró que la adición de bevacizumab prolongó la PFS en los casos de carcinoma de ovario recurrente sensible al platino (Aghajanian C et al., J Clin Oncol 2011, 29).

Inhibidores del receptor de VEGF

Se ha demostrado que los inhibidores orales de la tirosina cinasa del receptor de VEGF (VEGFR) tienen actividad en pacientes con cáncer de ovario recurrente, dando como resultado respuestas tumorales y estabilización de la enfermedad, retrasando la progresión tumoral (Friedlander M et al., Gynecol Oncol 2010; 119:32-37; Ledermann JA et al., J Clin Oncol 2011; 29:3798-3804; Matulonis UA et al., J Clin Oncol 2009; 27:5601-5606; Biagi JJ et al., Ann Oncol 2011; 22:335-340; Matei D et al., J Clin Oncol 2011; 29:69-75). Dos agentes se encuentran en la actualidad en estudios de primera línea. Pazopanib es un inhibidor de la angiogénesis con actividad de amplio espectro contra los tres receptores de VEGF, el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR) y c-Kig, que ha sido aprobado para su uso de primera línea en el cáncer renal avanzado. Para un estudio de mantenimiento se ha reclutado a más de 900 pacientes, incluyendo a un subconjunto en Asia, en el que los pacientes reciben 800 mg de pazopanib al día o placebo hasta la progresión o hasta 2 años (aGO OVAr-16; ensayo NCT 00866697; 01227928). El criterio de valoración primario es la PFS.

El segundo ensayo es con nintedanib (BIBF1120), un potente inhibidor de VEGFR/PDGFR y del receptor de factor de crecimiento de fibroblastos. En este ensayo, se administra nintedanib o placebo con un régimen estándar de carboplatino y paclitaxel después de la cirugía y se continúa como terapia de mantenimiento durante hasta 2 años (aGO OVAr-12, ensayo NCT01015118). Este ensayo también tiene la PFS como su criterio de valoración primario.

El direccionamiento al eje de angiopoyetina es otra estrategia para desarrollar una terapia anti-angiogénica. aMG 386, un peptidocuerpo que inhibe la interacción de la angiopoyetina-1 y -2 con el receptor Tie2, se ha evaluado en combinación con paclitaxel semanal en el cáncer de ovario recurrente [Karlan, B.Y. et al., J. Clin. Oncol. diciembre de 2011; doi: 10.1200/JCO.2010.34.3178]. Los resultados de un ensayo de fase II han sido prometedores y han dado lugar a una exploración adicional en el ensayo TRINOva-3 de aMG 386/placebo más carboplatino/paclitaxel en el tratamiento de primera línea contra el cáncer de ovario (NCT01493505).

Inhibidores del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR)

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se sobreexpresa en hasta un 70 % de los pacientes de cáncer de ovario (Kohler M et al., Eur J Cancer 1992; 28a:1432-1437). Sin embargo, son infrecuentes las respuestas a los inhibidores de EGFR en el cáncer de ovario recurrente y, como con el cáncer de pulmón, son dependientes de la presencia de una mutación en el dominio catalítico del EGFR (Schilder RJ et al, Clin Cancer Res 2005; 11:5539-

5584). Erlotinib es un inhibidor oral altamente potente de la región de tirosina cinasa del EGFR y se ha estudiado en un ensayo en el que se asignaron aleatoriamente a terapia de mantenimiento con erlotinib o a observación después de la quimioterapia a pacientes con cáncer de ovario epitelial de estadio I de alto riesgo y de estadio II-IV.

5 Inhibidores del factor de crecimiento insulínico (IGFR)

10 El factor de crecimiento insulínico 1 (IGF 1) está implicado en la inhibición de la apoptosis, la progresión tumoral y la metástasis. aMG 479 es un anticuerpo monoclonal que es un potente inhibidor del receptor de IGF 1 y OSI-906 es un inhibidor de cinasa dual de IGFR1 y el receptor de insulina. Este último se encuentra en ensayos clínicos de
10 cáncer de ovario recurrente. Se encuentra en desarrollo un estudio aleatorizado de fase II de aMG 479 añadido a la quimioterapia de primera línea en pacientes con una citorreducción óptima del cáncer de ovario (NCT00718523).

Inhibidores de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP)

15 Las poli (ADP-ribosa) polimerasas (PARP) son una gran familia de enzimas multifuncionales (Rouleau M et al., Nat Rev Cancer 2010, 10:293-301). PARP-1, la isoforma más abundante, desempeña un papel clave en la reparación de roturas monocatenarias del ADN mediante la reparación de escisiones de bases. La inhibición de las PARP da lugar a la acumulación de roturas monocatenarias de ADN, lo que provoca roturas bicatenarias del ADN en las horquillas de replicación. Estas roturas bicatenarias se reparan en las células normales principalmente mediante la vía de
20 reparación del ADN bicatenario de recombinación de homólogos libre de errores, en la que los componentes esenciales son las proteínas supresoras tumorales BRCA1 y BRCA2. En ausencia de BRCA1 o de BRCA2, estas lesiones no se reparan, lo que da como resultado la detención del ciclo celular y la muerte celular (Itamochi H, World J Biol Chem 2010, 1:209-220).

25 Fong et al. (J Clin Oncol 2010, 28:2512-2519) administraron el inhibidor de PARP, olaparib a pacientes insensibles al platino. Olaparib tuvo un perfil de seguridad favorable y una alta tasa de respuesta, en particular en pacientes con mutación de BRCA. En pacientes con enfermedad resistente al platino e insensible al platino, la tasa de respuesta fue del 41,7 % y del 15,4 %, respectivamente (Fong PC et al., J Clin Oncol 2010, 28:2512-2519). Olaparib (AZD2281) se ensayó en pacientes con mutación de BRCA con cáncer de ovario, peritoneal primario y de las trompas de Falopio. En el estudio, 20 pacientes (40 %) respondieron a la terapia. En la actualidad, se encuentran en
30 desarrollo ensayos aleatorizados de olaparib y otros inhibidores de PARP en pacientes con cáncer de ovario.

Biomarcadores para el cáncer de ovario

35 La identificación de biomarcadores de detección temprana para el carcinoma de ovario sigue siendo complicada debido a una gran variedad de variaciones morfológicas, clínicas y genéticas encontradas en la progresión del cáncer de ovario (Bast RC Jr, Hennessy B, Mills GB. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. Nat Rev Cancer 2009;6:415-28). Los biomarcadores actualmente disponibles carecen de la especificidad y sensibilidad necesarias para su uso clínico rutinario (Gubbels JA, Claussen N, Kapur AK, Connor JP, Patankar MS. The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer. J Ovarian Res 2010; 3:8). El único biomarcador
40 validado clínicamente que se usa para la detección temprana, la monitorización de la enfermedad y la evaluación de la recidiva o la respuesta al tratamiento es CA125; sin embargo, tiene una baja especificidad como marcador único y no se recomienda generalmente para la detección temprana (Karam AK, Karlan BY. Ovarian cancer: the duplicity of CA125 measurement. Nat Rev Clin Oncol 2010; 7:335-9). Aunque su expresión en suero está elevada en la enfermedad en estadio temprano (23 %) y en estadio tardío (80 %), carece de especificidad y sensibilidad para la detección del cáncer de ovario (Bast RC Jr, Urban N, Shidhar V, Smith D, Zhang Z, Skates S, et al. Early detection of ovarian cancer: promise and reality. Cancer Treat Res 2002;107:61-97). La sobreexpresión de CA125 también se observa con frecuencia en afecciones benignas (por ejemplo, endometriosis) y por tanto, carece de un valor diagnóstico preciso para la enfermedad en estadio temprano (Tuxen MK, Soletormos G, Dombernowsky P. Serum tumor marker CA-125 for monitoring ovarian cancer during follow-up. Scand J Clin Lab Invest 2002; 62:177-188). Como biomarcador de detección temprana del cáncer de ovario, estudios recientes sugieren que la proteína epididimaria humana 4 (HE4) proporciona una mayor sensibilidad y especificidad que CA125 (Anderson GL, McIntosh M, Wu L, Barnett M, Goodman G, Thorpe G, et al. Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case-control study. J Natl Cancer Inst 2010; 102:26-38; Hellstrom I, Hellstrom KE. SMRP and HE4 as biomarkers for ovarian carcinoma when used alone and in combination with CA125 and/or each other. Adv Exp Med Biol 2008;622:15-21) y un ensayo que detecta la expresión de una combinación de HE4, CA125, antígeno carcinoembrionario (CEA) y de molécula de adhesión a células vasculares 1 (VCAM-1) en suero tiene una sensibilidad significativamente mejor para detectar el cáncer de ovario en estadio temprano frente a tumores benignos (Yurkovetsky Z, Skates S, Lomakin A, Nolen B, Pulsipher T, Modugno F, et al. Development of a multimarker assay for early detection of ovarian cancer. J Clin Oncol 2010;28:2159-66; Nolen B, Velikokhatnaya L, Marrangoni A, De Geest K, Lomakin A, Bast RC, et al. Serum biomarker panels for the discrimination of benign from malignant cases in patients with an adnexal mass. Gynecol Oncol. 2010;117:440-5). Además, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) ha aprobado una prueba OVA1 que consiste en un panel de cinco biomarcadores: transtiretina, apolipoproteína A-1, beta2-microglobulina, transferrina y CA125 (Zhang Z, Chan DW. The road from
60 discovery to clinical diagnostics: lessons learned from the first FDA-cleared *in vitro* diagnostic multivariate index assay of proteomic biomarkers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2010;19:2995-9). Esto sugiere que el uso de una
65

combinación de múltiples marcadores puede generar ventajas sinérgicas frente a diagnósticos de un solo marcador. Aunque la prueba OVA-1 multimarcador demuestra una sensibilidad de detección mucho mayor que la prueba solo para CA-125, es más eficiente para la detección del cáncer de ovario en estadio avanzado y fue aprobada por la FDA para la evaluación prequirúrgica de mujeres que ya poseen una masa en el ovario.

5

Familia de serina proteasas de calicreína

Una serie de miembros de la familia de calicreína humana (KLK) están asociados con cánceres humanos y muestran expresión diferencial en muchos tipos de cánceres avanzados, incluyendo gastrointestinales, de cabeza y cuello, pulmón, ovario y cerebro (Donach M, Yu Y, Artioli G, Banna G, Feng W, Bast RC Jr, Combined use of biomarkers for detection of ovarian cancer in high-risk women. *Tumour Biol* 2010;31:209-15; McIntosh MW, Liu Y, Drescher C, Urban N, Diamandis EP. Validation and characterization of human kallikrein 11 as a serum marker for diagnosis of ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 2007;13:4422-8; Shan SJ, Scorilas A, Katsaros D, Rigault de la Longrais I, Massobrio M, et al. Unfavorable prognostic value of human kallikrein 7 quantified by ELISA in ovarian cancer cytosols. *Clin Chem* 2006; 52:1879-86), aunque ningún estudio previo hasta la fecha se ha centrado en la detección del cáncer de ovario en estadio temprano, específicamente midiendo los niveles de KLK6 y/o KLK7. En un estudio por El Sherbini et al., un 40 % de los pacientes en estadio I/II (n=10-15) presentó niveles por encima de lo normal de KLK6 mientras que un 83,3 % de los pacientes en estadio III/IV (N=12) eran positivos para KLK6 (El-Sherbini et al. Diagnostic value of serum kallikrein-related peptidases 6 and 10 versus CA125 in ovarian cancer, *Int. J. Gyn. Cancer* 2011, 21(4): 625-632). Aunque este estudio demostró que KLK6 tiene mejor sensibilidad que CA-125 como un biomarcador de detección temprana, este incluyó únicamente pruebas séricas (El-Sherbini et al. Diagnostic value of serum kallikrein-related peptidases 6 and 10 versus CA125 in ovarian cancer, *Int. J. Gyn. Cancer* 2011, 21(4): 625-632).

La familia de KLK humana comprende 15 serina proteasas similares a tripsina o quimiotripsina, codificadas por genes estrechamente agrupados encontrados en la región cromosómica 19q13.4 (Sotiropoulou G, Pampalakis G. Kallikrein-related peptidases: bridges between immune functions and extracellular matrix degradation. *Biol Chem* 2010; 391:321-31). La transcripción de la calicreína está regulada por diversos factores estimuladores e inhibidores, incluyendo hormonas esteroideas (Lawrence MG., Lai J., Clements JA., Kallikreins on Steroids: Structure, Function, and Hormonal Regulation of Prostate-Specific Antigen and the Extended Kallikrein Locus. *Endocr Rev* 2010;31:407-46). Las KLK se coexpresan en los epitelios de varios órganos y median una variedad de funciones fisiológicas, incluyendo la descamación de la piel y la homeostasia de fluidos corporales (Emami N., Diamandis EP. New insights into the functional mechanisms and clinical applications of the kallikrein-related peptidase family. *Mol Oncol* 2007; 1:269-87). Diversos estudios han observado que los genes/proteínas de KLK se expresan de manera aberrante en múltiples cánceres humanos y su sobreexpresión en tumores en estadio tardío normalmente se asocia con un pronóstico desfavorable para el paciente (Mavridis K, Scorilas A. Prognostic value and biological role of the kallikrein-related peptidases in human malignancies. *Future Oncol* 2010;6:269-85; Nathalie HV, Chris P, Serge G, Catherine C, Benjamin B, Claire B, et al. High kallikrein-related peptidase 6 in non-small cell lung cancer cells: an indicator of tumour proliferation and poor prognosis. *J Cell Mol Med* 2009;13:4014-22; Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, Barnard GF, Ohira M, Hirakawa K, et al. Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11:6800-6). Su expresión se asocia con el crecimiento de células cancerosas, angiogénesis, invasión y metástasis mediante el procesamiento proteolítico de proteínas señalizadoras y componentes de la matriz extracelular (Paliouras M., Diamandis EP. The kallikrein world: an update on the human tissue kallikreins. *Biol Chem* 2006; 387:643-52). De manera similar, se ha informado de una expresión elevada de KLK en el cáncer de ovario en estadio tardío (Karp PD, Paley S, Krieger CJ, Zhang P. An evidence ontology for use in pathway/genome databases. *Pac Symp Biocomput* 2004:190-201); sin embargo, aún no se ha estudiado exhaustivamente su expresión o papel en los estadios tardíos de la enfermedad.

Calicreína 6 y calicreína 7

La proteína calicreína 6 (KLK6) se expresa normalmente como una proenzima en múltiples tejidos adultos. La proteína KLK6 se activa mediante escisión por otras proteasas y después se secreta a fluidos biológicos (Blaber SI, Yoon H, Scarisbrick IA, Juliano MA, Blaber M. The autolytic regulation of human kallikrein-related peptidase 6. *Biochemistry* 2007;46:5209-17; Oikonomopoulou K, Batruch IH, Smith CR, Soosaipillai A, Diamandis EP, Hollenberg MD. Functional proteomics of kallikrein-related peptidases in ovarian cancer ascites fluid. *Biol Chem* 2010; 391:381-90). La KLK6 madura degrada constituyentes básicos de la matriz extracelular y la membrana basal en tejidos (Borgoño CA, Diamandis EP. The emerging roles of human tissue kallikreins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:876-90). En los cánceres de ovario avanzados, la sobreexpresión de esta proteasa, entre otras, se ha asociado con una menor supervivencia libre de enfermedad y una supervivencia general más cortas (Prezas P., Arlt MJ., Viktorov P., Soosaipillai A., Holzscheiter L., Schmitt M., et al. Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 2006; 387:807-11). Además, la sobreexpresión de KLK6 en líneas celulares de cáncer de ovario da lugar a la transformación en un fenotipo celular maligno (Prezas P, Arlt MJ, HViktorov P, Soosaipillai A, Holzscheiter L, Schmitt M, et al. Overexpression of the human tissue kallikrein genes KLK4, 5, 6, and 7 increases the malignant phenotype of ovarian cancer cells. *Biol Chem* 2006;387:807-11). La combinación de sobreexpresión de KLK6 y KLK13 se ha asociado con la recurrencia tumoral (White NM, Mathews M, Yousef GM, Prizada A, Popadiuk C, Doré JJ. KLK6 and KLK13 predict tumor

65

recurrence in epithelial ovarian carcinoma. Br J Cancer 2009; 101:1107-13).

De manera similar, la calicreína 7 (KLK7) (también conocida como enzima quimiotriptica del estrato córneo) se sobreexpresa en cánceres humanos y se secreta en los fluidos corporales (Kyriakopoulou LG, Yousef GM, Scorilas A, Katsaros D, Massobrio M, Fracchioli S, et al. Prognostic value of quantitatively assessed KLK7 expression in ovarian cancer. Clin Biochem 2003; 36:135-43; Shaw JL, Diamandis EP. Distribution of 15 human kallikreins in tissues and biological fluids. Clin Chem 2007; 53:1423-32). La sobreexpresión de KLK7 en células de carcinoma de ovario da como resultado la formación de agregados multicelulares y promueve la quimiorresistencia (Dong Y., Tan OL., Loessner D., Stephens C., Walpole C., Boyle GM., et al. Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin pathway and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. Cancer Res 2010; 70:2624-33).

En relación con la patología clínica de la progresión tumoral, el mantenimiento de la sobreexpresión tanto de KLK6 como de KLK7 tiene fuertes implicaciones en la metástasis tumoral. KLK6 y KLK7 se dirigen enzimáticamente a diversas proteínas extracelulares principales, tales como fibronectina, laminina, otras proteínas estructurales relacionadas con la proteína básica de mielina, gelatina y caseína (Sotiropoulou G., Pampalakis G., Diamandis EP. Functional roles of human kallikrein-related peptidases. J Biol Chem 2009; 284:32989-94). Se ha barajado la hipótesis de que la actividad conocida de KLK7 en la descamación de las capas queratinizadas en la piel normal puede ser similar a su papel en la metástasis (Eissa A., Diamandis EP. Human tissue kallikreins as promiscuous modulators of homeostatic skin barrier functions. Biol Chem 2008; 389:669-80).

Prostasina (PRSS8)

La prostasina (PRSS8), una proteinasa similar a tripsina (40 kDa) es una serina proteasas extracelular anclada a glucosil-fosfatidilinositol (GPI) que se localiza en el cromosoma 16p11.2. La prostasina se aisló por primera vez del fluido seminal y normalmente se produce por la glándula prostática (Yu, J.X., L. Chao y J. Chao, Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. J Biol Chem, 1994. 269(29): pág. 18843-8). Se ha demostrado su expresión en células epiteliales y los conductos de la próstata (Yu, 1994) y también está presente a bajos niveles en la superficie apical de tejidos epiteliales, tales como el pulmón, riñón, hígado, bronquios, colon y glándulas salivales, lo que indica que puede tener papeles en múltiples procesos biológicos (Costa, F.P., et al., Prostasin, a potential tumor marker in ovarian cancer--a pilot study. Clinics (Sao Paulo), 2009. 64(7): pág. 641-4). PRSS8 está presente en múltiples tejidos que absorben sodio (Planes, C., et al., ENaC-mediated alveolar fluid clearance and lung fluid balance depend on the channel-activating protease 1. EMBO Mol Med, 2010. 2(1): pág. 26-37). Actúa como activador proteolítico del canal de sodio epitelial *in vitro* y por tanto, se cree que desempeña un papel importante en la regulación del equilibrio de sodio (Vallet, V., et al., An epithelial serine protease activates the amiloride-sensitive sodium channel. Nature, 1997. 389(6651): pág. 607-10; Vuagniaux, G., et al., Synergistic activation of ENaC by three membrane-bound channel-activating serine proteases (mCAP1, mCAP2, and mCAP3) and serum- and glucocorticoid-regulated kinase (Sgk1) in Xenopus Oocytes. J Gen Physiol, 2002. 120(2): pág. 191-201; Vuagniaux, G., et al., Activation of the amiloride-sensitive epithelial sodium channel by the serine protease mCAP1 expressed in a mouse cortical collecting duct cell line. J Am Soc Nephrol, 2000. 11(5): pág. 828-34). PRSS8 se sobreexpresa en diversos tipos de cáncer, tales como de vejiga urinaria, útero, próstata y ovario, en comparación con su nivel en el tejido normal correspondiente (Mitsui, S., et al., A novel serine protease highly expressed in the pancreas is expressed in various kinds of cancer cells. FEBS J, 2005. 272(19): pág. 4911-23; Ovaere, P., et al., The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. Trends Biochem Sci, 2009. 34(9): pág. 453-63; Selzer-Plon, J., et al., Expression of prostasin and its inhibitors during colorectal cancer carcinogenesis. BMC Cancer, 2009. 9: pág. 201). Sin embargo, su activación de los canales de sodio epiteliales suprime la invasividad *in vitro* del cáncer tanto de próstata como de mama (Yu, J.X., L. Chao y J. Chao, Prostasin is a novel human serine proteinase from seminal fluid. Purification, tissue distribution, and localization in prostate gland. J Biol Chem, 1994. 269(29): pág. 18843-8; Yu, J.X., et al., Structure and chromosomal localization of the human prostasin (PRSS8) gene. Genomics, 1996. 32(3): pág. 334-40; Verghese, G.M., M.F. Gutknecht y G.H. Caughey, Prostasin regulates epithelial monolayer function: cell-specific Gpld1-mediated secretion and functional role for GPI anchor. Am J Physiol Cell Physiol, 2006. 291(6): pág. C1258-70). Se ha descubierto que en el cáncer de vejiga, la pérdida de prostasina se asocia con la EMT - transición de epitelial a mesenquimal - un proceso durante el cual las células epiteliales se convierten en células migratorias e invasivas (Chen et al., BMC cancer 2009, 9: 377). Sin embargo, no se conoce el papel de la prostasina en el cáncer de ovario (Dorn J. et al., Crit Rev Clin Lab Sci. abril de 2014, 51(2): 63-84).

Se ha demostrado que la prostasina regula negativamente la expresión de la proteína de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la fosforilación inducida por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) de Erk1/2 en células de cáncer de próstata PC-3 y se ha sugerido que PRSS8 también escinde el dominio extracelular del EGFR epitelial. El receptor escindido permanece continuamente fosforilado y potencialmente, puede desencadenar metástasis. Además, se ha demostrado que los niveles de PRSS8 en líneas celulares de carcinoma de ovario y en el suero de pacientes con cáncer de ovario están elevados (Costa, F.P., et al., Prostasin, a potential tumor marker in ovarian cancer--a pilot study. Clinics (Sao Paulo), 2009. 64(7): pág. 641-4).

Ha surgido interés en el uso de prostasina como un potencial biomarcador para el cáncer de ovario a raíz de varios

estudios que demostraron que la prostasina está regulada positivamente en los tejidos de cáncer de ovario. En un estudio por Mok et al., se midió la prostasina sérica mediante tecnología de micromatriz en 64 pacientes de cáncer de ovario y en 137 individuos normales. El nivel medio de detección de prostasina sérica fue de 13,7 µg/ml en todos los pacientes con cáncer de ovario en comparación con 7,5 µg/ml en todos los sujetos de control. Como resultado, se calculó que la sensibilidad y especificidad de la prostasina como biomarcador es tan elevada como del 92 % y 94 %, respectivamente. Además, los niveles postoperatorios de PRSS8 en la mayoría de los pacientes presentaron una reducción significativa, lo que indica que PRSS8 puede usarse potencialmente como un biomarcador no solo diagnóstico, sino también pronóstico (Mok, S.C., et al., Prostatin, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst*, 2001. 93(19): pág. 1458-64). De manera similar, en un estudio por Costa et al., se evaluaron los niveles de PRSS8 en 12 pacientes con cáncer de ovario mediante RT-PCR y tinción inmunitaria en relación con los niveles de expresión de PRSS8 en tejidos de próstata normales. Costa et al. demostraron que los niveles de PRSS8 eran de 120 a 410 veces mayores en los pacientes con cáncer de ovario en comparación con los controles normales (Costa, F.P., et al., Prostatin, a potential tumor marker in ovarian cancer--a pilot study. *Clinics (Sao Paulo)*, 2009. 64(7): pág. 641-4). En otro estudio, se demostró que los niveles de PRSS8 en líneas celulares de cáncer de ovario están relacionados con la regulación por la proteína de dedo de cinc 217 (ZNF217), una proteína comúnmente sobreexpresada durante la progresión del cáncer que promueve la supervivencia de células tumorales. Usando análisis de chip génico de Affymetrix en la línea celular de cáncer de ovario HO-8910, se observó el silenciamiento del gen ZNF217, que dio como resultado una regulación negativa de prácticamente factor 8 de 164 genes en comparación con células de control no silenciadas, que incluye PRSS8 y proteína de núcleo con cuatro disulfuros WAP 2 (WFDC2), también conocida como proteína epididimaria humana 4 (HE4), que en la actualidad se usa como un biomarcador de detección temprana para el cáncer de ovario (Sun, G., et al., Microarray analysis of gene expression in the ovarian cancer cell line HO-8910 with silencing of the ZNF217 gene. *Mol Med Rep*, 2009. 2(5): pág. 851-5). Los resultados de estos estudios situaron a la prostasina en la lista de potenciales biomarcadores para la detección temprana del cáncer de ovario (Rein et al., *Journal of Oncology* 2011, ID del artículo 475983, 17 páginas).

Aunque estos estudios parecieron demostrar que PRSS8 está regulada positivamente en el cáncer de ovario en estadio temprano (Costa, F.P., et al., Prostatin, a potential tumor marker in ovarian cancer--a pilot study. *Clinics (Sao Paulo)*; Mok, S.C., et al., Prostatin, a potential serum marker for ovarian cancer: identification through microarray technology. *J Natl Cancer Inst*, 2001. 93(19): pág. 1458-64), se ha desvanecido el interés en esta proteína como un biomarcador potencial, principalmente debido a dos estudios que mostraron resultados opuestos. Por ejemplo, Chien et al. observaron que la prostasina no se encontraba entre los 61 genes que se sobreexpresaban en el carcinoma de alto grado en estadio I (Chien J. et al., *Gynecologic Oncology* 2009 Jul; 114(1): 3-11). En otro estudio, se analizaron más de 40.000 genes en matrices genómicas de tejidos epiteliales obtenidos de pacientes con cáncer de ovario de diferentes grados, estadios y subtipos de la enfermedad y las compararon con un análisis de tejido ovárico normal. PRSS8 no se encontraba entre los genes que se expresaban al menos 3 veces más en tejidos de cáncer de ovario frente a tejidos normales, ni tampoco se encontraba entre los genes que formaban parte de una combinación de genes que podría detectar todos los casos de cáncer (Lu K.H. et al, *Clin Cancer Res*. 15 de mayo de 2004, 10; 3291).

Existe necesidad de biomarcadores útiles en la detección temprana del carcinoma de ovario. La invención descrita proporciona tres biomarcadores de este tipo. Específicamente, los niveles de ARNm y proteína de KLK6, KLK7 y PRSS8 se encuentran significativamente elevados tanto en el tejido de cáncer de ovario como en el suero de cáncer de ovario en estadio temprano. Debido a que pueden detectarse fácilmente el ARNm y la proteína de KLK6, KLK7 y PRSS8 en suero, los sujetos con niveles elevados de expresión de estos marcadores en suero son candidatos adecuados para también obtener y analizar una muestra de tejido para medir el nivel de expresión de KLK6, KLK7 y PRSS8. Cuando tanto el tejido como el suero son positivos para estos marcadores, son posibles un diagnóstico temprano y un tratamiento temprano.

50 Sumario de la invención

La invención descrita proporciona métodos para detectar, diagnosticar y tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II).

De acuerdo con un aspecto, la invención descrita proporciona un método para detectar, diagnosticar y tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en un sujeto que comprende: (a) obtener una muestra de suero del sujeto y obtener una muestra de control de suero normal; (b) aislar de la muestra obtenida en (a) el ARN total que comprende un ARNm de serina proteasa, en donde la serina proteasa es al menos 2 seleccionada entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8; (c) transformar el ARN total aislado de (b) en ADNc que comprende el ADNc de la serina proteasa; (d) amplificar el ADNc de (c); (e) medir un nivel de ADNc de serina proteasa amplificado en (d) como medida de la expresión del ARNm de serina proteasa amplificado; (f) comparar el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (e) expresado por el sujeto con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (e) expresado por la muestra de control de suero normal, en donde un nivel de expresión aumentado del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de suero normal es indicativo de un posible cáncer de ovario en estadio temprano en el sujeto; (g) cuando (f) indica cáncer de ovario en

estadio temprano (I/II) en el sujeto, obtener una muestra de tejido ovárico del sujeto; (h) aislar de la muestra de tejido de ovario obtenida en (g) el ARN total que comprende ARNm de serina proteasa; (i) transformar el ARN total aislado de (h) en ADNc que comprende el ADNc de la serina proteasa; (j) amplificar el ADNc de (i); (k) medir un nivel de ADNc de serina proteasa amplificado en (j) como medida de la expresión del ARNm de serina proteasa amplificado; (l) comparar el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (k) expresado por el sujeto con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (k) expresado por una muestra de control de tejido ovárico normal, en donde un nivel de expresión aumentado del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de un posible cáncer de ovario en estadio temprano en el sujeto; (m) cuando tanto (f) como (l) indican cáncer de ovario en estadio temprano, se diagnostica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; y (n) tratar al sujeto con un régimen de tratamiento eficaz para tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II).

De acuerdo con otro aspecto, la invención descrita proporciona un método para detectar, diagnosticar y tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en un sujeto que comprende: (a) obtener una muestra de suero del sujeto y una muestra de suero normal como control; (b) detectar la proteína serina proteasa en las muestras de (a) haciendo reaccionar un anticuerpo dirigido contra la serina proteasa con la muestra de suero del paciente y la muestra de control de suero normal, en donde la serina proteasa es al menos 2 seleccionada entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8; (c) cuantificar una cantidad de proteína serina proteasa unida al anticuerpo dirigido contra la serina proteasa en (b); (d) comparar la cantidad de proteína serina proteasa en (c) unida al anticuerpo en la muestra de suero del sujeto con la cantidad de la proteína serina proteasa unida al anticuerpo en la muestra de control de suero normal, en donde una cantidad aumentada de la proteína serina proteasa unida en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de control de suero normal indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; (e) cuando (d) indica cáncer de ovario en el sujeto, obtener una muestra de tejido ovárico del sujeto y una muestra de tejido ovárico normal como control; (f) detectar la proteína serina proteasa en las muestras de (e) haciendo reaccionar un anticuerpo dirigido contra la serina proteasa con la muestra de tejido ovárico del sujeto y la muestra de tejido ovárico normal; (g) cuantificar una cantidad de proteína serina proteasa unida al anticuerpo dirigido contra la serina proteasa en (f); (h) comparar la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico del sujeto con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico normal, en donde una cantidad aumentada de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico del sujeto en comparación con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de control de tejido ovárico normal indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; (i) cuando tanto (d) como (h) indican cáncer de ovario en estadio temprano, se diagnostica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; y (j) tratar al sujeto con un régimen de tratamiento eficaz para tratar el cáncer de ovario.

De acuerdo con una realización, la muestra de tejido ovárico es epitelial.

De acuerdo con otra realización, la muestra de control de suero normal es una muestra de mezcla de suero normal.

De acuerdo con una realización, la amplificación se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscriptasa (RT-PCR).

De acuerdo con una realización, la detección se lleva a cabo mediante transferencia Western o inmunohistoquímica.

De acuerdo con una realización, el cáncer de ovario se selecciona entre el grupo que consiste en seroso, papilar seroso, metastásico, de baja malignidad, mucinoso y de células claras.

De acuerdo con una realización, el cáncer de ovario es un cáncer de ovario de grado 1 caracterizado por: (i) tejido bien diferenciado; o (ii) núcleos de bajo grado con figuras mitóticas infrecuentes. De acuerdo con otra realización, el cáncer de ovario es un cáncer de ovario de estadio I caracterizado por: (i) un tumor limitado a un ovario, cápsula intacta, sin tumor en la superficie ovárica y lavados negativos (estadio IA); (ii) un tumor que implica ambos ovarios, cápsula intacta, sin tumor en la superficie ovárica y lavados negativos (estadio IB); (iii) derrame quirúrgico (estadio IC1); (iv) ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie ovárica (estadio IC2); o (v) células malignas en la ascitis o en lavados peritoneales (estadio IC3). De acuerdo con otra realización, el cáncer de ovario es un cáncer de ovario de estadio II caracterizado por: (i) extensión y/o implante de un tumor en el útero y/o las trompas de Falopio (estadio IIA); o (ii) extensión de un tumor a otros tejidos pélvicos intraperitoneales (estadio IIB).

De acuerdo con una realización, el nivel aumentado de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de una expansión de las células del compartimento epitelial tumoral. De acuerdo con otra realización, el nivel aumentado de proteína serina proteasa expresada por el sujeto en comparación con el nivel de expresión de la proteína serina proteasa expresada por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de una expansión de las células del compartimento epitelial tumoral.

Breve descripción de los dibujos

Para una comprensión más completa de la presente divulgación, se hace referencia a la siguiente descripción detallada de las realizaciones ejemplares, tomadas en consideración junto con los dibujos adjuntos.

5 La **figura 1** muestra la sobreexpresión de los genes KLK6 y KLK7 en líneas celulares de cáncer de ovario. (A) Las líneas celulares de cáncer de ovario establecidas que representan diferentes edades, estadios y subtipos se seleccionaron y ensayaron respecto de su expresión de genes de cáncer de ovario conocidos (CA125, HE4 y CEA) mediante PCR de punto final en relación con líneas celulares epiteliales de ovario normales. Los ADN
10 amplificados se compararon cuantitativamente después de la separación por electroforesis como bandas teñidas con bromuro de etidio en geles de agarosa. (B) La expresión génica de KLK6 y KLK7 en líneas celulares de cáncer de ovario (barras negras sólidas) y líneas celulares de ovario normal (N) se analizó mediante qRT-PCR y se normalizó frente a una línea celular de ovario normal "similar a primaria" (IOSE523; barra gris sólida). IOSE523 comienza a mostrar senescencia después de veinte pases, mientras que FIOSE118 es inmortal. El factor medio de cambio representa mediciones por triplicado y se muestran las barras de error estándar.

15 La **figura 2** muestra que la expresión diferencial de los genes KLK6 y KLK7 es significativamente selectiva para el cáncer de ovario frente a otros 18 tipos de cáncer humano. Se ensayaron más de 390 ADNc procedentes de 19 tejidos de cáncer diferentes y los tejidos normales correspondientes mediante RT-qPCR para medir cuantitativamente la expresión génica de KLK6 (A) y KLK7 (B). El factor de cambio representa el nivel de
20 expresión génica en el cáncer normalizada frente al tejido normal correspondiente. El número medio de muestras usado en el ensayo fue de 15 para cáncer y cinco para los tejidos normales correspondientes. Se determinó que la significación estadística de la expresión diferencial de KLK6 y KLK7 en cáncer de ovario (barra negra sólida) frente a los otros tipos de cáncer (barras gris sólidas) es $p < 0,005$ mediante ANOVA de una vía (SigmaStat). Las abreviaturas para los tipos de cáncer son Ov = ovario, AG = Glándula suprarrenal, Br = Mama, CV = Cuello de útero, Co = Colon, En = Endometrio del útero, Kd = Riñón, Es = Esófago, Lv = Hígado, Lu = Pulmón, LN = Ganglio linfático, LT = Tejido linfóide, Pn = Páncreas, Pr = Próstata, St = Estómago, Te = Testículo, TG = Glándula tiroides, UB = Vejiga urinaria y Ut = Útero.

25 La **figura 3** muestra la expresión de los genes de KLK6 y KLK7 en subtipos específicos (A) y aumenta progresivamente en los estadios avanzados (B) y los grados mayores (C) de los tumores ováricos. Niveles de expresión génica medidos cuantitativamente mediante qRT-PCR en ADNC procedentes de tumores de ovario frente a tejido ovárico normal. El nivel de factor de cambio está representado por la altura de cada histograma y se indican las barras de error. Las abreviaturas para los subtipos de cáncer de ovario en (A) son PS = Papilar seroso, S = Seroso, E = Endometriode, M = Mucinoso, C = Células claras, MC = Carcinoma metastásico, B = De
30 baja malignidad y MT = Tipo mixto. Las abreviaturas usadas en (B) son G1, G2 y G3, que representan grados de tumor progresivos; GB es el grado correspondiente a los subtipos de baja malignidad. En (C), los cuatro estadios de tumores progresivos se indican como I, II, III y IV. El número de muestras de tumor de ovario analizadas se proporciona entre paréntesis.

35 La **figura 4** muestra que los genes y proteínas de KLK6 y KLK7 se sobreexpresan en epitelios pero están ausentes en el estroma de tumores de ovario. (A) Para detectar el ARNm en tejidos, se hibridaron *in situ* tumores serosos de ovario (S) y tejidos normales (N) con sondas de oligonucleótidos para KLK6 y KLK7, seguido de visualización de tinción de cromógeno rojo mediante microscopía de campo brillante con una ampliación 10 x. (B) Para detectar la expresión de proteína de KLK6 y KLK7 en tejidos, se analizaron mediante IHC subtipos de
40 tumores de ovario (S = Seroso, PS = Papilar seroso, E = Endometriode) y tejidos de ovario normal (N) que se encontraban o en secciones de montaje completas o en matrices de tejido. La tinción de DAB se visualizó mediante microscopía de campo brillante. (C) Detección de los niveles de proteína de KLK6 y KLK7 en carcinomas serosos mediante inmunohistoquímica, observados con una ampliación 40 x para visualizar la tinción nuclear.

45 La **figura 5** muestra los niveles de proteína de KLK6 y KLK7 en muestras de suero de carcinomas serosos en estadio temprano y en líneas celulares de cáncer de ovario humano. (A) Se analizó la expresión génica de KLK6 (barra negra sólida) y KLK7 (barra gris sólida) en carcinomas serosos y papilares serosos de cada estadio tumoral (I, II, III y IV) mediante qRT-PCR y se calcularon los factores de cambio medios mediante normalización
50 frente a la expresión en tejidos de ovario epiteliales normales (N). El número de muestras usadas en los análisis se indican entre paréntesis y se indican las barras de error. (B) Expresión de proteína específica analizada en inmunotransferencias de mezclas de suero normal (N) ($n = 11$) y diversos subtipos de pacientes de cáncer de ovario en múltiples estadios (I, II, III y IV). Se eliminaron la albúmina y las IgG de las muestras de suero usando el kit de eliminación de albúmina e IgG ProteoPrep Blue (Sigma-Aldrich) antes de la electroforesis (SDS-PAGE). La expresión de proteína KLK en cada muestra se normalizó frente a la señal de transferrina interna. Los
55 histogramas en las gráficas adyacentes a las inmunotransferencias muestran los factores de cambio en los niveles de expresión de proteína KLK, normalizados frente a mezclas de suero normal (N) y transferrina, medidos mediante densitometría cuantitativa. Un asterisco (*) indica carcinomas serosos y papilares serosos.

60 La **figura 6** muestra los resultados de ELISA de CA125 y HE4 para muestras de suero de pacientes con carcinoma seroso en estadio temprano. (A) Producción de proteína CA125 medida mediante ELISA. (B)

Producción de proteína HE4 medida mediante ELISA. Los niveles de proteína de CA125 y HE4 se calcularon como la media de triplicados. La línea que atraviesa la parte interior de (A) y (B) indica el bajo umbral de regulación positiva para CA125 (A) o HE4 (B). Un asterisco (*) indica que un paciente particular no mostró regulación positiva tanto de CA125 como de HE4. NRML = control de ovario normal.

La **figura 7** muestra la expresión de proteína de KLK6 y KLK7 en muestras obtenidas de individuos normales, con tumor benigno y con cáncer de ovario (OVC). (A) La tinción de KLK6 y KLK7 se midió en individuos con OVC (n=38), tumores benignos (n=44) e individuos normales (n=42) mediante inmunohistoquímica (IHC). En KLK6, los niveles benignos fueron significativamente menores en comparación con los normales y OVC (P<0,05). En KLK7, los niveles en OVC fueron significativamente mayores en comparación con el grupo benigno (p<0,05). (B) Se midieron los niveles séricos de KLK7 en cáncer (n=17), tejido benigno y normal (n=19 en cada grupo). P<0,05 entre los grupos normales y de OVC. Las líneas horizontales indican los valores medios.

La **figura 8** muestra la expresión de PRSS8 en tejido de ovario normal, cáncer de ovario y otros tipos de cáncer (A), en líneas celulares de cáncer de ovario (B) y detectada mediante hibridación *in situ* (ISC) (C - parte superior) e inmunohistoquímica (IHC) (C - parte inferior) en tejidos normales y de cáncer de ovario (ampliación de 20 X). En el panel A, se ensayaron más de 390 ADNc procedentes de 19 tejidos de cáncer diferentes y los tejidos normales correspondientes mediante RT-qPCR para medir cuantitativamente la expresión génica de PRSS8. El factor de cambio representa el nivel de expresión génica en el cáncer normalizada frente al tejido normal correspondiente. El número medio de muestras usado en el ensayo fue 18 para cáncer y 1 para tejido normal. En el panel B, la expresión génica de PRSS8 en líneas celulares de cáncer de ovario (barras negras sólidas) y líneas celulares de ovario normal (N) se analizó mediante qRT-PCR y se normalizó frente a una línea celular de ovario normal "similar a primaria" IOSE523. IOSE523 comienza a mostrar senescencia después de veinte pases, mientras que FIOSE118 es inmortal. El factor de cambio medio representa mediciones por triplicado. En el panel C, sección superior, se hibridaron *in situ* ARNm de tejidos de tumores ováricos en individuos normales y pacientes de cáncer de ovario, con sondas de oligonucleótidos para PRSS8, seguido de visualización de tinción de cromógeno rojo mediante microscopía de campo brillante con una ampliación 20X. En el panel C, sección inferior, para detectar la expresión de proteína PRSS8 en pacientes normales y con cáncer, se analizaron por IHC los tejidos que se encontraban en secciones de montaje completas o en matrices de tejidos. La tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB) se visualizó mediante microscopía de campo brillante. La detección de niveles de proteína de PRSS8 mediante inmunohistoquímica se observó con una ampliación 20X para visualizar la tinción nuclear.

La **figura 9** muestra la expresión de PRSS8 en cáncer de ovario (OVC) en estadio temprano. Se midieron los niveles de expresión génica de PRSS8 en tejidos tumorales de pacientes con cáncer de ovario en diferentes estadios de la enfermedad y se representaron como múltiplo de aumento individual (A) y según el promedio y la media (B). Se tiñó un número variable de muestras, estadio I (8 muestras), II (13), III (15), 4 (13) y se analizaron mediante transferencia de Western (C). Los niveles medios de PRSS8 en tejidos tumorales de pacientes con cáncer de ovario se presentan en función de los diferentes grados de la enfermedad (D).

La **figura 10** muestra la expresión de PRSS8 en cáncer de ovario (OVC) clasificado en diferentes grupos. (A), las líneas negras delgadas representan la mediana del nivel de expresión en cada grupo. (*) representa una diferencia significativa (p<0,05). PSR = papilar seroso; SR = seroso; ENDM = endometrioides; BRDLIN = de baja malignidad; CLCR = células claras. Se proporciona un análisis detallado de los niveles de expresión en cada grupo en forma de tabla (B). La expresión de PRSS8 en pacientes en estadio temprano (estadios I y II) se presenta en grupos de 5 subtipos diferentes de OVC (C). Los resultados se presentan como múltiplo de aumento respecto de la expresión en individuos normales.

La **figura 11** muestra las células del microambiente tumoral (Cell 144, 4 de marzo de 2011, 646-674).

La **figura 12** muestra las matrices de tejido de casos de OVC, tumor benigno y normales teñidas para PRSS8 mediante inmunohistoquímica (ampliación 40X).

Descripción detallada de la invención

La invención descrita puede entenderse mejor a partir de la siguiente descripción de realizaciones ejemplares, tomadas junto con las figuras y dibujos adjuntos. Será evidente para los expertos en la materia que las realizaciones descritas de la invención descrita proporcionadas en el presente documento son simplemente ejemplares e ilustrativas y no limitantes.

Definiciones

Los diversos términos usados a lo largo de la presente memoria descriptiva tendrán las definiciones expuestas en el presente documento.

El término "biomarcador" (o "firma biológica"), como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido, una

- proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, un gen, un metabolito o cualquier otra sustancia usada como un indicador de un estado biológico. Es una característica que se mide objetivamente y se evalúa como un indicador celular o molecular de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica. El término "biomarcador de cáncer" (o "firma biológica del cáncer"), como se usa en el presente documento, se refiere a un péptido, una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, un gen, un metabolito o cualquier otra sustancia usada para detectar la predisposición a, o la presencia de, cáncer primario o metastásico en un sujeto. De acuerdo con la invención descrita, los biomarcadores útiles en la detección del cáncer de ovario incluyen, pero sin limitación, KLK6, KLK7 y PRSS8.
- 10 Las expresiones "tumor de baja malignidad", "cáncer de escasa malignidad", "tumor de ovario de baja malignidad" y "cáncer de ovario de baja malignidad" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un grupo de tumores que, a diferencia de los cánceres de ovario típicos, no invaden el estroma ovárico y por lo tanto, se consideran no invasivos. Los tumores de baja malignidad tienen un pronóstico superior en comparación con otros carcinomas de ovario en cualquier estadio.
- 15 El término "ADNc" se refiere a ADN sintetizado a partir de un molde de ARNm maduro. El ADNc se sintetiza con mayor frecuencia a partir de ARNm maduro usando la enzima retrotranscriptasa. La enzima actúa en una sola hebra de ARNm, generando su ADN complementario basándose en el emparejamiento de pares de bases de ARN (A, U, G, C) a sus complementos de ADN (T, A, C, G). Se conocen varios métodos para generar ADNc para obtener, por ejemplo, ADN de eucariota cuyos intrones se han cortado y empalmado. En general, estos métodos incorporan las siguientes etapas: a) una célula eucariota transcribe el ADN (a partir de los genes) en ARN (pre-ARNm); b) la misma célula procesa las hebras de pre-ARNm cortando y empalmado los intrones y añadiendo una cola de poli-A y un remate de metil-guanina 5'; c) esta mezcla de hebras de ARNm maduras se extrae de la célula; d) se hibrida un cebador de oligonucleótido de poli-T a la cola de poli-A del molde de ARNm maduro (la retrotranscriptasa necesita este segmento bicatenario como cebador para empezar a funcionar); e) se añade la retrotranscriptasa, junto con desoxinucleótidos trifosfato (A, T, G, C); f) la retrotranscriptasa hace un barrido del ARNm maduro y sintetiza una secuencia de ADN que complementa el molde de ARNm. Esta hebra de ADN es ADN complementario (ADNc).
- 20 El término "célula" se usa en el presente documento para hacer referencia a la unidad estructural y funcional de los organismos vivos y es la unidad más pequeña de un organismo clasificada como viva.
- 30 El término "afección", como se usa en el presente documento, se refiere a una variedad de estados físicos y pretende incluir trastornos o enfermedades provocados por lesión o cualquier mecanismo o trastorno subyacente.
- 35 El término "enfermedad" o "trastorno", como se usa en el presente documento, se refiere a un deterioro de la salud o a una afección de funcionamiento anormal.
- 40 El término "gen", como se usa en el presente documento, se refiere a una región de ADN que controla una característica hereditaria concreta, normalmente correspondiente a una sola proteína o ARN. Esta definición incluye la unidad funcional completa, que abarca secuencias de ADN codificantes, secuencias de ADN reguladoras no codificantes e intrones.
- 45 El término "hibridación" se refiere al proceso de combinar ácidos nucleicos complementarios, monocatenarios en una sola molécula. Los nucleótidos se unirán a su complemento en condiciones normales, de tal forma que se unirán (o "hibridarán") fácilmente entre sí dos hebras perfectamente complementarias. Sin embargo, debido a las diferentes geometrías moleculares de los nucleótidos, una sola inconsistencia entre las dos hebras harán que la unión entre ellas sea menos favorable energéticamente. La medición de los efectos de la incompatibilidad de bases cuantificando la velocidad a la que se hibridan dos hebras puede proporcionar información acerca de la similitud en la secuencia de bases entre las dos hebras que se están hibridando. La expresión "hibrida específicamente", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso mediante el cual un ácido nucleico forma pares de bases de manera distintiva o definitiva con regiones complementarias de al menos una hebra de ADN que originalmente no estaba emparejada al ácido nucleico. Un ácido nucleico que se hibrida de manera selectiva sufre hibridación, en condiciones de hibridación rigurosas, de la secuencia de ácido nucleico a una secuencia diana de ácido nucleico en un mayor grado detectable (por ejemplo, al menos de 2 veces respecto del fondo) que su hibridación a secuencias de ácido nucleico no diana y hasta la exclusión sustancial de ácidos nucleicos no diana. Las secuencias que hibridan de manera selectiva normalmente tienen al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia, al menos un 90 % de identidad de secuencia o al menos un 100 % de identidad de secuencia (es decir, complementaria) entre sí.
- 50 El término "aislar" y sus diversas formas gramaticales tal como se usan en el presente documento se refiere a la colocación, separación u obtención de una proteína, molécula, sustancia, ácido nucleico, péptido, célula o partícula, en una forma esencialmente libre de contaminantes u otros materiales con los que se asocia normalmente, separado de su ambiente natural.
- 60 El término "calicreína", como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de la familia S1 (clan SA) de serina proteasas similares a tripsina. Las proteínas de calicreína están codificadas por 15 genes (KLK)
- 65

estructuralmente similares regulados por hormonas esteroideas que se ubican juntos en el cromosoma 19q13.4. Las proteínas de calicreína están implicadas en una gran variedad de funciones fisiológicas, tales como regulación de la presión sanguínea, el equilibrio de electrolitos, la remodelación de tejidos, el procesamiento de prohormonas, la plasticidad neural y la descamación de la piel.

5 Los términos "calicreína 6", "calicreína-6" y "KLK6" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un miembro de la familia de serina proteasas de calicreína. El gen de KLK6 comprende 11.043 nucleótidos que codifican una proteína de 244 aminoácidos de longitud. La proteína KLK6 actúa sobre una proteína precursora amiloide, proteína básica de mielina, gelatina, caseína, proteínas de la matriz extracelular (por ejemplo, fibronectina, laminina, vitronectina y colágeno); degrada una α -sinucleína e impide su polimerización; y regula el

10 recrecimiento de axones después de una lesión de la médula espinal.

15 Los términos "calicreína 7", "calicreína-7" y "KLK7" usados indistintamente en el presente documento hacen referencia a un miembro de la familia de serina proteasas de calicreína. El gen de KLK7 comprende 7.627 nucleótidos que codifican una proteína de 253 aminoácidos de longitud. La proteína KLK7 cataliza la degradación de las estructuras cohesivas intercelulares en la capa queratinizada de la piel y está implicada en la activación de precursores para citocinas inflamatorias.

20 El término "metástasis", como se usa en el presente documento, se refiere al crecimiento tumoral o depósito que se ha diseminado a través de la linfa o la sangre a un área del cuerpo distante del tumor primario.

25 El término "metastatizar", como se usa en el presente documento, se refiere a la diseminación del cáncer de una parte del organismo a otra. Un tumor formado por células que se han diseminado se denomina un "tumor metastático" o una "metástasis". La forma del plural de "metástasis" es "metástasis".

30 La expresión "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria y a menos que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales, en tanto que hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de un modo similar a los nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos peptidonucleicos).

35 El término "nucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato. En los nucleótidos más comunes, la base es un derivado de purina o pirimidina y el azúcar es la pentosa, desoxirribosa o ribosa. Los nucleótidos son los monómeros de ácidos nucleicos, uniéndose tres o más entre sí para formar un ácido nucleico. Los nucleótidos son las unidades estructurales del ARN, el ADN y varios cofactores, incluyendo, pero sin limitación, CoA, FAD, DMN, NAD y NADP. Las purinas incluyen adenina (A) y guanina (G); las pirimidinas incluyen citosina (C), timina (T) y uracilo (U).

40 El término "péptido" se usa en el presente documento para hacer referencia a dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico.

45 El término "polinucleótido" se refiere a un desoxirribonucleótido, ribopolinucleótido o análogos de los mismos que tienen la naturaleza esencial de un ribonucleótido natural en tanto que hibridan, en condiciones de hibridación rigurosas, a sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos que los nucleótidos de origen natural y/o permiten la traducción en los mismos aminoácidos que los nucleótidos de origen natural. Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una subsecuencia de un gen estructural o regulador heterólogo. A menos que se indique otra cosa, el término incluye referencia a la secuencia especificada, así como la secuencia complementaria de la misma. Por lo tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas por motivos de estabilidad o de otro tipo son "polinucleótidos" en el sentido previsto en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases infrecuentes, tales como inosina o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solo dos ejemplos, son polinucleótidos en el sentido en que se usa este término en el presente documento. Se apreciará que se han efectuado una gran variedad de modificaciones en el ADN y el ARN que tienen varios fines útiles conocidos por los expertos en la materia. El término polinucleótido en el sentido empleado en el presente documento abarca dichas formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de los polinucleótidos, así como formas químicas de

55 ADN y ARN características de los virus y células, incluyendo, entre otros, células simples y complejas.

60 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácido son un análogo químico artificial de un aminoácido correspondiente de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural. La naturaleza esencial de dichos análogos de aminoácidos de origen natural es que, cuando se incorporan en una proteína, dicha proteína reacciona específicamente con anticuerpos generados contra la misma proteína pero que consiste completamente en aminoácidos de origen natural. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también incluyen modificaciones que incluyen, pero sin limitación, glucosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Se apreciará, como es de sobra conocido y como se indica anteriormente, que los polipéptidos pueden no ser completamente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente como resultado de

eventos postraduccionales, incluyendo eventos de procesamiento natural y eventos provocados por la manipulación humana que no se producen de manera natural. Los polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados pueden sintetizarse mediante procesos naturales no traduccionales y también mediante métodos completamente sintéticos.

5 Los siguientes términos se usan en el presente documento para describir las relaciones de secuencia entre dos o más ácidos nucleicos o polinucleótidos: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia", (d) "porcentaje de identidad de secuencia" y (e) "identidad sustancial".

10 (a) El término "secuencia de referencia" se refiere a una secuencia usada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, en forma de un segmento de un ADNc o una secuencia génica de longitud completa o el ADNc o la secuencia génica completa.

15 (b) La expresión "ventana de comparación" se refiere a un segmento contiguo y especificado de una secuencia de polinucleótido, en donde la secuencia de polinucleótidos puede compararse con una secuencia de referencia y en donde la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos), en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. En general, la ventana de
20 comparación es de al menos 20 nucleótidos contiguos de longitud y opcionalmente, puede ser de al menos 30 nucleótidos contiguos de longitud, al menos 40 nucleótidos contiguos de longitud, al menos 50 nucleótidos contiguos de longitud, al menos 100 nucleótidos contiguos de longitud o más. Los expertos en la materia entienden que para evitar una alta similitud respecto de una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia de polinucleótido, normalmente se introduce una penalización por hueco y se resta del
25 número de coincidencias.

Se conocen bien en la técnica métodos de alineamiento de secuencias para comparación. Puede llevarse a cabo un alineamiento óptimo de secuencias para su comparación mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970); mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444 (1988); mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos, incluyendo, pero sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, Calif.; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., EE. UU.; el programa CLUSTAL está bien descrito por Higgins y Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988);
30 Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet, et al., *Nucleic Acids Research* 16:10881-90 (1988); Huang, et al., *Computer Applications in the Biosciences*, 8:155-65 (1992) y Pearson, et al., *Methods in Molecular Biology*, 24:307-331 (1994). La familia de programas BLAST, que puede usarse para búsquedas de similitud en bases de datos, incluye: BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a bases de datos de proteínas; BLASTP para secuencias de consulta de proteínas frente a bases de datos de proteínas; TBLASTN para secuencias de consulta de proteínas frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos. Véase, *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19, Ausubel, et al., Eds., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995).

45 Salvo que se indique de otra forma, los valores de identidad/similitud de secuencia proporcionados en el presente documento se refieren al valor obtenido usando el conjunto de programas BLAST 2.0 usando parámetros por defecto. Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997). Los programas informáticos para llevar a cabo análisis BLAST se encuentran disponibles públicamente, por ejemplo, a través del National Center for Biotechnology-
50 Information. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencia con alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que o bien cumplen o satisfacen alguna puntuación umbral T valorada positivamente cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una base de datos de secuencias. Se denomina T al umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul et al., anteriormente citado). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semilla para iniciar búsquedas a fin de hallar HSP de mayor longitud que las contengan. Después, se extienden los aciertos de palabra en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en la que pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos con emparejamiento erróneo; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa se reduce en la cantidad X respecto de su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa cae hasta cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectación (E) de 10, un valor de corte de 100, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectación (E) de 10 y la matriz de
65

puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación acerca de la probabilidad de que se produzca al azar una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Las consultas BLAST asumen que las proteínas pueden modelarse como secuencias al azar. Sin embargo, muchas proteínas reales comprenden regiones de secuencias no aleatorias que pueden ser rasgos homopoliméricos, repeticiones de periodos cortos o regiones ricas en uno o más aminoácidos. Dichas regiones de baja complejidad pueden alinearse entre proteínas no relacionadas aunque otras regiones de la proteína sean completamente disímiles. Puede emplearse una serie de programas de filtro de baja complejidad para reducir dichos alineamientos de baja complejidad. Por ejemplo, pueden emplearse los filtros SEG (Wooten y Federhen, Comput. Chem., 17:149-163 (1993)) y XNU (Claverie y States, Comput. Chem., 17:191-201 (1993)) solos o en combinación.

(c) La expresión "identidad de secuencia" o "identidad", en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido se usa en el presente documento para hacer referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas normalmente difieren por sustituciones de aminoácidos conservativas, es decir, donde se sustituyen los restos de aminoácido por otros restos de aminoácido con propiedades similares (por ejemplo, carga o hidrofobia) y por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren por sustituciones conservativas, puede ajustarse por exceso el porcentaje de identidad de secuencia para corregir la naturaleza conservativa de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren por dichas sustituciones conservativas tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservativa como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando a un aminoácido idéntico se le da una puntuación de 1 y a una sustitución no conservativa se le da una puntuación de cero, a una sustitución conservativa se le da una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservativas se calcula, por ejemplo, de acuerdo con el algoritmo de Meyers y Miller, Computer Applic. Biol. Sci., 4:11-17 (1988) por ejemplo, implementado en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif., EE. UU.).

(d) La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se usa en el presente documento para indicar el valor determinado comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia de polinucleótido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos), en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base del ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación o y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

(e) La expresión "identidad sustancial" de secuencias de polinucleótidos significa que un polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia, al menos un 80 % de identidad de secuencia, al menos un 90 % de identidad de secuencia y al menos un 95 % de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia usando uno de los programas de alineamiento descritos usando parámetros convencionales. Un experto en la materia reconocerá que estos valores pueden ajustarse de manera adecuada para determinar la identidad correspondiente de las proteínas codificadas por dos secuencias de nucleótidos teniendo en cuenta la degeneración de codones, la similitud de aminoácidos, el posicionamiento del marco de lectura y similares. La identidad sustancial de secuencias de aminoácidos para estos fines normalmente significa una identidad de secuencia de al menos un 60 % o al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 % o al menos un 95 %. Otra indicación de que las secuencias de nucleótidos son sustancialmente idénticas es si dos moléculas se hibridan entre sí en condiciones rigurosas. Sin embargo, los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos en caso de que los polipéptidos que codifican sean sustancialmente idénticos. Esto puede suceder, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que el polipéptido que codifica el primer ácido nucleico tenga inmunorreactividad cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico.

La expresión "identidad sustancial", en el contexto de un péptido, indica que un péptido comprende una secuencia con al menos un 70 % de identidad de secuencia respecto de una secuencia de referencia, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o un 95 % de identidad de secuencia respecto de la secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Opcionalmente, el alineamiento óptimo se lleva a cabo usando el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Una indicación de

- que dos secuencias de péptidos son sustancialmente idénticas es que un péptido es inmunológicamente reactivo con anticuerpos generados contra el segundo péptido. Por lo tanto, un péptido es sustancialmente idéntico a un segundo péptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren solo por una sustitución conservativa. Los péptidos que son "sustancialmente similares" comparten secuencias como las indicadas anteriormente, excepto por que las
- 5 posiciones de restos que no son idénticas pueden diferir por cambios de aminoácidos conservativos.
- Las expresiones "mal resultado clínico", "mal resultado" o "PO" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a resistente primario no tratado previamente con quimioterapia o recidiva temprana y expuesto a quimioterapia, recidiva múltiple antes de cuatro (4) años o supervivencia acortada/muerte de dos (2) a tres (3) años
- 10 después del diagnóstico.
- El término "cebador" se refiere a un ácido nucleico que, cuando se hibrida a una hebra de ADN, tiene la capacidad de iniciar la síntesis de un producto de extensión en presencia de un agente de polimerización adecuado. El cebador tiene una longitud suficiente para hibridarse de manera única a una región específica de la hebra de ADN. Un
- 15 cebador también puede usarse en ARN, por ejemplo, para sintetizar la primera hebra de ADNc.
- El término "progresión", como se usa en el presente documento, se refiere al transcurso de una enfermedad, tal como cáncer de ovario, a medida que empeora o se disemina por el organismo.
- 20 La expresión "supervivencia libre de progresión" o "PFS", como se usa en el presente documento, se refiere a un espacio de tiempo durante y después del tratamiento de una enfermedad, tal como cáncer, en el que el paciente vive con la enfermedad pero que no empeora. En un ensayo clínico, la medición de la supervivencia libre de progresión es una forma de determinar si un tratamiento está funcionando bien.
- 25 El término "proteína" se usa en el presente documento para hacer referencia a una molécula grande completa o un polipéptido formado por aminoácidos. La secuencia de los aminoácidos en la proteína se determina por la secuencia de las bases en la secuencia de ácido nucleico que la codifica.
- Los términos "PRSS8", "prostasina", "proteasa, Serina, 8", "serina proteasa 8", "proteasa activadora de canales 1" y
- 30 "CAP1" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un miembro de la familia de serina proteasas de tripsina. El gen de PRSS8 comprende 4.398 nucleótidos que codifican una proteína de 343 aminoácidos de longitud. La proteína PRSS8 posee una especificidad de escisión similar a tripsina con preferencia por sustratos polibásicos. La proteína se escinde para producir una cadena ligera y una cadena pesada que se asocian mediante un enlace disulfuro. La proteína PRSS8 estimula la actividad de los canales de sodio epiteliales
- 35 (ENaC) activando la escisión de las subunidades gamma. PRSS8 comparte homología de secuencia a nivel de aminoácidos con la acrosina, la calicreína plasmática, la hepsina, la testisina y la gamma triptasa.
- La expresión "calidad de vida", como se usa en el presente documento, se refiere al disfrute general de la vida, incluyendo aspectos del sentido del bienestar de un individuo y su capacidad para llevar a cabo diversas actividades.
- 40 Los términos "recurrencia" o "recidiva" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia al retorno de un cáncer después de un tratamiento de primera línea y después de un periodo de tiempo durante el cual no puede detectarse el cáncer.
- 45 El término "resistente", como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer que no responde al tratamiento. El cáncer puede ser resistente al comienzo del tratamiento o puede volverse resistente durante el tratamiento. La expresión "resistente primario", como se usa en el presente documento, se refiere a la progresión de una enfermedad durante el tratamiento de inducción o una respuesta parcial o transitoria (por ejemplo, menor de 60 días) a la terapia de inducción. La expresión "terapia de inducción", como se usa en el presente documento, se refiere al primer tratamiento administrado para una enfermedad que normalmente forma parte de un conjunto
- 50 convencional de tratamientos, por ejemplo, cirugía seguida de quimioterapia y radiación. La terapia de inducción normalmente se acepta como la mejor opción de tratamiento. La terapia de inducción también se conoce como "terapia de primera línea", "terapia primaria" y "tratamiento primario".
- 55 La expresión "supervivencia libre de recidiva (RFS)", como se usa en el presente documento, se refiere al espacio de tiempo tras el tratamiento primario para un cáncer durante el cual el paciente sobrevive sin ningún signo o síntoma de dicho cáncer. También se denomina supervivencia libre de enfermedad (DFS).
- La expresión "en relación con", como se usa en el presente documento, se refiere a algo que tiene o que mantiene alguna asociación significativa con otra cosa. La expresión "frecuencia relativa", como se usa en el presente documento, se refiere a la frecuencia de aparición de algo que tiene o que mantiene alguna asociación significativa con la frecuencia de aparición de otra cosa. Por ejemplo, dos tipos celulares, las células X y las células Y ocupan una ubicación dada. Hay 5 células X y 5 células Y en dicha ubicación. La frecuencia relativa del tipo celular X es de 5/10; la frecuencia relativa del tipo celular Y es de 5/10 en dicha ubicación. Después del procesado, hay 5 células X,
- 60 pero solo 1 célula Y en dicha ubicación. La frecuencia relativa del tipo celular X después del procesado es de 5/6 y la frecuencia relativa del tipo celular / después del procesamiento es de 1/6 en dicha ubicación.
- 65

La expresión "factor de riesgo", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier cosa que aumente la probabilidad de que una persona desarrolle una enfermedad.

- 5 Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a una especie animal de origen mamífero que puede beneficiarse de la administración de una composición de fármaco o de un método de la invención descrita. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos y otros animales, tales como caballos, cerdos, ganado, perros, gatos, conejos, ratones, ratas y animales acuáticos.
- 10 El término "síndrome", como se usa en el presente documento, se refiere a un patrón de síntomas indicativos de alguna enfermedad o afección.

Compartimentos de tejido. En los organismos multicelulares, las células que están especializadas para llevar a cabo funciones comunes están normalmente organizadas en conjuntos cooperativos incluidos en una compleja red de macromoléculas extracelulares secretadas, la matriz extracelular (ECM), para formar compartimentos de tejido especializados. Las células individuales en dichos compartimentos de tejido se encuentran en contacto con macromoléculas de la ECM. La ECM ayuda a mantener juntos las células y los compartimentos y proporciona una red o armazón organizado en el que las células pueden migrar e interactuar entre sí. En muchos casos, las células en un compartimento se mantienen en su sitio mediante adhesiones directas entre células. En vertebrados, dichos compartimentos pueden ser de cuatro tipos principales, un compartimento de tejido conectivo (CT), un compartimento de tejido epitelial (ET), un compartimento de tejido muscular (MT) y un compartimento de tejido nervioso (NT), que proceden de tres capas germinales embrionarias: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. El NT y porciones de los compartimentos de ET se diferencian a partir del ectodermo; el CT, el MT y ciertas porciones de los compartimentos de ET proceden del mesodermo; y porciones adicionales del compartimento de ET proceden del endodermo.

La expresión "células del compartimento epitelial tumoral", como se usa en el presente documento, se refiere a células tumorales que surgen de células en el compartimento epitelial que se forman a partir del epitelio. El epitelio es una capa de células que cubre los órganos internos y externos del organismo, que reviste los vasos, las cavidades corporales, las glándulas y los órganos, que forma la epidermis de la piel y la capa superficial de las membranas mucosas y serosas. Las células epiteliales se asientan sobre una membrana basal y se encuentran en estrecha proximidad con poco material intercelular entre ellas. Las células epiteliales están desprovistas de vasos sanguíneos y pueden ser sencillas (que consisten en una sola capa) o estratificadas (que consisten en varias capas). Las células que comprenden el epitelio pueden ser planas (escamosas), con forma de cubo (cuboidal) o cilíndricas (columnares). Las formas modificadas del epitelio incluyen, pero sin limitación, ciliado (prolongaciones similares a vellos en la superficie), pseudoestratificado (parece estratificado debido a que las células están dispuestas con sus núcleos a diferentes niveles), glandular (compuesto por células secretoras) y neuroepitelio (compuesto por células sensoriales). El epitelio puede incluir células caliciformes que secretan moco. El epitelio escamoso se clasifica como endotelio, que reviste los vasos sanguíneos y el corazón y mesotelio, que reviste las cavidades serosas. Las funciones del epitelio incluyen, pero sin limitación, protección, absorción, secreción, movimiento de sustancias a través de conductos, producción de células germinales y recepción de estímulos.

El microambiente tumoral. Con cada vez más frecuencia los tumores se reconocen como órganos cuya complejidad se aproxima e incluso puede superar la de los tejidos sanos normales. Hanahan, D. y Weinberg, R.A., *Hallmarks of Cancer: The next generation*, Cell 144: 646-74 (2011). La biología de un tumor puede entenderse estudiando a las células individuales especializadas en él (fig. 11, parte superior), así como el microambiente tumoral que construyen durante el transcurso de la tumorigénesis en varias etapas (fig. 11, parte inferior). Id.

Como se muestra en la fig. 11, parte superior, la mayoría de tumores sólidos están constituidos por un conjunto de distintos tipos celulares. Tanto el parénquima (componente de tejido funcional) como el estroma (tejido conectivo y componente de soporte) de los tumores contienen distintos tipos y subtipos celulares que de manera colectiva permiten el crecimiento y la progresión tumoral. Id. Las células cancerosas inician los tumores y avanzan la progresión tumoral. Tradicionalmente, las células cancerosas en los tumores se han presentado como poblaciones celulares razonablemente homogéneas hasta un punto relativamente tardío en el transcurso de la progresión tumoral, cuando la hiperproliferación, combinada con la creciente inestabilidad genética, engendra subpoblaciones clonales distintas. Reflejando dicha heterogeneidad clonal, muchos tumores humanos son histopatológicamente diversos, que contiene regiones delimitadas por diversos grados de diferenciación, proliferación, vascularidad, inflamación y/o invasividad. Las células madre de cáncer en los tumores imponen una dimensión adicional de la heterogeneidad intratumoral. Id. La importancia de las CSC como una subclase fenotípica distinta de células neoplásicas sigue siendo un asunto discutido. Id.

Gran parte de la heterogeneidad celular en los tumores se encuentra en sus compartimentos estromales. Las células estromales asociadas a tumores pueden suministrarse a tumores en crecimiento mediante la proliferación de células estromales preexistentes, mediante diferenciación *in situ* de células madre/progenitoras locales que se originan en el tejido vecino normal o mediante reclutamiento de células madre/progenitoras procedentes de médula ósea. Una fuente clave de células estromales asociadas a tumores es la médula ósea. (Id. Citing Bergfeld y DeClerck 2010;

Fang y Salven (2011), Giaccia y Schipani (2010); Patenaude et al (2010); Lamagna y Bergers (2006)).

En muchos casos, los fibroblastos constituyen la población celular predominante del estroma tumoral. La expresión "fibroblasto asociado al tumor" incluye al menos dos tipos celulares distintos: (1) células con similitudes a los fibroblastos que crean los cimientos estructurales que soportan la mayoría de los tejidos epiteliales normales; y (2) miofibroblastos, identificables por su expresión de la α -actina de músculo liso (SMA).

Las células endoteliales que forman la vasculatura asociada al tumor son prominentes entre los constituyentes estromales. Id. Sin embargo, el papel de las células endoteliales que forman los vasos linfáticos sigue sin comprenderse bien. Id. Los pericitos representan un tipo celular mesenquimal especializado relacionado con las células de músculo liso con proyecciones similares a dedos que se envuelven alrededor de los tubos endoteliales de los vasos sanguíneos. La inhibición farmacológica de la señalización a través del receptor de PDGF expresado por los pericitos tumorales y los progenitores de pericitos procedentes de médula ósea da como resultado una cobertura de pericitos reducida de los vasos tumorales, lo que a su vez desestabiliza la integridad y la función vascular. (Id. Citing Pietras y Ostman (2010); Raza et al (2010); Gaengel et al (2009)).

Las células infiltrantes del sistema inmunitario también son constituyentes de los tumores. Las células inflamatorias inmunitarias presentes en los tumores pueden incluir subclases tanto promotoras de tumores como eliminadoras de tumores. Id.

Las células infiltrantes del sistema inmunitario también son constituyentes de los tumores. Las células inflamatorias inmunitarias presentes en los tumores pueden incluir subclases tanto promotoras de tumores como eliminadoras de tumores. Id.

Como se muestra en la fig. 11 (porción inferior), los múltiples tipos celulares estromales crean una sucesión de microambientes tumorales que cambian a medida que los tumores invaden el tejido normal y posteriormente siembran y colonizan tejidos distantes. La abundancia, la organización histológica y las características fenotípicas de los tipos celulares estromales y de la matriz extracelular (fondo rayado), evolucionan durante la progresión, permitiendo de este modo el crecimiento primario, invasivo y después metastásico. Las células normales circundantes de los sitios primarios y metastásicos, mostradas esquemáticamente, probablemente también afectan al carácter de los diversos microambientes neoplásicos. Id.

De acuerdo con una realización, la invención descrita proporciona un método para detectar, diagnosticar y tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en un sujeto que comprende: (a) obtener una muestra de suero del sujeto y obtener una muestra de control de suero normal; (b) aislar de la muestra obtenida en (a) el ARN total que comprende un ARNm de serina proteasa; (c) transformar el ARN total aislado de (b) en ADNc que comprende el ADNc de la serina proteasa; (d) amplificar el ADNc de (c); (e) medir un nivel de ADNc de serina proteasa amplificado en (d) como medida de la expresión del ARNm de serina proteasa amplificado; (f) comparar el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (e) expresado por el sujeto con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (e) expresado por la muestra de control de suero normal, en donde un nivel de expresión aumentado del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de suero normal es indicativo de un posible cáncer de ovario en estadio temprano en el sujeto; (g) cuando (f) indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto, obtener una muestra tejido ovárico del sujeto; (h) aislar de la muestra de tejido de ovario obtenida en (g) el ARN total que comprende ARNm de serina proteasa; (i) transformar el ARN total aislado de (h) en ADNc que comprende el ADNc de la serina proteasa; (j) amplificar el ADNc de (i); (k) medir un nivel de ADNc de serina proteasa amplificado en (j) como medida de la expresión del ARNm de serina proteasa amplificado; (l) comparar el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (k) expresado por el sujeto con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (k) expresado por una muestra de control de tejido ovárico normal, en donde un nivel de expresión aumentado del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de un posible cáncer de ovario en estadio temprano en el sujeto; (m) cuando tanto (f) como (l) indican cáncer de ovario en estadio temprano, se diagnostica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; y (n) tratar al sujeto con un régimen de tratamiento eficaz para tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II).

De acuerdo con otra realización, la invención descrita proporciona un método para detectar, diagnosticar y tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en un sujeto que comprende: (a) obtener una muestra de suero del sujeto y una muestra de suero normal como control; (b) detectar una proteína serina proteasa en las muestras de (a) haciendo reaccionar un anticuerpo dirigido contra la serina proteasa con la muestra de suero del paciente y la muestra de control de suero normal; (c) cuantificar una cantidad de proteína serina proteasa unida al anticuerpo dirigido contra la serina proteasa en (b); (d) comparar la cantidad de proteína serina proteasa en (c) unida al anticuerpo en la muestra de suero del sujeto con la cantidad de la proteína serina proteasa unida al anticuerpo en la muestra de control de suero normal, en donde una cantidad aumentada de la proteína serina proteasa unida en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de control de suero normal indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; (e) cuando (d) indica cáncer de ovario en el sujeto, obtener una muestra de tejido ovárico del sujeto y una muestra de tejido ovárico normal como control;

(f) detectar la proteína serina proteasa en las muestras de (e) haciendo reaccionar un anticuerpo dirigido contra la serina proteasa con la muestra de tejido ovárico del sujeto y la muestra de tejido ovárico normal; (g) cuantificar una cantidad de proteína serina proteasa unida al anticuerpo dirigido contra la serina proteasa en (f); (h) comparar la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico del sujeto con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico normal, en donde una cantidad aumentada de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico del sujeto en comparación con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de control de tejido ovárico normal indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; (i) cuando tanto (d) como (h) indican cáncer de ovario en estadio temprano, se diagnostica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; y (j) tratar al sujeto con un régimen de tratamiento eficaz para tratar el cáncer de ovario.

De acuerdo con una realización, la invención descrita utiliza serina proteasas. Las categorías de serina proteasas incluyen, pero sin limitación, similares a tripsina, similares a quimiotripsina y similares a elastasa. Los ejemplos no limitantes de serina proteasas similares a tripsina incluyen tripsina, calicreína (por ejemplo, KLK6 y KLK7), PRSS8 (prostasina), granzima K, activador del factor de crecimiento de hepatocitos y similares. Los ejemplos de serina proteasas similares a tripsina incluyen, pero sin limitación, quimiotripsina, proteasa similar a quimiotripsina-1 (CTRL-1), proteasa de leucocitos similar a quimiotripsina y similares. Los ejemplos no limitantes de serina proteasas similares a elastasas incluyen la elastasa de neutrófilos (NE), proteinasa 3 (PR3), azurocidina (AZU) y similares.

De acuerdo con una realización, la serina proteasa es al menos dos (2) seleccionadas entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8.

De acuerdo con una realización, la invención descrita utiliza una muestra obtenida de un sujeto. La muestra puede incluir, pero sin limitación, una muestra de tejido, una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de orina, una muestra de saliva y similares. Se conocen bien en la técnica métodos para obtener una muestra de un sujeto. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, biopsia, tal como por ejemplo, una biopsia por punción con aguja gruesa y una biopsia por punción con aguja fina. La muestra puede ser una muestra fresca, congelada o fijada incluida en cera. Los ejemplos no limitantes de muestras fijadas incluidas en cera incluyen muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina.

De acuerdo con una realización, la invención descrita utiliza ácidos nucleicos aislados. Los ácidos nucleicos incluyen, por ejemplo, ADN, ARN y ARNm. Los ácidos nucleicos pueden aislarse, por ejemplo, de tejidos, células, sangre, suero, plasma, orina, saliva, semen y similares. Se conocen protocolos y reactivos para aislar ácidos nucleicos. Los ejemplos no limitantes de reactivos usados para el aislamiento de ácidos nucleicos incluyen tiocianato de guanidina, clorhidrato de guanidina y tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo; la formulación patentada de este reactivo se conoce como Trizol®.

De acuerdo con una realización, la invención descrita utiliza métodos que emplean amplificación de ácidos nucleicos. De acuerdo con una realización de este tipo, la amplificación de ácidos nucleicos se logra mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ejemplos no limitantes de PCR incluyen PCR convencional, PCR en tiempo real, PCR cuantitativa, PCR cuantitativa en tiempo real, PCR múltiplex, PCR de retrotranscriptasa convencional (RT-PCR), RT-PCR en tiempo real, RT-PCR cuantitativa, RT-PCR cuantitativa en tiempo real, RT-PCR múltiplex y similares.

Los cebadores para la amplificación por la PCR de secuencias diana (por ejemplo, secuencias de ARNm de genes de KLK6 y KLK7) pueden diseñarse basándose en la secuencia de la secuencia diana, de acuerdo con procedimientos convencionales. La función de los cebadores es hibridar y amplificar una secuencia diana única y como generadores de una señal para la detección y monitorización de una reacción de amplificación. De acuerdo con algunas realizaciones, los cebadores están sin marcar (tal como en la PCR convencional), mientras que, en otras realizaciones, los cebadores están marcados, tal como con un resto fluorescente. Los cebadores marcados pueden ser de cualquier tipo, incluyendo aquellos que se usan típicamente en las reacciones de RT-PCR cuantitativa, tales como Scorpions, balizas moleculares y similares.

Pueden proporcionarse sondas además de cebadores. Las sondas que pueden usarse para la detección de la amplificación de las secuencias genómicas únicas (por ejemplo, sondas TaqMan®) pueden diseñarse para que hibriden a una secuencia entre dos cebadores de amplificación, preferentemente a 5-15 bases de uno de los sitios de unión al cebador. Típicamente, las sondas están presentes en mezclas de reacción junto con cebadores o conjuntos de cebadores para una reacción de amplificación particular, por ejemplo, una amplificación de una secuencia diana única. Sin embargo, las sondas pueden proporcionarse como componentes separados, que están separadas de los cebadores u otros componentes de una mezcla de reacción.

Los cebadores y sondas están diseñados para tener un tamaño típico para cebadores y sondas para su uso en las reacciones PCR. En general, los cebadores son oligonucleótidos relativamente cortos (aproximadamente 10-30 bases de longitud), mientras que las sondas (por ejemplo, sondas TaqMan®) pueden ser de aproximadamente 15-35 bases de longitud. Los cebadores y sondas se diseñan mediante un proceso que incluye la identificación de secuencias únicas en un ácido nucleico diana, diseñando oligonucleótidos cortos para amplificar o detectar dichas

secuencias y sintetizar los oligonucleótidos. Pueden tomarse en consideración varias características cuando se diseñan los cebadores y sondas: por ejemplo, la temperatura de fusión de la sonda debe ser mayor que la temperatura de fusión del cebador y la distancia entre el extremo 3' de un cebador y el extremo 5' de la sonda puede ser mayor de 8 nucleótidos. Un experto en la materia puede seleccionar entre dichas consideraciones y características para proporcionar cebadores y sondas adecuados. Los protocolos para la síntesis de oligonucleótidos son conocidos por los expertos en la materia. Puede usarse cualquier protocolo adecuado en la síntesis de los cebadores y sondas de la invención.

5 La RT-PCR cuantitativa en tiempo real es un ensayo certero, preciso y de alto rendimiento. La PCR en tiempo real automatiza el proceso de cuantificación de los productos de reacción para cada muestra en cada ciclo. De acuerdo con algunas realizaciones, los sistemas de PCR en tiempo real se basan en la detección y la cuantificación de un indicador fluorescente, cuya señal aumenta en proporción directa con la cantidad de producto de la PCR en la una reacción.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de este tipo, por ejemplo, el indicador es el colorante específico para ADN bicatenario SYBR® Green (Molecular Probes), que se une a ADN bicatenario y tras su excitación, emite luz. Por lo tanto, a medida que se acumula un producto de la PCR, aumenta la fluorescencia. El sistema SYBR® Green (Molecular Probes, Eugene, Oregon) es una forma de detectar y cuantificar los productos de la PCR en tiempo real. El colorante SYBR® Green se une, de manera no específica de secuencia, a ácidos nucleicos bicatenarios. Por lo tanto, se puede usar para la detección y cuantificación de los productos bicatenarios producidos a partir de moldes monocatenarios (por ejemplo, ARNm). Otras sondas y cebadores detectables, tales como sondas amplifluor® y desoxirribosimas, pueden optimizarse para su uso en la detección cuantitativa de los productos de amplificación.

25 Las alternativas a SYBR® Green incluyen, pero sin limitación, TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) y balizas moleculares, siendo ambas sondas de hibridación que se basan en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para la cuantificación. Las sondas TaqMan® son oligonucleótidos que contienen un colorante fluorescente, normalmente en la base 5' y un colorante inactivador, normalmente ubicado en la base 3'. Más específicamente, para las sondas TaqMan®, cuando la sonda está intacta, el inactivador inactiva la señal producida por el marcador fluorescente. Sin embargo, tras la unión de la sonda a la secuencia diana y la posterior digestión de la sonda por la actividad exonucleasa 5'-3' de una polimerasa, tal como la polimerasa Taq, se libera el resto fluorescente del resto inactivador y se produce y se puede monitorizar una señal detectable, que es proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana que se está produciendo. De acuerdo con una realización, La polimerasa Taq se usa en la qRT-PCR debido a su actividad exonucleasa 5'-3' y cambia la fluorescencia de las sondas y permite la amplificación del ARNm de la CDR1. Las sondas TaqMan® se basan en la degradación por una polimerasa para generar una señal detectable, mientras que Scorpions® y las balizas moleculares se basan en la apertura de una estructura en horquilla para proporcionar una señal detectable. Al igual que las sondas TaqMan®, las sondas Scorpion® contienen tanto un resto fluorescente como un resto inactivador en una sola sonda. Sin embargo, a diferencia de las sondas TaqMan®, las Scorpions® no se degradan durante la reacción de amplificación. En cambio, están diseñadas como cebadores para reacciones de amplificación. Los cebadores Scorpion® están diseñados para formar estructuras de horquilla en solución, lo que provoca que el resto fluorescente y el resto de inactivación se encuentren muy próximos. La unión de los cebadores a ácidos nucleicos diana despliega la estructura en horquilla y mueve el resto de inactivación a una distancia suficiente respecto del resto fluorescente de tal forma que se emite fluorescencia detectable.

45 Las balizas moleculares también contienen colorantes fluorescentes e inactivadores, pero la FRET solo se produce cuando el colorante inactivador se encuentra directamente adyacente al colorante fluorescente. Las balizas moleculares están diseñadas para adoptar una estructura de horquilla mientras que se encuentran libres en solución, poniendo el colorante fluorescente y el inactivador en estrecha proximidad. Cuando una baliza molecular se hibrida a una diana, el colorante fluorescente y el inactivador se separan, no se produce la FRET y el colorante fluorescente emite luz tras su irradiación.

50 Es frecuente la multiplexación de las reacciones PCR. La multiplexación permite a un investigador ensayar dos o más dianas génicas diferentes en una sola reacción mediante el uso de múltiples sondas o cebadores, cada uno específico para su propia diana y comprendiendo cada uno un resto fluorescente que emite una longitud de onda única (en comparación con las otras sondas). La multiplexación es posible con sondas TaqMan®, balizas moleculares y Scorpions. A causa de su naturaleza de unión no específica, SYBR® Green puede no ser susceptible a la multiplexación.

60 En general, una reacción de RT-PCR se lleva a cabo mediante uno de dos métodos: comparación con una curva patrón o comparación de valores de Ct. En el primero de estos métodos, se produce una curva patrón de productos de amplificación de un ARNm particular basándose en la amplificación de una serie de cantidades diferentes conocidas de un ácido nucleico preseleccionado. Después, se comparan los resultados de la amplificación de las reacciones llevadas a cabo en un ácido nucleico diana con la curva patrón para obtener una cantidad y dicha cantidad puede extrapolarse a una cantidad de la diana en la muestra original. Aunque se prefiere usar un ARNm como fuente para la curva patrón, se sabe que la estabilidad del ARNm afecta a la validez de dichas curvas patrón y ha resultado difícil superar o minimizar este problema. Para evitar los problemas asociados con el uso de ARNm

como fuente para la curva patrón, los investigadores han usado ADN para la generación de curvas patrón. Aunque el uso de ADN supera los problemas asociados con el uso de ARNm, el simple hecho de que evita los problemas crea otro problema más, es decir, debido a que los moldes de ADN son relativamente estables y debido a que la amplificación de ADN no requiere de una etapa de síntesis de primera hebra (que puede ser ineficaz y variable entre muestras o preparaciones), las curvas patrón producidas a partir de fuentes de ADN normalmente no se correlacionan de manera precisa con la cantidad de ARNm en una muestra de ensayo.

En el método de comparación de Ct para cuantificar los productos de la PCR, se usa la expresión de un gen constitutivo (tal como β -actina) como patrón frente al cual se compara la amplificación de un ácido nucleico diana (por ejemplo, KLK6 y KLK7). A menudo, en este método, se lleva a cabo una comparación de la expresión del ácido nucleico diana en dos condiciones diferentes para determinar los cambios en los patrones de expresión. Este método evita los problemas asociados con la inestabilidad del ARN o el uso de ADN como control que se observan cuando se usa el método de curva patrón convencional.

Los controles se amplifican en la misma mezcla de reacción de la PCR que la secuencia diana en un esfuerzo de cuantificar los productos de la PCR y determinar las cantidades de ácidos nucleicos diana en una muestra. Normalmente estos controles son transcritos de genes constitutivos. Dichos genes constitutivos incluyen, pero sin limitación, β -actina y GAPDH. El control se añade a la mezcla de reacción y se amplifica junto con el ácido nucleico diana. Se incluyen sondas fluorescentes específicas para ambos en la mezcla y se obtienen dos curvas de amplificación. Después, se determina la expresión relativa del ácido nucleico diana con respecto al control. Usando esta técnica, se pueden comparar múltiples muestras diferentes para la expresión de un gen diana (por ejemplo, KLK6 y KLK7) volviendo a hacer referencia al mismo control. Aunque la adición de un control a las reacciones de amplificación puede ser una alternativa útil a otros métodos de cuantificación de los niveles de expresión y puede ser un método útil para normalizar las reacciones PCR entre muestras, no permite determinar cantidades absolutas de materiales presentes en la mezcla de reacción de amplificación o en la muestra original. En cambio, los resultados son cuantitativos o semicuantitativos, proporcionando tan solo una idea de la cantidad de un ácido nucleico (por ejemplo, la diana) en comparación con otro (por ejemplo, el control).

De acuerdo con una realización, la invención descrita proporciona métodos que detectan una proteína en una muestra obtenida de un sujeto. Dichos métodos de detección de proteínas se conocen bien en la técnica e incluyen, pero sin limitación, transferencia de Western, inmunohistoquímica, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos y similares.

Los métodos que detectan proteínas pueden emplear anticuerpos. Los anticuerpos son proteínas séricas cuyas moléculas poseen pequeñas áreas de su superficie que son complementarias a pequeños grupos químicos en sus dianas. Estas regiones complementarias (citadas como los sitios de combinación del anticuerpo o sitios de unión a antígeno), de las cuales hay al menos dos por molécula de anticuerpo y en algunos tipos de anticuerpo diez, ocho o incluso en algunas especies tantos como 12, pueden reaccionar con su región complementaria correspondiente en el antígeno (el determinante antigénico o epítipo) para unir varias moléculas de antígeno multivalente entre sí para formar una red.

La unidad estructural básica de una molécula de anticuerpo completa consta de cuatro cadenas de polipéptido, dos cadenas ligeras (L) idénticas (que contienen cada una aproximadamente 220 aminoácidos) y dos cadenas pesadas (H) idénticas (que contienen cada una aproximadamente 440 aminoácidos). Las dos cadenas pesadas y las dos cadenas ligeras se mantienen juntas mediante una combinación de enlaces no covalentes y covalentes (disulfuro). La molécula está compuesta por dos mitades idénticas, cada una con un sitio de unión a antígeno idéntico formado por la región N-terminal de una cadena ligera y la región N-terminal de una cadena pesada. Las cadenas tanto ligeras como pesadas cooperan normalmente para formar la superficie de unión al antígeno.

Los anticuerpos humanos muestran dos tipos de cadenas ligeras, κ y λ ; las moléculas individuales de inmunoglobulina son generalmente de uno o del otro. En el suero normal, se ha observado que un 60 % de las moléculas tienen determinantes κ y un 30 por ciento de λ . Se ha descubierto que muchas otras especies muestran dos tipos de cadenas ligeras, pero sus proporciones varían. Por ejemplo, en ratón y rata, las cadenas λ comprenden tan solo un pequeño porcentaje del total; en perro y gato, las cadenas κ son muy escasas; los caballos no parecen tener cadenas κ ; los conejos tienen de un 5 a un 40 % de λ , dependiendo de la estirpe y el alotipo del locus b; y las cadenas ligeras de pollo son más homólogas a λ que a κ .

En mamíferos, hay cinco clases de anticuerpos, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, cada una con su propia clase de cadena pesada - α (para IgA), δ (para IgD), ϵ (para IgE), γ (para IgG) y μ (para IgM). Además, hay cuatro subclases de inmunoglobulinas IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) que tienen cadenas pesadas γ 1, γ 2, γ 3 y γ 4, respectivamente. En su forma secretada, la IgM es un pentámero compuesto de cinco unidades de cuatro cadenas, proporcionando un total de 10 sitios de unión a antígeno. Cada pentámero contiene una copia de una cadena J, que se inserta covalentemente entre dos regiones de cola adyacentes.

Las cinco clases de inmunoglobulina difieren de otras proteínas séricas en que muestran una gran variedad de movilidad electroforética y no son homogéneas. Esta heterogeneidad - que las moléculas de IgG individuales, por

ejemplo, difieren entre sí en su carga neta - es una propiedad intrínseca de las inmunoglobulinas.

Un determinante antigénico o epítipo es un sitio antigénico en una molécula. Los determinantes/epítipos antigénicos secuenciales son esencialmente cadenas lineales. En las estructuras ordenadas, tales como polímeros o proteínas helicoidales, los determinantes antigénicos/epítipos podrían ser esencialmente regiones o tramos limitados en o sobre la superficie de la estructura que implican cadenas laterales de aminoácidos de diferentes porciones de la molécula que podrían estar próximas entre sí. Estos son determinantes conformacionales.

El principio de complementariedad, que normalmente se compara con el ajuste de una llave en una cerradura, implica fuerzas de unión relativamente débiles (hidrófobas y enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, e interacciones iónicas), que son capaces de actuar eficazmente solo cuando las dos moléculas que reaccionan pueden estar muy próximas entre sí y de hecho, tan próximas que los átomos o grupos de átomos constituyentes proyectados de una molécula pueden encajar en depresiones o rebajes complementarios en la otra. Las interacciones de antígeno-anticuerpo muestran un alto grado de especificidad, que se manifiesta a diversos niveles. Bajando hasta el nivel molecular, especificidad significa que los sitios de combinación de los anticuerpos para un antígeno tienen una complementariedad en nada similar a los determinantes antigénicos de un antígeno no relacionado. Siempre que los determinantes antigénicos de dos antígenos diferentes tienen cierta similitud estructural, puede producirse cierto grado de encaje de un determinante en el sitio de combinación de algunos anticuerpos con el otro y este fenómeno da lugar a reacciones cruzadas. Las reacciones cruzadas tienen una gran importancia a la hora de comprender la complementariedad o especificidad de las reacciones de antígeno-anticuerpo. La especificidad o complementariedad inmunológica hace posible la detección de pequeñas cantidades de impurezas/contaminaciones entre antígenos.

El término "anticuerpo" puede incluir, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo y similares.

Por ejemplo, pueden generarse anticuerpos monoclonales (mAb) fusionando células de bazo de ratón de un donante inmunizado con una línea celular de mieloma de ratón para dar clones de hibridoma de ratón que crecen en medio de selección. Una célula de hibridoma es una célula híbrida inmortalizada que resulta de la fusión *in vitro* de un linfocito B secretor de anticuerpos con una célula de mieloma. La inmunización *in vitro*, que se refiere a la activación primaria de los linfocitos B específicos de antígeno en cultivo, es otro medio bien establecido para producir anticuerpos monoclonales de ratón.

Por ejemplo, también pueden amplificarse varias bibliotecas de genes variables de cadena pesada (VH) y ligera (Vκ y Vλ) de inmunoglobulina de linfocitos de sangre periférica mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los genes que codifican cadenas de polipéptido individuales en los que los dominios variables de cadena pesada y ligera están unidos por un espaciador polipeptídico (Fv monocatenario o scFv) pueden prepararse combinando aleatoriamente genes V de cadena pesada y ligera usando la PCR. Después, puede clonarse una biblioteca combinatoria para presentación en la superficie de bacteriófagos filamentosos mediante fusión a una proteína menor de la envuelta en la punta del fago.

Por ejemplo, la técnica de selección guiada está basada en el barajado del gen V de inmunoglobulina humana con genes V de inmunoglobulina de roedor. El método (i) implica barajar un repertorio de cadenas ligeras λ humanas con el dominio de región variable de cadena pesada (VH) de un anticuerpo monoclonal de ratón reactivo con un antígeno de interés; (ii) seleccionar Fab semihumanos en ese antígeno (iii) usando los genes de cadena ligera λ seleccionados como "dominios de acople" para una biblioteca de cadenas pesadas humanas en un segundo barajado para aislar fragmentos Fab clonados que tienen genes de cadena ligera humana; (v) transfectar células de mieloma de ratón mediante electroporación con vectores de expresión de células de mamífero que contienen los genes; y (vi) expresar los genes V del Fab que reaccionan con el antígeno en forma de una molécula de anticuerpo IgG1 λ completa en el mieloma de ratón.

De acuerdo con una realización, el cáncer de ovario se selecciona entre el grupo que consiste en seroso, papilar seroso, metastásico, de baja malignidad, mucinoso y de células claras.

De acuerdo con una realización, la invención descrita posibilita la detección del cáncer de ovario de bajo grado (por ejemplo, G1). Se conocen bien métodos para determinar el grado de tumores. Por ejemplo, el grado del tumor puede determinarse mediante examen microscópico del tejido canceroso. El cáncer de ovario de bajo grado puede caracterizarse por tejido bien diferenciado, núcleos de bajo grado con figuras mitóticas infrecuentes y similares.

De acuerdo con una realización, la invención descrita posibilita la detección del cáncer de ovario en estadio I (por ejemplo, IA, IB, IC1, IC2 e IC3)). La determinación del estadio de los tumores se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, puede determinarse el estadio tumoral mediante pruebas que incluyen, pero sin limitación, ultrasonidos, escáner por tomografía computarizada (TC), escáner por tomografía de emisión de positrones (PET), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), rayos X y biopsia. El cáncer de ovario en estadio I puede caracterizarse por un tumor limitado a un ovario, cápsula intacta, sin tumor en la superficie ovárica y lavado negativo; un tumor que implica ambos ovarios, cápsula intacta, sin tumor en la superficie ovárica y lavados negativos; derrame quirúrgico;

ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie ovárica; células malignas en ascitis o lavados peritoneales y similares.

5 De acuerdo con una realización, un nivel de expresión aumentado de dos o más de ARNm de KLK6, ARNm de KLK7 y ARNm de PRSS8 expresados en tejido ovárico de un sujeto en comparación con el nivel de expresión de dos o más de ARNm de KLK6, ARNm de KLK7 y ARNm de PRSS8 expresado por una muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de una expansión de las células del compartimento epitelial tumoral.

10 De acuerdo con una realización, un nivel de expresión aumentado de dos o más de proteína KLK6, proteína KLK7 y proteína PRSS8 expresada en tejido ovárico de un sujeto en comparación con el nivel de expresión de dos o más de proteína KLK6, proteína KLK7 y proteína de PRSS8 expresado por una muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de una expansión de las células del compartimento epitelial tumoral.

15 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que la invención abarca cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de dicho intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en dicho intervalo indicado. También están abarcados por la invención los límites superior e inferior de estos intervalos menores, que pueden incluirse independientemente en los intervalos menores, sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen los límites incluidos también están incluidos en la invención.

20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en la práctica o ensayo de la presente invención pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se han descrito métodos y materiales ejemplares.

25 Cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un/una", y "el/la" incluyen las referencias en plural salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen a fin de proporcionar a los expertos habituales en la materia una divulgación y descripción completa de cómo producir y usar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención y tampoco pretenden representar que los experimentos a continuación sean todos o los únicos experimentos llevados a cabo. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.) pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. Salvo que se indique de otro modo, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio en peso, la temperatura es en grados centígrados y la presión es la atmosférica o próxima a esta.

MATERIALES Y MÉTODOS

45 Bioinformática

Se usó el sistema de gestión de conocimiento Biomax BioXM™ (Biomax Informatics AG, Múnich, Alemania) para prospectar y generar una lista clasificada de genes de cáncer de ovario candidatos de los 6.955 genes de cáncer seleccionados manualmente y 2.200 genes biomarcadores del National Cancer Institute (NCI) y el Cancer Gene Index (CGI). Se usó la herramienta Biomax BioLT™ (NLP) para prospectar 18 millones de extracciones de Medline (94 millones de frases) y 24.000 genes de Hugo para hallar y validar genes asociados con términos de cáncer, relaciones de gen-enfermedad y relaciones de gen-compuesto/tratamiento para cada uno de los 6.955 genes de cáncer. Se usaron los Thesaurus Role Codes del NCI y los Evidence Codes de Karp (Karp, et al., Pacific Symposium on Biocomputing 9: 190-201 (2004)) para anotar más de 1,3 millones de frases relacionadas. La búsqueda de biomarcadores potenciales se llevó a cabo iniciando consultas en BioXM con una combinación de términos de consulta, que incluyeron ovárico, cáncer, biomarcador, sobreexpresión y regulación positiva o negativa.

Líneas celulares y cultivo celular

60 Las líneas celulares de cáncer TOV21G, TOV112D, OV-90, CAO3, SKOV3, PA-1, SW626 y ES-2 se adquirieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se cultivaron en los medios sugeridos por el distribuidor. Las células SKOV-1, IGROV-1, HEY, OV-2008, A2780, UCI-101 y UCI-107 se obtuvieron de los Dr. Howell (University of California, San Diego) y Carpenter (University of California, Irvine) y todas se cultivaron en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La línea celular DOV13 se obtuvo del Dr. Bast (MD Anderson Cancer Center) y se cultivó en DMEM. Las células CSOC882 se obtuvieron del Dr. Karlan (University of California, Los Angeles) y se cultivaron en medio 5A de McCoy. La línea celular 2774 se obtuvo del Dr. Wolf (MD Anderson Cancer Center) y se cultivó en EMEM. La línea celular BG-1 se obtuvo del Dr. Korach (NIEHS, National Institutes of Health)

y se cultivó en una mezcla 1:1 de DMEM y medio F12 son rojo de fenol. Las líneas celulares epiteliales de ovario normales FHIOSE118 e IOSE523 se obtuvieron del Dr. Cheng (Moffitt Cancer Center) y del Dr. Nelly Auersperg (University of British Columbia), respectivamente y se cultivaron en una mezcla 1:1 de MCDB105 y medio 199. Todos los medios de cultivo se suplementaron con un 5-15 % v/v de seroalbúmina fetal (FBS; Hyclone, Logan, UT) y solución de penicilina/estreptomina (Invitrogen).

RT-PCR y análisis estadístico

El ARN total se extrajo de células usando Trizol (Invitrogen) y se generó ADNc con el kit de síntesis de ADNc SuperScript III RTS First-Strand (Invitrogen) como se describe por el fabricante. Todos los cebadores de amplificación se sintetizaron para su uso con el dispositivo de RT-PCR ABI7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA) del modo recomendado por Applied Biosystems y se demostró que producían una sola banda de PCR del tamaño esperado mediante electroforesis en geles de agarosa de PCR de punto final a partir de moldes de ADNc generados a partir de líneas celulares de ovario normal. Típicamente, los cebadores fueron 20meros con temperaturas de fusión (T_m) de 58 °C. Para la qPCR, se usaron 43 ng de ADNc, 10 pmol de cebadores y mezcla maestra de PCR SYBR Green (Applied Biosystems) en un volumen total de 20 μ l. Todos los ensayos por qPCR usaron placas de reacción de 96 pocillos MicroAmp Fast Optical con código de barras (Applied Biosystems) en el modo estándar (primera desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos y después, 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, seguido de 60 °C durante 1 minuto). Los datos de la qPCR se normalizaron frente a GAPDH interno o ADNc de β -actina y después se analizaron mediante el programa informático proporcionado con el dispositivo ABI7900. Los especímenes de poca calidad que no produjeron valores significativos después de 40 ciclos de qPCR no se incluyeron en las etapas de procesamiento de datos. Se usó el TissueScan Cancer Survey Panel para preseleccionar 22 tipos diferentes de cáncer humano (más de 380 bioespecímenes) y se usó el Ovarian Cancer Panel I-IV para determinar el nivel de expresión de los genes en diversos estadios, grados y subtipos de cáncer de ovario (más de 190 bioespecímenes) (ambos de OriGene, Rockville, MD) como se describe por el fabricante. Los paneles TissueScan Survey se adquirieron en un formato de 96 pocillos con ADNc liofilizado de diversos pacientes con diferentes tipos de cáncer. Cada pocillo de la placa contenía 2-3 ng de ADNc y se dividió la placa para escanear dos genes. La mezcla de reacción se transfirió a una "Fast Plate", que es compatible con la máquina de RT-PCR ABI 7900 HT. Después de dividir cada placa en dos "Fast-Plate", cada reacción consistió en aproximadamente 1-1,5 ng de ADNc. Las condiciones usadas son las siguientes: 1.ª desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 60 °C durante 1 minuto. Los datos de los paneles de TissueScan se normalizaron usando beta-actina. Todos los tejidos de cáncer en estos pacientes contienen una media de un 75 % de células cancerosas y un 25 % del estroma circundante. También se obtuvieron muestras de tejido ovárico de bancos de tejidos en el MD Anderson Cancer Center (MDACC) y de la Thomas Jefferson University (TJU), ambas aprobadas por el IRB. Todos los ensayos de qRT-PCR se efectuaron por duplicado y se repitieron los experimentos un mínimo de dos veces. Para el análisis estadístico, se usó el programa informático SigmaPlot 12 (SysStat Software, Chicago, IL) o JMP4 (SAS Institute) para determinar los valores p de las diferencias en la expresión entre cánceres de ovario y de otros tipos frente a los tejidos normales correspondientes. Se usó una prueba de la t o análisis de la varianza (ANOVA) para calcular las diferencias entre las medias de los grupos de muestra frente a los controles normales y obtener los valores p correspondientes.

Inmunohistoquímica

Las preparaciones de tejidos completos incluidos en parafina y las matrices de tejido (US Biomax, Rockville, MD; Proteogenex, Culver City, CA; y el Banco de Tejidos de la Thomas Jefferson University, aprobada por el IRB) se sometieron a tinción histoquímica como se describe por los fabricantes de los anticuerpos. Las secciones de tejido se desparafinaron usando agente de limpieza Histochoice (Amresco, Solon, OH) durante 5 minutos seguido de etapas de hidratación con un 100 %, 90 %, 70 % y 50 % de etanol durante 5 minutos cada una. Después de equilibrar con PBS durante 5 minutos, los tejidos se incubaron con solución a alto PH (Amresco) a 95 °C durante 20 minutos para recuperar los antígenos. Las secciones se enfriaron y se lavaron con PBS durante 5 minutos, las peroxidasas endógenas se bloquearon incubando en H_2O_2 al 30 % durante 15 minutos, las secciones se marcaron con un bolígrafo PAP hidrófobo (Vector Labs, Burlingame, CA), se bloquearon durante 3 horas con BSA al 5 % en PBS/Tween-20 al 0,1 % y después se incubaron en anticuerpos primarios durante una noche a 4 °C. Las secciones se lavaron dos veces en PBS/Tween-20 al 0,1 % durante 10 minutos cada vez y después una vez en PBS durante 10 minutos. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo secundario adecuado (Jackson ImmunoResearch Laboratories) durante 2 horas, seguido de las mismas etapas de lavado descritas anteriormente. Se usó kit de diaminobencidina (DAB) (Vector Labs) para visualizar el antígeno; el revelado de color se interrumpió mediante lavado con agua destilada durante 5 minutos. Se usó hematoxilina (Amresco) como contratinción para visualizar los núcleos. Las secciones se deshidrataron usando soluciones de etanol en la secuencia de 50 %, 70 %, 90 %, 100 % durante 5 minutos cada vez y 5 minutos en agente de aclarado Histochoice. La tinción de diaminobencidina (DAB) se visualizó mediante microscopía de campo brillante. Después de montar los tejidos (Permout, Vector Labs), se tomaron fotografías de las preparaciones con un microscopio Axio Imager (Carl Zeiss, Thornwood, NY) y se tomaron imágenes con una ampliación 20x y 40x.

Hibridación *in situ*

Se desparafinaron las secciones de tejido de ovario, se procesaron para la recuperación de antígeno a alto pH, se desproteinaron mediante tratamiento con proteinasa K (10 µg/ml) (Roche) en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos y después, se trataron con glicina al 0,2 % p/v durante 30 segundos para inactivar la enzima. Después de fijar las secciones con paraformaldehído al 4 % p/v (PFA; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA) durante 10 minutos, se bloquearon las secciones con tampón de hibridación (formamida al 50 % v/v, suero salino-citrato de sodio 5x (SSC), ácido cítrico 9,2 mM, 50 µg/ml de heparina, 500 µg/ml de ARN de levadura y Tween-20 al 0,1 % v/v) durante 2 horas a 54 °C. Las secciones se incubaron durante una noche en una cámara humidificada con sondas marcadas con digoxigenina (DIG) (20 nM, Exiqon, Woburn, MA). La secuencia de la sonda para KLK6 fue 5'-DIG-GACCAAGTCCTCACTCATCAC-3' (SEQ ID NO: 1) y para la sonda para KLK7 fue 5'-DIG-AAAGTACACAGAAGGAAGGAGA-3' (SEQ ID NO: 2). La secuencia de la sonda para PRSS8 fue 5'-DIG-GCAGTAAAACCTGACTCTCA (SEQ ID NO: 3). Las secciones se lavaron tres veces durante 30 minutos con solución de lavado de hibridación (formamida al 50 % v/v que contiene SSC 2x) a 54 °C y después con solución de lavado (Tween-20 al 0,1 % v/v en suero salino tamponado con fosfato, PBS) durante 5 minutos cinco veces a temperatura ambiente. Después de bloquear durante 3 horas a temperatura ambiente con seroalbúmina bovina (BSA) al 5 % p/v, se trataron las secciones con anticuerpo de ratón anti-DIG (SC-57583, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), a una dilución de 1:1000 en BSA al 5 % durante una noche. Las secciones se lavaron en PBS que contenía Tween-20 al 0,1 % v/v cuatro veces durante 5 minutos y después una vez en PBS durante 5 minutos. Para visualizar la sonda unida, se usó el kit Envision G/2 System/AP Rabbit/Mouse Permanent Red (Dako, Carpintería, CA) como se describe por el fabricante. Los tejidos teñidos se procesaron adicionalmente y se tomaron fotografías como se ha descrito anteriormente para la inmunohistoquímica.

Análisis de inmunotransferencia

Se adquirieron muestras de suero de pacientes con cáncer de ovario (n = 44) y de donantes femeninos normales (n = 10) de Proteogenex (Costa Mesa, CA) y Bioserve (Beltsville, MD); estas muestras representan diversos estadios tumorales, grupos de edad y etnias. Las proteínas séricas abundantes se eliminaron con el kit de eliminación de albúmina ProteoPrep Blue y de eliminación de IgG (ambos de Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como se describe por el fabricante antes de la separación de las muestras mediante electroforesis a través de geles de poliacrilamida que contienen dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). Las columnas se equilibraron usando el tampón de equilibrado proporcionado con el kit. Se añadió la muestra de suero (65 µl) y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos en la columna equilibrada que contenía lecho de medio y después, se centrifugó la columna durante 60 segundos a 12.000 rpm y el eluato se volvió a aplicar al lecho de medio, se incubó durante 10 minutos y se centrifugó como en el caso anterior, seguido de lavado de la columna con tampón de equilibrado (100 µl) y después se agrupó el suero agotado. Se usó el ensayo Bradford (BioRad Laboratory, Hercules, CA) para medir la concentración de proteína. Se resolvieron mediante SDS-PAGE en geles al 12,5 % p/v veinte microgramos (20 µg) de proteínas de los eluatos en tampón de carga (Tris-HCl 0,5 M, NaCl 0,15 M, IGEPAL al 1 %, mini completo (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) que contenía 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, fluoruro de p-metilsulfonilo (PMSF) 1 mM, NaVO₃ 1 mM, NaF 0,05 M y EGTA 1 mM), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratory) y después se examinaron adicionalmente mediante análisis de transferencia de Western. Las membranas se sondaron con anticuerpo anti-KLK6 primario, (H60) anticuerpo anti-KLK7 primario (1407) y anticuerpo anti-PRSS8 primario (Santa Cruz Biotechnology) y después con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Las proteínas reactivas se visualizaron mediante quimioluminiscencia con sustrato SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL).

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para este estudio se usaron kits de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) para medir la producción de CA-125 y HE4 de suero de pacientes de cáncer de ovario correspondientes (Proteogenix, Culver City, CA) y se siguió el protocolo del fabricante. En resumen, todos los reactivos, diluciones patrón y muestras se prepararon siguiendo las instrucciones del prospecto. A continuación, se retiró del marco de la placa el exceso de tiras de microplaca y se devolvieron al envase de aluminio que contenía desecante y se volvió a sellar. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de diluyente de ensayo. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de patrón, control o muestra a cada pocillo, los pocillos se cubrieron con un sello de placa y se incubaron los pocillos a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de microplacas orbital horizontal. Después de la incubación, se aspiraron los pocillos y se lavaron 4 veces como se indica en el prospecto. A continuación, se añadieron a cada pocillo 200 µl de conjugado, los pocillos se cubrieron con un nuevo sello de placa y se incubaron los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de microplacas orbital horizontal. Después de la incubación, se aspiraron los pocillos y se lavaron 4 veces como se indica en el prospecto. se añadieron a cada pocillo 200 µl de solución de sustrato y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente sobre el banco de trabajo resguardadas de la luz. Después de la incubación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de solución de paro. Cada pocillo se leyó a 450 nm (con corrección de la longitud de onda ajustada a 540 nm o 570 nm) en 30 minutos.

Se usaron CA-125 (R&D Systems, Minneapolis, MN) o HE4 (Novoprotein, Summit, NJ) humanas recombinantes como controles positivos y se diluyeron adicionalmente como patrones. Para este fin se evaluaron diecinueve (19) muestras de suero de pacientes en estadios tempranos (estadio I, 7 pacientes; y estadio II, 12 pacientes). Las

5 proteínas CA-125 y HE4 se compararon en dos pacientes en estadio II y dos en estadio IV. También se midieron los niveles de estas proteínas en suero de tres individuos normales. El suero se diluyó (1:4) antes de las mediciones y los resultados se calcularon como medias de triplicados de cada muestra de suero. Los resultados colorimétricos se leyeron a 495 nm en un lector BioTek Synergy HT. Se usó el programa informático Gene5 para leer y analizar los resultados.

Ejemplo 1: Preselección de biomarcadores potenciales de cáncer de ovario usando bioinformática

10 Para preseleccionar genes humanos con alto potencial de uso como biomarcadores de detección temprana, se usó la plataforma bioinformática BioXM con líneas de consulta que incluyen ovárico, biomarcador, regulación positiva, regulación negativa y sobreexpresión, para prospectar y generar una lista clasificada de genes de cáncer de ovario candidatos a partir de los 6.955 genes de cáncer seleccionados manualmente del National Cancer Institute. (NCI) y el Cancer Gene Index (CGI). Esta base de datos de genes se obtuvo originalmente de proyectos basados en patología clínica (por ejemplo, determinación del estadio de tumores) y generalmente se acepta como fuente de biomarcadores clínicamente relevantes para uso diagnóstico, especialmente para la detección temprana del cáncer.

15 El conjunto de datos de salida contenía una lista cualificada de 125 genes que representan diversos procesos, incluyendo apoptosis, proliferación, invasión, metabolismo y angiogénesis. Los genes se caracterizaron basándose en las vías de señalización. De los 125 genes, 33 genes estaban expresados por exceso o por defecto. Estos 33 genes se validaron usando una biblioteca que consistía en 19 líneas celulares de cáncer de ovario y se normalizaron frente a IOSE523. De los 33 genes, trece (13) genes mostraron una expresión diferencial robusta en la mayoría de las 22 líneas celulares de cáncer de ovario frente a las líneas celulares de ovario normales examinadas ($p < 0,05$).

20 Estos 13 genes se seleccionaron para su detección sistemática frente a los paneles TissueScan que contenían ADNc de 18 tipos de cáncer diferentes. De los 13 genes detectados sistemáticamente, 3 genes (KLK6, KLK7 y PRSS8) se sobreexpresaron solo en cáncer de ovario.

25

Tabla 3. Método de prospección de datos basada en bioinformática para la identificación de biomarcadores de cáncer de ovario potenciales.

Biomarcadores potenciales para cáncer de ovario											
	<u>Ca125</u>	CLEC3B	<u>KLK6</u>	TOP2A	ARID4B	CEA	ID2	IGFBP2	INH1		
ATP7B	HE4	<u>DUSP1</u>	BSG	CLDN3	REEP5	MIF	IGF2BP1	LGALS3BP	CDC25C		
PDGFA	CA72-4	<u>IL13RA2</u>	STAT3	CLDN4	CCT3	AFP	IQGAP1	MSLN	NME1		
BRCA2	BARD1	PLK1	RAET1E	COPS5	CD47	Prolactina	RHOC	ST14	AKT2		
DNAJC15	<u>BCL2</u>	VIL2	TITF1	CSF1	ETV4	MUC 1	RNASE2AMH	Amh	ANGPT2		
KLK14	IGFII	<u>APOD</u>	TFF1	EFNB1	MAGEA4	AMH	SYCP1	CDC25A	XIST		
KLK9	BAG1	CD247	SPINK1	KLK11	SCGB2A1	WT1	TRIM25	CSFIR	KLK10		
WFDC2	BAG3	CDC25B	<u>PRSS8</u>	KLK13	SIX5	OGP	P11	GADD45A	KLK15		
ERCC1	BAG4	<u>DAB2</u>	CCNE1	MVP	ZNF217	CDX2	CYP2A	HLA-G	KLK5		
KLK8	Osteopontina	HMGA1	CEACAM6	PARP1	EYA2	SMRP	PTK2	JUP	KLK7		
RBL2	Maspina	HOXB7	ETS1	VEGFC	ELF1	Bcl-xL	TACC3	MLANA	SOD1		
SKP2	MSN	BCHE	EPHA2	ASNS	MUC5AC	TNFRSF1B					
IGFBP5											

Ejemplo 2: Detección previa sistemática de biomarcadores de cáncer de ovario potenciales usando una biblioteca de líneas celulares de cáncer de ovario

La detección previa sistemática de la expresión en líneas celulares de cáncer de ovario es una solución práctica para obtener amplios perfiles de expresión a la vez que se ahorra en las valiosas muestras de paciente. En este estudio, se usó una biblioteca de 19 líneas celulares de cáncer de ovario y dos de ovario normal para la detección sistemática de la expresión de ARNm. El fenotipo de las líneas celulares de ovario normal fue una mezcla de epitelial y fibroblástico (datos no mostrados). Inicialmente, se ensayaron los 117 genes frente a varias líneas celulares de cáncer de ovario que representaban diferentes grados y subtipos y frente a dos líneas celulares de ovario normales mediante qRT-PCR.

Como se observa en la figura 1A, los ARNm de los biomarcadores de cáncer de ovario clínicamente establecido CA125 (antígeno de cáncer 125), HE4 (proteína epididimaria 4 humana) y CEA (antígeno carcinoembrionario) estaban sobreexpresados en todas estas líneas. De la primera etapa de detección sistemática, se seleccionaron 30 genes candidatos que se expresaban de manera diferencial en líneas celulares de cáncer frente a las de control: APOD (apolipoproteína D), BCHE (butirilcolinesterasa), BCL-2 (linfoma de linfocitos B 2), CA125, CDX2 (caja homeostática de tipo caudal 2), CLDN3 (claudina 3), CLDN4 (claudina 4), CSF1 (factor estimulante de colonias 1), DAB2 (fosfoproteína sensible a mitógeno, homólogo 2), DUSP1 (fosfatasa de especificidad dual 1), ETS1 (homólogo 1 del oncogén E26 del virus de la eritroblastosis aviar v-ets), IGFBP5 (proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 5), IL13RA2 (receptor alfa 2 de interleucina 13), JUP (placoglobina de unión), KLK5 (calicreína 5), KLK6 (calicreína 6), KLK7 (calicreína 7), KLK8 (calicreína 8), KLK13 (calicreína 13), MAGEA4 (familia A de antígenos de melanoma, 4), MASPIN (serpina mamaria), MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos), MLANA (melanina), MSLN (mesotelina), P11 (proteína A10 de unión a calcio S100), PRSS8 (serina proteasa 8), ST14 (supresor de la tumorigenicidad 14), TNFRSF1B (miembro 1B de la superfamilia de receptor de factor de necrosis tumoral), VEGFC (factor de crecimiento endotelial vascular C) y WFDC2 (HE4; proteína epididimaria humana 4). De estos, 12 genes estaban regulados positiva o negativamente de manera consistente más de 10 veces en más del 70 % de todas las líneas celulares de cáncer de ovario que representan diferentes grados procedentes principalmente de cáncer de ovario en estadio tardío: los genes BCL2, CDX2, KLK7, KLK6, P11 y PRSS8 estaban regulados positivamente y los genes IGFBP5, DUSP1, DAB2, VEGFC, IL13RA2 y APOD estaban regulados negativamente. Entre estos 12 genes, KLK6 y KLK7 estaban regulados positivamente de manera consistente (>10 veces) en la mayoría de líneas celulares de cáncer de ovario creadas originalmente para la detección sistemática de la expresión de ARNm (figura 1B).

Ejemplo 3: Expresión elevada de ARNm de KLK6 y KLK7 en especímenes de cáncer de ovario

En este estudio, se analizó la expresión de los 12 genes seleccionados mediante qRT-PCR como una etapa final de la detección sistemática, medida en muestras normales y de cáncer de 394 individuos y que representaban 18 tipos tumorales diferentes, aparte de cáncer de ovario.

El análisis indicó que la expresión de ARNm diferencial media entre tumor ovárico frente a tejidos ováricos normales fue de más de 500 veces para KLK6 ($p < 0,001$) y de más de 3000 veces para KLK7 ($p < 0,001$). El control normal fue una mezcla de componentes epiteliales y estromales, representando el auténtico ovario normal. Además, la sobreexpresión diferencial de ambos ARNm fue altamente específica para el cáncer de ovario en relación con "cáncer frente a tejidos normales correspondientes" de otros tipos de cáncer ($p < 0,001$ a un nivel de confianza del 95 %, IC = 20 con un 30 % de la población total) (figura 2). La diferencia entre el cáncer frente al tejido normal correspondiente fue mayor en el cáncer de ovario en comparación con otros tipos de cáncer principales. La expresión de KLK6 y KLK7 estaba regulada negativamente en cánceres de mama (87 veces y 75 veces, respectivamente) y de riñón (68 veces y 234 veces, respectivamente) en relación con los tejidos normales correspondientes.

Sin desear quedar ligados a teoría alguna, la mayor expresión de KLK6 y KLK7 en carcinomas de ovario frente a tejidos ováricos normales (en mayor medida elementos del estroma; diferencia de > 100 veces) sugiere que la expresión basal puede estar estrechamente regulada en el epitelio mediante la presencia de hormonas y otros factores en ovarios normales.

Ejemplo 4: Expresión de ARNm de KLK6 y KLK7 en subtipos, grados y estadios del cáncer de ovario

En este estudio, se analizaron los patrones de expresión de KLK6 y KLK7 en cánceres de ovario mediante qRT-PCR en 192 muestras de ADNc procedentes de tejidos normales ($n = 27$) y de cáncer de ovario ($n = 135$ y 142 para KLK6 y KLK7, respectivamente) que representan ocho subtipos principales de origen epitelial, incluyendo papilar seroso, seroso, endometriode, mucinoso, de células claras, carcinoma metastásico y casos de baja malignidad.

En primer lugar, se evaluó la expresión dependiente de subtipo de las KLK. Los ARNm tanto de KLK6 como de KLK7 estaban significativamente sobreexpresados ($p < 0,005$) en carcinomas papilares serosos, serosos, carcinoma metastásico, carcinomas de escasa malignidad y carcinomas de tipo mixto frente a tejidos de ovario normales (figura 3A). Ambos genes también estaban sobreexpresados ($p < 0,01$), aunque en menor medida, en los subtipos mucinosos y de células claras, especialmente para KLK6. Esta firma de sobreexpresión se observó en subtipos que

se producen en más de un 90 % de los cánceres de ovario. Por lo tanto, KLK6 y KLK7 son candidatos potenciales para marcadores de detección temprana.

5 A continuación, se evaluó la expresión dependiente del grado y se observó que los transcritos de KLK6 y KLK7 estaban sobreexpresados 84 y 212 veces, respectivamente, en tumores de bajo grado (G1) frente a controles normales ($p < 0,001$). La expresión tanto de KLK 6 como de KLK 7 aumentó >3 veces respecto de los grados de tumor más bajos (G1) a más elevados (G3) o respecto de los tumores de escasa malignidad (GB) (figura 3B).

10 Para la determinación del estadio del tumor, los niveles de ARNm tanto de KLK6 como de KLK7 estaban elevados 76 veces y 331 veces, respectivamente, en el estadio I frente a los controles normales ($p < 0,001$) (figura 3C). La expresión de KLK6 y KLK7 no fue estadísticamente significativa ($p > 0,05$) entre los grados y estadios posteriores. Los niveles de ARNm elevados se mantuvieron en los grados y estadios tumorales avanzados.

15 En conjunto, estos datos sugieren que KLK6 y KLK7 pueden ser útiles como biomarcadores para la detección de los cánceres de ovario de bajo grado y en estadio temprano.

Ejemplo 5: Sobreexpresión y especificidad de KLK6 y KLK7 en epitelios tumorales

20 En este estudio, se verificaron la sobreexpresión y localización de KLK6 y KLK7 mediante análisis histológico de 512 muestras de ovario normal y de tumores ováricos y mediante hibridación de sondas de oligonucleótidos a medida para cada gen *in situ* en montajes completos o matrices de tejidos.

25 Los transcritos de KLK6 y KLK7 se expresaron a un nivel basal en ovarios normales. La expresión de estos dos genes aumentó significativamente en tumores frente a los controles y su expresión se limitó exclusivamente al compartimento epitelial de todos los tumores de ovario analizados (figura 4A). En todos los casos analizados, el estroma tumoral vecino, independientemente del subtipo, era negativo para la expresión. Se observaron diferencias moderadas en las intensidades de tinción entre bajo frente a alto grado y en estadios tempranos frente a tardíos, de los tumores de ovario (datos no mostrados).

30 El análisis inmunohistoquímico de KLK6 y KLK7 en el mismo conjunto de tejidos demostró que los patrones de expresión de proteínas de KLK6 y KLK7 eran idénticos a los observados mediante hibridación *in situ* (figura 4B). Ambas proteínas se expresaron exclusivamente en el epitelio tumoral de cánceres serosos, endometrioides y papilares serosos, mientras que el estroma vecino es mínimamente positivo en todos los subtipos de tumores de ovario ensayados (figura 4B). La ubicación de la proteína KLK7 es predominantemente citoplasmática en las células de cáncer de ovario, mientras que la de KLK6 es tanto citoplasmática como nuclear (figura 4C).

40 El análisis inmunohistológico de los tejidos ováricos normales demostró que las proteínas KLK6 y KLK7 estaban ubicadas exclusivamente en la superficie epitelial de tejidos ováricos normales pero no el estroma vecino. Estos resultados demostraron que el aumento en el ARNm y la expresión de proteína de KLK6 y KLK7 estaba asociado directamente con una expansión de las células tumorales en el compartimento epitelial tumoral.

45 Sin desear quedar ligados a teoría alguna, el aumento en la expresión de ARNm y proteína de KLK6 y KLK7 puede estar relacionado con la secreción de citocinas, factores de crecimiento, esteroides y la expresión de receptores hormonales en el epitelio de la superficie ovárica en cánceres de ovario epiteliales. Se entiende que las calicreínas son más activas enzimáticamente y se expresan a mayores niveles durante el periodo de ovulación, cuando se estimulan los ovarios por la gonadotropina (Holland AM, Findlay JK, Clements JA. Kallikrein gene expression in the gonadotrophin-stimulated rat ovary. *J Endocrinol* 2001;170:243-50). Como tal, también se ha encontrado en otros tipos de cáncer señalización relacionada con hormonas esteroides (Graham JD, Mote PA, Salagame U, Balleine RL, Huschtscha LI, Clarke CL. Hormone-responsive model of primary human breast epithelium. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2009;14:367-79; Langner C, Ratschek M, Rehak P, Schips L, Zigeuner R. Steroid hormone receptor expression in renal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis of 182 tumors. *J Urol* 2004;171:611-4; Kumar R, Gururaj AE, Vadlamudi RK, Rayala SK. The clinical relevance of steroid hormone receptor corepressors. *Clin Cancer Res* 2005; 11:2822-31). La regulación positiva de KLK6 y KLK7 en cáncer de ovario puede implicar por tanto cofactores adicionales o propiedades únicas del aumento rápido hormonal.

55 **Ejemplo 6: Los niveles de ARNm de KLK6 y KLK7 están elevados en muestras de biopsia de pacientes con cáncer de ovario papilar seroso y seroso en estadio temprano**

60 En este estudio, se observó expresión elevada de KLK6 y KLK7 en los estadios tempranos de carcinomas de ovario serosos y papilares serosos, que comprenden los tumores de ovario más frecuentemente diagnosticados, a partir del análisis de un total de 59 muestras de cáncer de ovario en estadio temprano obtenidas de archivos de tejido de la Thomas Jefferson University y del MD Anderson Cancer Center.

65 La expresión de ARNm de KLK6 y KLK7 estaba elevada en todos los estadios tumorales de carcinomas serosos y papilares serosos frente a tejidos epiteliales ováricos normales (figura 5A). Los transcritos estaban sobreexpresados de aproximadamente 200 veces a más de 300 veces en los carcinomas en estadio I o II frente a tejidos ováricos

normales ($p < 0,001$ para KLK6 y KLK7), indicando su utilidad como biomarcadores para la detección temprana de los subtipos serosos y papilares serosos en muestras de biopsia. En estos subtipos de tumores de ovario, la expresión de KLK7, pero no la de KLK6, continúa aumentando en el estadio III y el estadio IV.

5 **Ejemplo 7: Los niveles de proteína de KLK6 y KLK7 están elevados en sueros de pacientes de cáncer de ovario papilar seroso y seroso en estadio temprano**

10 Los miembros de la familia de KLK son proteínas secretadas (Henkhaus RS, Roy UK, Cavallo-Medved D, Sloane BF, Gerner EW, Ignatenko NA. Caveolin-1-mediated expression and secretion of kallikrein 6 in colon cancer cells. Neoplasia 2008;10:140-8). En este estudio, se investigaron adicionalmente los niveles de proteína de KLK6 y KLK7 en sueros obtenidos de pacientes con cáncer de ovario mediante análisis de inmunotransferencia.

15 Las muestras de suero se preaclaron para eliminar las proteínas séricas más abundantes. KLK6 y KLK7 no se unieron a proteínas séricas que estaban unidas a la columna de preaclorado (datos no mostrados). La expresión de proteína tanto de KLK6 como de KLK7 estaba significativamente elevada en muestras de suero de cáncer de ovario seroso y papilar seroso en estadio I frente a suero normal mezclado (figura 5B). Otros subtipos mostraron niveles de expresión mixtos en las muestras de suero de tumores en estadio temprano. Se determinó que el múltiplo de aumento medio en seroso y dos subtipos de estadio I frente a suero normal mezclado, mediante densitometría, era de 22 veces para KLK6 y de 6,7 veces para KLK7 ($p < 0,01$, figura 5B), lo que sugiere que tanto KLK6 como KLK7 pueden usarse como biomarcadores de detección temprana en muestras de suero.

20 En contraposición con los niveles de KLK6 y KLK7 en tejido de cáncer de ovario, los niveles de KLK6 y KLK7 en suero, cuando se miden mediante inmunotransferencia, alcanzan un pico en el estadio I y después se reducen en los estadios III y IV. Los mecanismos subyacentes a los niveles de proteína de KLK6 y KLK7 reducidos detectados en el cáncer de ovario en estadio III y en estadio IV no se han determinado todavía. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, las posibles explicaciones incluyen el bloqueo de las vías de secreción o la pérdida de epítopos por la proteólisis aumentada de KLK6 y KLK7.

25 **Ejemplo 8: KLK6 y KLK7 pueden complementar a los biomarcadores establecidos para el cáncer de ovario, HE4 y CA125 para la detección temprana del cáncer de ovario**

30 Las mediciones más comunes que usan los profesionales clínicos para detectar el cáncer de ovario son los niveles de CA125, además de un examen pélvico, ascitis y la consideración del historial familiar. Debido a las limitaciones de CA125 para la detección temprana del cáncer de ovario, la adición de HE4 (que se considera un biomarcador de detección temprana) a CA125 puede mejorar la sensibilidad general, pero puede no ser suficiente para detectar diferentes subtipos de cáncer de ovario. En este estudio, se usaron ensayos ELISA para detectar CA125 y HE4 en pacientes con cáncer de ovario en estadio temprano.

35 Los ensayos ELISA para detectar CA125 y HE4 en pacientes con cáncer de ovario en estadio temprano demostraron que CA125 se detectaba a niveles por encima de lo normal en solo 7 de 19 pacientes en estadio temprano; y en 3 de 4 pacientes en estadio avanzado (estadios IIIC y IV) (figura 6). Los mayores niveles de CA125 y HE4 en general se midieron en pacientes en estadio IV. Se observó HE4 en 11 de 19 pacientes en estadio temprano y en 3 de 4 pacientes en estadio avanzado. Los mayores niveles se detectaron en un paciente en estadio IIA, en tres pacientes en estadio II, así como en un paciente en estadio IV. Estos resultados indican que la sensibilidad (o la tasa de auténticos positivos) fue tan solo de 0,61 para CA125 y de 0,7 para HE4 en pacientes en estadio temprano (estadios I y II), lo que sugiere que CA125 y HE4 no se complementan lo suficiente como para usarlos como biomarcadores para la detección temprana del cáncer de ovario.

40 Basándose en los resultados, se definió un grupo de siete (7) pacientes "falsos negativos" para CA125 y HE4. Este grupo incluyó cuatro (4) pacientes en estadio I, dos (2) pacientes en estadio II y un (1) paciente en estadio III. Cuando se analizó la misma población de pacientes respecto de su expresión de KLK6 y KLK7 mediante inmunotransferencia, como se demuestra en la figura 5B, ambas proteínas estaban significativamente reguladas positivamente, particularmente en el carcinoma seroso y papilar seroso en estadio I.

45 Los datos preliminares del ELISA de suero indicaron que los niveles de proteína KLK7 en pacientes de cáncer de ovario eran significativamente mayores en comparación con los niveles de proteína KLK7 en individuos normales ($p < 0,05$). No hubo una diferencia significativa en los niveles de proteína de KLK7 entre los individuos benignos y normales ($p > 0,05$) (figura 7). De manera similar, Shan et al. comunicaron que las concentraciones en tejido de KLK6 estaban significativamente elevadas en el grupo de cáncer de ovario ($N=259$) en comparación con sus niveles en los grupos benignos ($N=49$) y normales ($N=34$) ($P < 0,001$). No se detectaron diferencias significativas en las concentraciones de KLK6 entre el grupo benigno y normal (Shan S J et al., Transcriptional upregulation of human tissue kallikrein 6 in ovarian cancer: clinical and mechanistic aspects. Br. J. Cancer, 2007. 96(2): pág. 362-72).

50 **Ejemplo 9: La sobreexpresión de PRSS8 es altamente específica para el cáncer de ovario**

65 En este estudio, se usaron PCR, hibridación *in situ* y análisis inmunohistoquímico para determinar la expresión de

PRSS8 en tejido de ovario normal, cáncer de ovario y otros tipos de cáncer, así como en líneas celulares normales y de cáncer de ovario.

5 Se sometió a los 13 genes seleccionados (ejemplo 1) a una etapa de detección sistemática final usando muestras normales y de cáncer que representan 18 tipos de tumores y más de 390 individuos (TissueScan de Origene, datos no mostrados). A partir de esta etapa de detección sistemática, se seleccionó el gen PRSS8 basándose en la especificidad y el nivel de regulación positiva en el cáncer de ovario cuando se comparó con otros tipos de cáncer. La expresión génica diferencial de PRSS8 entre los tejidos de cáncer de ovario y ováricos normales fue de más de 100 veces (figura 8A). Entre los cánceres no ováricos ensayados, el cáncer de vejiga urinaria fue el único cáncer que 10 sobreexpresaba PRSS8, aunque en un grado mucho menor en comparación con el cáncer de ovario (figura 8A). PRSS8 está regulado negativamente en células tumorales de cáncer pancreático (X180) y, en menor medida, en las de cáncer de estómago (figura 8A).

15 La figura 8B muestra el análisis por PCR de la expresión de PRSS8 en 2 líneas celulares normales y 18 de cáncer de ovario. El análisis por PCR reveló que 10 de las 18 líneas celulares de cáncer de ovario ensayadas sobreexpresaban proteína PRSS8 (es decir, prostasina), mientras que la proteína PRSS8 se expresaba negativamente en líneas celulares normales (FHIOSE118 y IOSE523). Las líneas celulares de cáncer SW626 y CAOV3 demostraron expresión aumentada de PRSS8 prácticamente 300 veces y 100 veces, respectivamente (figura 8B).

20 Para observar el nivel de expresión génica de PRSS8 y de proteína PRSS8, se llevó a cabo la tinción de PRSS8 en tejido de cáncer de ovario en comparación con el tejido ovárico normal, usando hibridación *in situ* e inmunohistoquímica. Para la primera técnica, se hibridó una sonda a medida *in situ* con más de 500 tejidos normales y de tumor de ovario en un formato de matriz de tejido. El transcrito de PRSS8 se expresó a un nivel basal en ovarios normales, pero el nivel de expresión del gen aumentó significativamente en el compartimento epitelial de los tumores (figura 8C, paneles superiores). En todos los casos, no hubo tinción en el compartimento estromal tumoral vecino. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, estos datos sugieren la expresión exclusiva de PRSS8 en los epitelios tumorales. La diferencia en la expresión génica para PRSS8 entre los subtipos mucinosos frente a los serosos y de baja malignidad fue consistente a nivel de tejido. La tinción inmunohistoquímica de las proteínas PRSS8 fue idéntica al patrón de tinción *in situ* (figura 8C, paneles inferiores). La proteína PRSS8 tuvo una tinción positiva para el citoplasma de epitelios tumorales, mientras que la tinción estaba ausente en el núcleo. Sin desear quedar limitados a teoría alguna, estos datos sugieren que la sobreexpresión génica se traduce en un alto nivel de producción de proteína. El estroma vecino que se encuentra adyacente a los epitelios tumorales tuvo una tinción mínima para ambas proteasas. Esta firma de tinción de nivel basal coincidió con los datos *in situ*.

35 Estos datos indican que PRSS8 es específico para los tejidos de cáncer de ovario y se expresa en diversas líneas celulares de cáncer de ovario en comparación con tejidos y células normales.

40 **Ejemplo 10: PRSS8 se sobreexpresa en tejidos de pacientes con estadios tempranos/grados de cáncer de ovario y sigue sobreexpresado a lo largo de los estadios de la enfermedad**

Dado que el objetivo era explorar el potencial de PRSS8 como biomarcador de detección temprana para el cáncer de ovario, este estudio midió la expresión de proteína PRSS8 en diferentes estadios de la neoplasia maligna.

45 El estadio del cáncer de ovario (OVC) indica hasta qué punto se han diseminado los tumores más allá de los ovarios y se determina mediante procedimientos tales como biopsias y análisis citológicos. En resumen, en el OVC en estadio I, el tumor está confinado a uno o ambos ovarios. En el estadio II, el tumor se localiza en los órganos pélvicos, tales como el útero y las trompas de Falopio y aún no se ha diseminado a los órganos abdominales. El estadio III indica que el tumor ha alcanzado los órganos abdominales o al sistema linfático. En el estadio IV, el tumor ha alcanzado órganos distantes, tales como el pulmón, hígado, cerebro, etc. Cada estadio puede dividirse 50 adicionalmente en tres categorías (A, B y C). En este estudio, los datos de pacientes se agruparon en 7 categorías de estadio: Estadio I-IA (n=25), IB-IC (n=18), IIA-B-C (n=18), III-III A (n=19), IIIB (n=23), IIIC (n=45) y IV (n=11).

55 Se llevó a cabo el análisis por RT-PCR de las células tumorales de los pacientes y la expresión de PRSS8 (como múltiplo de aumento frente a la expresión en individuos normales) se muestra en la figura 9. La figura 9A muestra los resultados de la PCR individuales en función de los pacientes en diferentes grupos de estadio del cáncer (estadio I a estadio IV). Debido a las diferencias en el número de pacientes (n) en cada grupo, se llevó a cabo la prueba de la t no emparejada. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes en diferentes estadios ($P > 0,05$). Sin embargo, prácticamente todos los pacientes mostraron niveles aumentados de PRSS8 en comparación con los individuos normales. La figura 9B muestra la mediana y la media de la expresión de PRSS8 en y entre diferentes estadios del cáncer/grupos de pacientes. El diagrama de barras demuestra que PRSS8 puede usarse como marcador para la detección temprana del cáncer de ovario, ya que estas medidas eran notablemente 60 mayores en los grupos en estadio temprano (por ejemplo, estadios I y II).

65 La tinción por transferencia Western de sueros individuales de pacientes de OVC en diversos estadios de la enfermedad corresponden a los datos obtenidos del análisis por RT-PCR de tejidos de pacientes de OVC. La figura

9C muestra que se observó expresión de proteína PRSS8 en la mayoría de sueros de paciente en estadio I y II. De manera similar a los datos de la PCR, se observó una expresión más débil en pacientes en estadio III y IV, aunque todas las bandas fueron visibles. Estos resultados de expresión por estadio indican que PRSS8 se expresa en todos los estadios de OVC, observándose una mayor expresión en los estadios tempranos (por ejemplo, estadios I y II).

5 El cáncer de ovario (OVC) se distingue no solo por los estadios, sino también por los grados. Aunque el estadio del OVC indica hasta qué punto ha metastatizado el tumor, el grado del OVC indica la anomalía de las células tumorales (observada mediante un microscopio). Es decir, el grado del OVC indica la agresividad de las células tumorales. En resumen, los cánceres de ovario se gradúan de grado 1 a grado 3: el grado 1 indica que las células parecen próximas a las normales y el grado 3 se define por células de aspecto muy anormal (es decir, altamente agresivas). El grado 2 se asigna a las células de OVC que se observa que son entre el grado 1 y el grado 3. Además, el grado GB indica un tumor de escasa malignidad que es un tipo epitelial de OVC con un bajo potencial maligno.

15 La figura 9D muestra que la expresión de PRSS8 está regulada positivamente en pacientes de todos los grados de OVC. Las puntuaciones fueron particularmente elevadas en los grados I y en GB. Estos resultados indican que puede usarse PRSS8 como biomarcador para la detección del cáncer de ovario en estadio/grado temprano. Cabe destacar que varía significativamente el número de pacientes en cada grupo, en relación con la naturaleza de esta neoplasia maligna. El cáncer de ovario se detecta normalmente en los estadios tardíos de la enfermedad, dando como resultado una elevada tasa de mortalidad para los pacientes de OVC.

20 En un análisis separado, se determinó si el nivel de expresión génica de PRSS8 aumentaba con la edad de los pacientes entre los diversos estadios del OVC. No se observó una correlación entre los niveles de expresión génica de PRSS8 entre todos los estadios, en cada estadio o entre edades (datos no mostrados). Este análisis indica que PRSS8 puede usarse para la detección temprana del OVC independientemente de la edad del paciente.

25 **Ejemplo 11: PRSS8 se sobreexpresa en todos los subtipos principales de cáncer de ovario (OVC) y demuestra una sobreexpresión significativa en el tejido de paciente con OVC seroso**

30 Se cree que la mayoría de subtipos de cáncer de ovario, tales como seroso, papilar seroso, mucinoso, de células claras y endometriode, tienen un historial de inicio y desarrollo diferente. Sin embargo, la mayoría de estudios de biomarcadores y protocolos de tratamiento de OVC no son específicos de subtipo.

En este estudio, se midieron los niveles de PRSS8 en pacientes con diferentes subtipos de OVC.

35 Los resultados de este estudio indican que el nivel de expresión de PRSS8 en pacientes serosos es significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con pacientes papilares-serosos. La expresión de PRSS8 no fue significativamente diferente en los pacientes endometrioides en comparación con cualquiera de los grupos anteriores. Debido al menor número de pacientes entre los pacientes de células claras y de baja malignidad (8 y 11 pacientes, respectivamente), se presentaron los resultados en estos grupos pero no se analizaron estadísticamente.

40 Adicionalmente, se analizó la expresión de PRSS8 en pacientes con diferentes tipos de OVC según el estadio de la enfermedad (figura 10B). De forma notable, los niveles de proteína PRSS8 se regularon positivamente en todos los tipos de OVC en estadio II y se mantuvieron regulados positivamente en todos los estadios. Debido a la elevada desviación típica entre los pacientes en cada grupo, los valores medianos fueron menores que los valores medios y no fue posible un análisis estadístico adicional debido al bajo número de pacientes en cada categoría. En el tipo endometriode de OVC, más de un 50 % de los pacientes (20/37) se detectaron en estadio I, mientras que en el OVC seroso y papilar seroso, la mayoría de los pacientes se detectó en el estadio III (28/40 y 37/53, respectivamente). Sin desear quedar ligados a teoría alguna, esto puede deberse a la diferente naturaleza de la metástasis de estos subtipos de OVC. Aunque el endometriode y el de células claras tienden a permanecer confinados a los ovarios, los subtipos serosos y papilares serosos metastatizan agresivamente a otros órganos. Debido a que los subtipos serosos y papilares serosos no presentan síntomas específicos tempranos, normalmente se detectan en un estadio tardío.

55 Estos datos indican que KLK6, KLK7 y PRSS8 son biomarcadores selectivos para la detección temprana de los tipos más comunes de cáncer de ovario y pueden complementar a CA125 y HE4 como biomarcadores tumorales de detección temprana.

60 **Ejemplo 12. Localización de proteína PRSS8 en tejidos ováricos de OVC, benignos y de individuos normales y en tejidos de cáncer no de OVC.**

Las matrices de tejido de casos de OVC, benignos y normales se tiñeron para PRSS8 mediante inmunohistoquímica (ampliación 40X). Se generaron matrices de tejido de ovario normal (A1), adenocarcinoma seroso con control (A2), adenocarcinoma endometriode con control (A3), cistadenoma seroso con control (A4), tejido ovárico benigno (B1), diversas matrices de tejido de adenocarcinoma seroso (C1), diversas matrices de tejido de adenocarcinoma papilar seroso (C2), diversas matrices de adenocarcinoma mucinoso (C3), adenocarcinoma endometriode (C4), diversas matrices de células claras (C5), carcinoma de baja malignidad (C6), carcinoma de células transicionales (C7), cáncer

(no OVC) (D1 y D2).

La inmunotinción de todas las matrices de tejido usadas en este estudio se puntuaron (0-3) de acuerdo con los niveles de tinción, donde una puntuación de (0) significa tinción negativa, (1) significa tinción positiva débil, (2) significa tinción positiva y (3) significa tinción positiva fuerte. Diagramas de barras de la puntuación de inmunotinción de PRSS8 por estadio de OVC (E1) y por grado de OVA (E2). n = número de matrices teñidas en cada grupo.

PRSS8 no aparece en secciones de tejido ovárico de individuos normales (fig. 12A1b) en comparación con las mismas secciones teñidas con un control negativo (fig. 12A1a). PRSS8 era abundante en secciones de tejido procedentes de pacientes de OVC en estadio temprano (fig. 12A2b y 12A3b) así como en estadio tardío (fig. 12A4b) en comparación con su tinción de control negativo correspondiente (fig. 12A2a, A3a y A4a, respectivamente). A continuación, se tiñeron secciones de tejido de varios casos de afecciones benigna, tales como tumores de células tecaes y quistes de pus en pasta de anchoas y simples (n=46 en total). Se observó que PRSS8 aparece en tejidos procedentes de pacientes benignos, que tenían tumores de células tecaes (fig. 12B1a y 12B1b) y quistes de pus en pasta de anchoas (fig. 12B1c), aunque los patrones de tinción eran notablemente diferentes en comparación con los observados en pacientes de OVC. Se tiñeron secciones de tejido de diferentes subtipos de OVC en estadios tempranos de la neoplasia maligna (fig. 12C) y se presentaron tres casos para cada subtipo (a, b y c). Aunque los patrones de tinción eran en ocasiones diferentes entre los diferentes subtipos de OVC, es notable que PRSS8 está regulado positivamente en estos tejidos desde un estadio temprano de la enfermedad. Se generaron secciones de carcinoma seroso (fig. 12C1), papilar seroso (fig. 12C2), mucinoso (fig. 12C3), endometrioides (fig. 12C4) y de células claras (fig. 12C5). También se muestra la tinción representativa de secciones de tejido OVC de baja malignidad (fig. 12C6) y transicional (fig. 12C7). Además, cuando se generaron secciones de tejido de tejidos cancerosos adyacentes (no OVC), tal como en cáncer de omento (fig. 12D1) y tumores mullerianos mixtos (fig. 12D2), prácticamente no se observó tinción de PRSS8. Finalmente, se presentaron gráficas de puntos de puntuación de secciones de tejido procedentes de normal, benigno y OVC según la tinción de PRSS8 a lo largo de los diferentes estadios y grados. La fig. 12E1 muestra que PRSS8 estaba presente en secciones de tejido procedentes de pacientes de OVC así como de pacientes con afecciones benignas (tumores tecaes y quistes) pero no en tejidos ováricos de individuos normales. Los patrones de tinción de tejidos de OVC fueron diferentes en comparación con los derivados de pacientes benignos. La proteína PRSS8 fue significativamente más abundante en tejidos procedentes de OVC en estadio 1 en comparación con pacientes en otros estadios y con afecciones benignas ($P < 0,01$). Cuando se llevó a cabo un análisis similar según el grado de OVC, las secciones de tejido procedentes de pacientes de grado 2 contenían más PRSS8 en comparación con otros grados de OVC ($P < 0,05$). Estos resultados indican que PRSS8 está regulado positivamente en tejidos de OVC de enfermedad en estadio temprano y no está presente en tejido ovárico de individuos normales. La tinción inmunohistoquímica también mostró que PRSS8 está presente en secciones de tejido procedentes de pacientes con afecciones benignas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar y diagnosticar el cáncer de ovario en estadio temprano en un sujeto que comprende:

- 5 (a) obtener una muestra de suero del sujeto y obtener una muestra de control de suero normal;
- (b) aislar de la muestra obtenida en (a) el ARN total que comprende ARNm que codifica al menos 2 serina proteasas seleccionadas entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8;
- (c) transformar el ARN total aislado de (b) en ADNc que comprende el ADNc de la serina proteasa;
- (d) amplificar el ADNc de (c);
- 10 (e) medir un nivel de ADNc de serina proteasa amplificado que comprende al menos 2 serina proteasas seleccionadas entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8 en (d) como medida de la expresión de ARNm de serina proteasa amplificado;
- (f) comparar el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (e) expresado por el sujeto con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (e) expresado por la muestra de control de suero normal, en donde un nivel de expresión aumentado del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de suero normal es indicativo de un posible cáncer de ovario en estadio temprano en el sujeto;
- (g) cuando (f) indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto, aislar el ARN total que comprende ARNm de serina proteasa de una muestra de tejido ovárico obtenida anteriormente de dicho sujeto;
- 20 (h) transformar el ARN total aislado de (g) en ADNc que comprende el ADNc de la serina proteasa;
- (i) amplificar el ADNc de (h);
- (j) medir un nivel de ADNc de serina proteasa amplificado en (i) como medida de la expresión del ARNm de serina proteasa amplificado;
- (k) comparar el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (j) expresado por el sujeto con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa amplificado en (j) expresado por una muestra de control de tejido ovárico normal, en donde un nivel de expresión aumentado del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de un posible cáncer de ovario en estadio temprano en el sujeto;
- 25 (l) cuando tanto (f) como (k) indican cáncer de ovario en estadio temprano, se diagnostica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; y
- (m) designar al sujeto diagnosticado en la etapa (l) como adecuado para recibir un régimen de tratamiento eficaz para tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en dicho sujeto.

2. Un método para detectar y diagnosticar el cáncer de ovario en estadio temprano en un sujeto que comprende:

- 35 (a) obtener una muestra de suero del sujeto y una muestra de suero normal como control;
- (b) detectar la proteína serina proteasa en las muestras de (a) haciendo reaccionar un anticuerpo dirigido contra la serina proteasa con la muestra de suero del paciente y la muestra de control de suero normal, en donde la serina proteasa comprende al menos 2 serina proteasas seleccionadas entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8;
- 40 (c) cuantificar una cantidad de proteína serina proteasa unida al anticuerpo dirigido contra la serina proteasa en (b);
- (d) comparar la cantidad de proteína serina proteasa en (c) unida al anticuerpo en la muestra de suero del sujeto con la cantidad de la proteína serina proteasa unida al anticuerpo en la muestra de control de suero normal, en donde una cantidad aumentada de la proteína serina proteasa que comprende al menos 2 proteínas serina proteasas seleccionadas entre el grupo que consiste en calicreína 6 (KLK6), calicreína 7 (KLK7) y PRSS8, unida en la muestra del sujeto en comparación con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de control de suero normal indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto;
- 45 (e) cuando (d) indica cáncer de ovario en el sujeto, detectar la proteína serina proteasa en una muestra de tejido de ovario obtenida previamente de dicho sujeto y en un tejido ovárico normal como control, haciendo reaccionar un anticuerpo dirigido contra la serina proteasa con la muestra de tejido de ovario y la muestra de tejido de ovario normal;
- (f) cuantificar una cantidad de proteína serina proteasa unida al anticuerpo dirigido contra la serina proteasa en (e);
- 50 (g) comparar la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico del sujeto con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico normal, en donde una cantidad aumentada de la proteína serina proteasa unida en la muestra de tejido ovárico del sujeto en comparación con la cantidad de la proteína serina proteasa unida en la muestra de control de tejido ovárico normal indica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto;
- 55 (h) cuando tanto (d) como (g) indican cáncer de ovario en estadio temprano, se diagnostica cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en el sujeto; y
- (i) designar al sujeto diagnosticado en la etapa (H) como adecuado para recibir un régimen de tratamiento eficaz para tratar el cáncer de ovario en estadio temprano (I/II) en dicho sujeto.

65 3. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la muestra de tejido ovárico es epitelial.

4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la muestra de control de suero normal es una muestra de mezcla de suero normal.
- 5 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la amplificación se lleva a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscriptasa (RT-PCR).
6. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la detección se lleva a cabo mediante transferencia Western o inmunohistoquímica.
- 10 7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer de ovario se selecciona entre el grupo que consiste en seroso, papilar seroso, metastásico, de baja malignidad, mucinoso y de células claras.
- 15 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer de ovario es un cáncer de ovario de grado 1 **caracterizado por:**
- (i) tejido bien diferenciado; o
 - (ii) núcleos de bajo grado con figuras mitóticas infrecuentes.
- 20 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer de ovario es un cáncer de ovario en estadio I **caracterizado por:**
- (i) un tumor limitado a un ovario, cápsula intacta, sin tumor en la superficie ovárica y lavados negativos (estadio IA);
 - 25 (ii) un tumor que implica ambos ovarios, cápsula intacta, sin tumor en la superficie ovárica y lavados negativos (estadio IB);
 - (iii) derrame quirúrgico (estadio IC1);
 - (iv) ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie ovárica (estadio IC2); o
 - 30 (v) células malignas en la ascitis o en lavados peritoneales (estadio IC3).
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el cáncer de ovario es un cáncer de ovario en estadio II **caracterizado por:**
- (i) extensión y/o implante de un tumor en el útero y/o las trompas de Falopio (estadio IIA); o
 - 35 (ii) extensión de un tumor a otros tejidos pélvicos intraperitoneales (estadio IIB).
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el nivel aumentado de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por el sujeto en comparación con el nivel de expresión del ARNm de serina proteasa expresado por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de una expansión de las células del compartimento epitelial tumoral.
- 40 12. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el nivel aumentado de expresión de la proteína serina proteasa expresada por el sujeto en comparación con el nivel de expresión de la proteína serina proteasa expresada por la muestra de control de tejido ovárico normal es indicativo de una expansión de las células del compartimento epitelial tumoral.
- 45

Figura 1

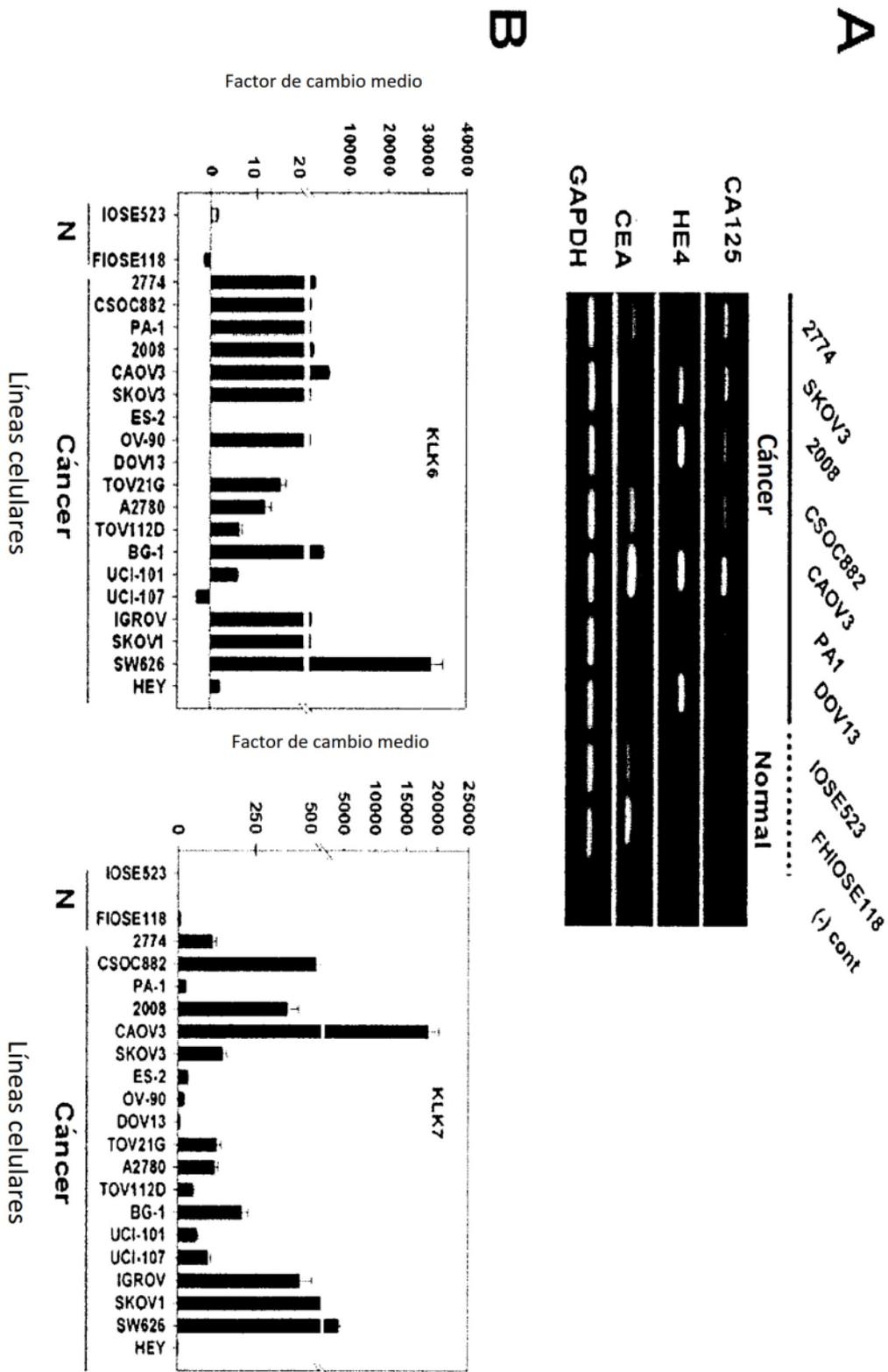
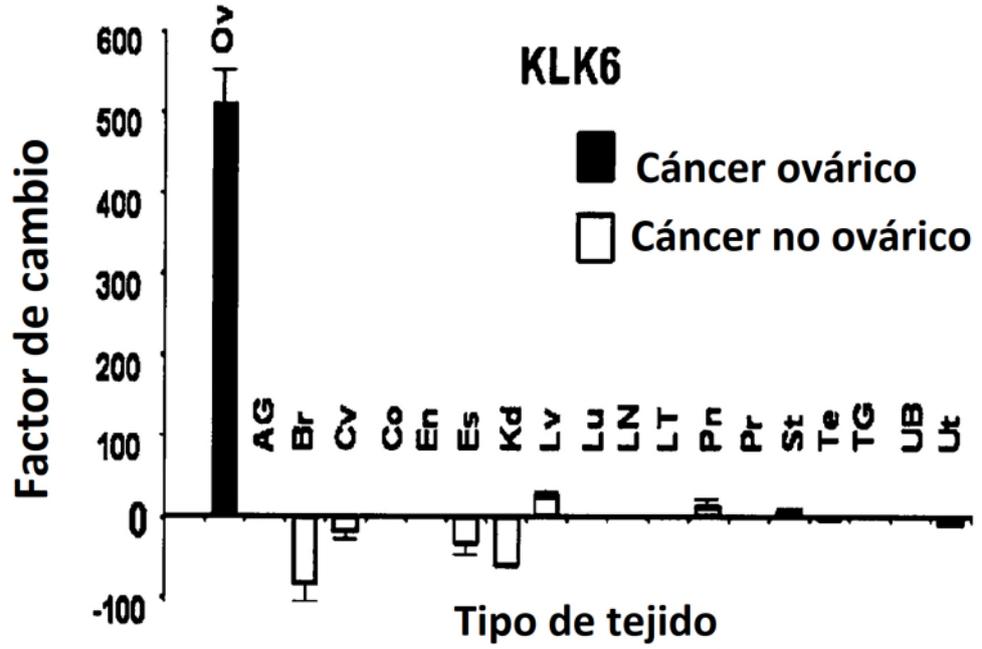


Figura 2

A



B

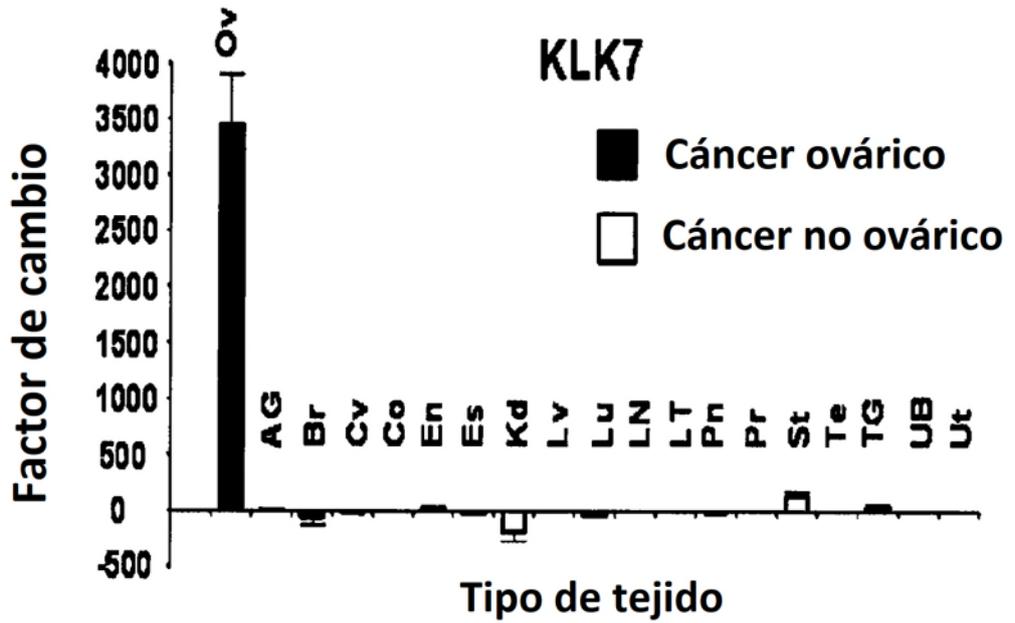
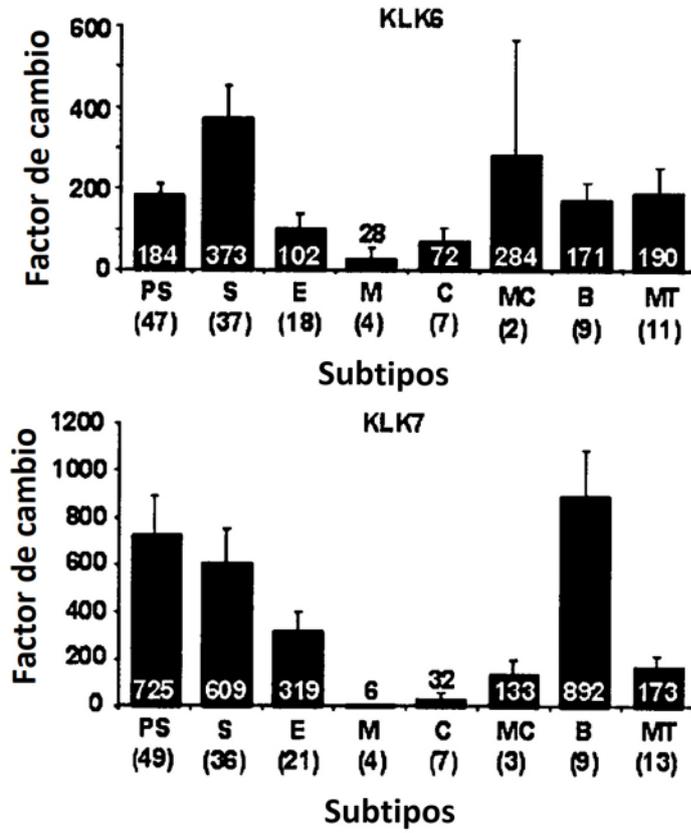
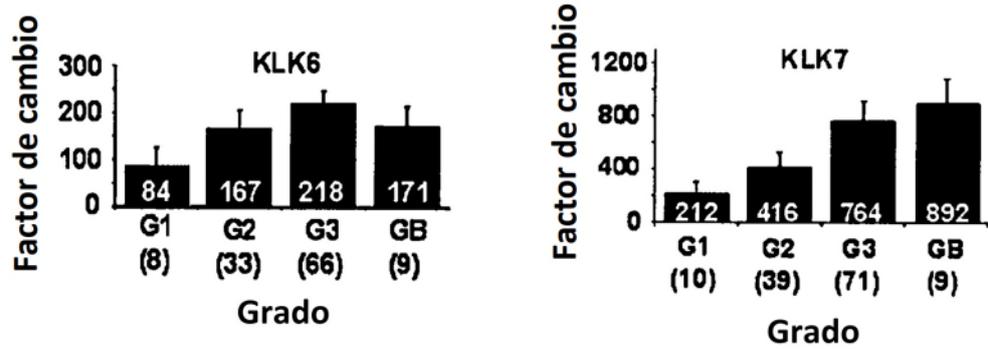


Figura 3

A



B



C

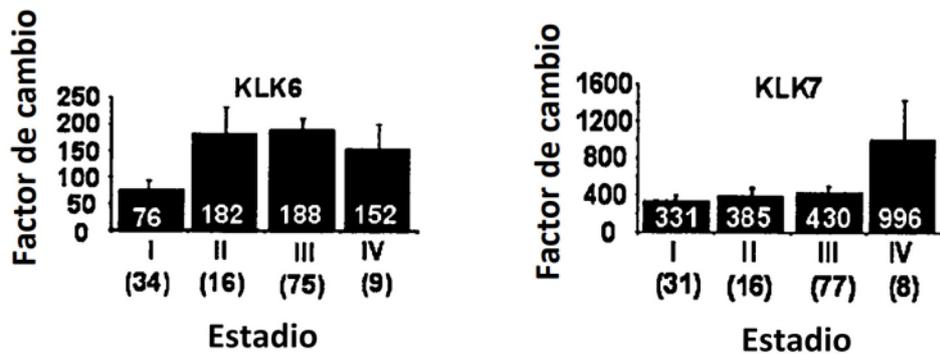


Figura 4

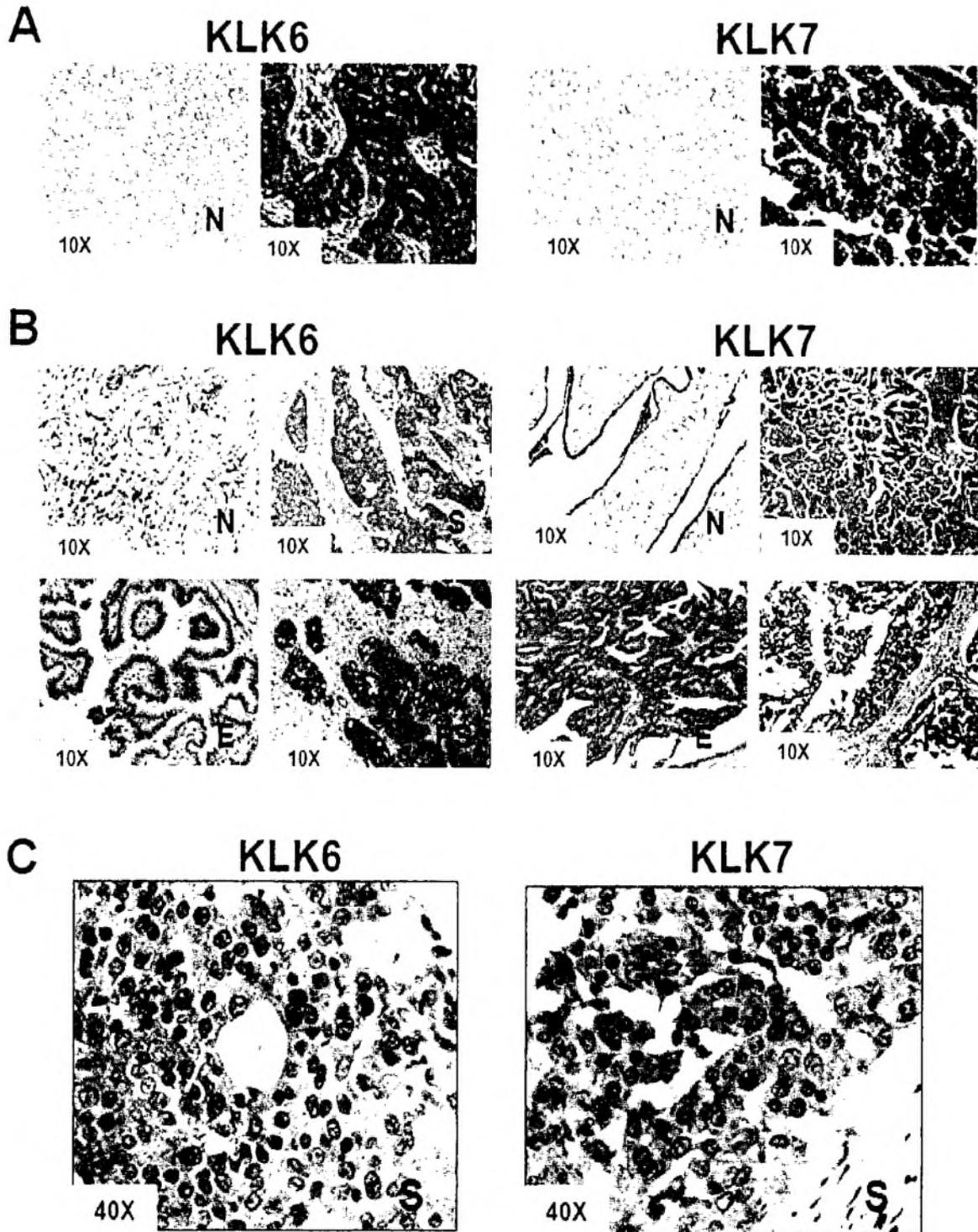


Figura 5

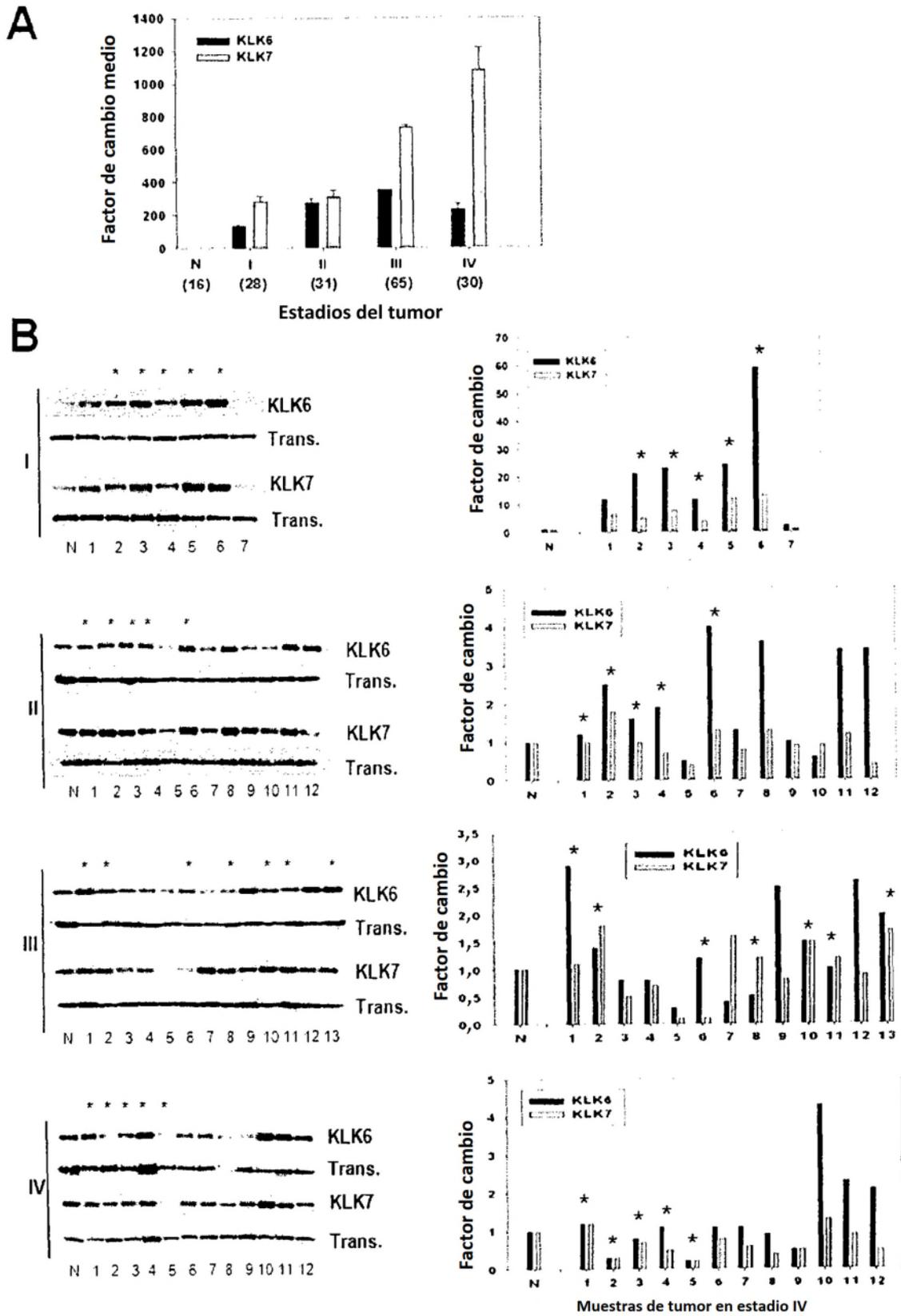


Figura 8

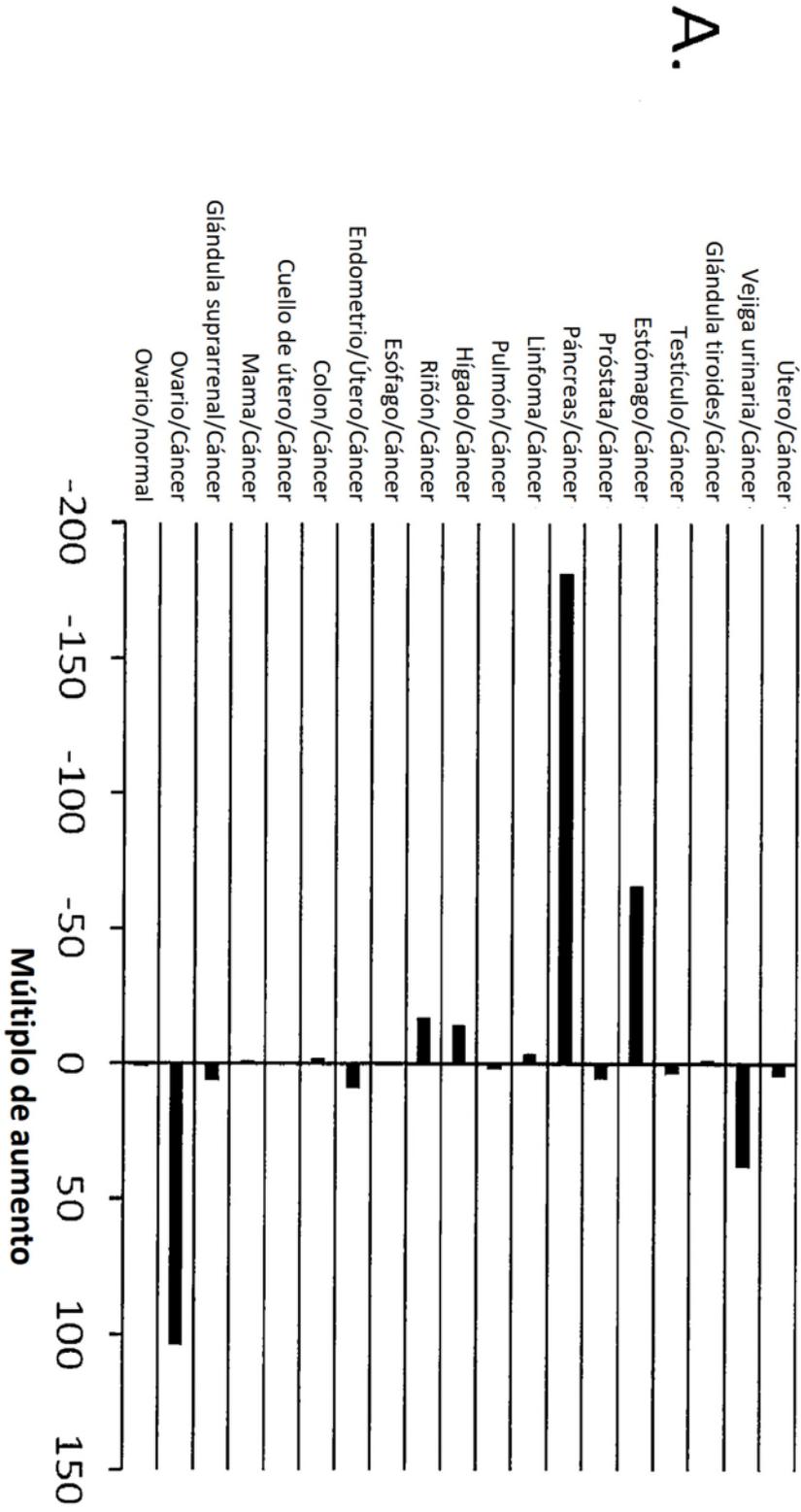


Figura 8

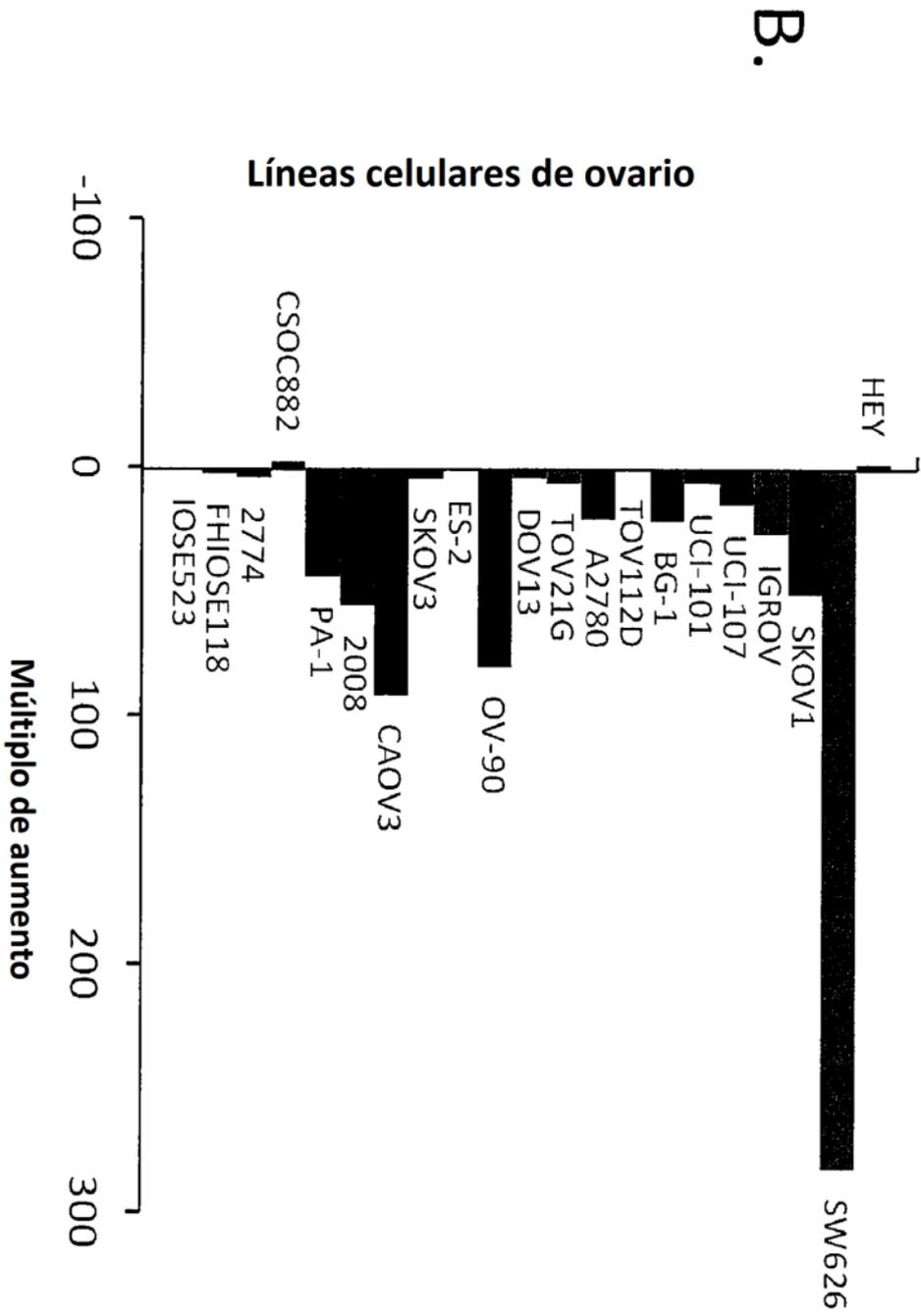


Figura 8

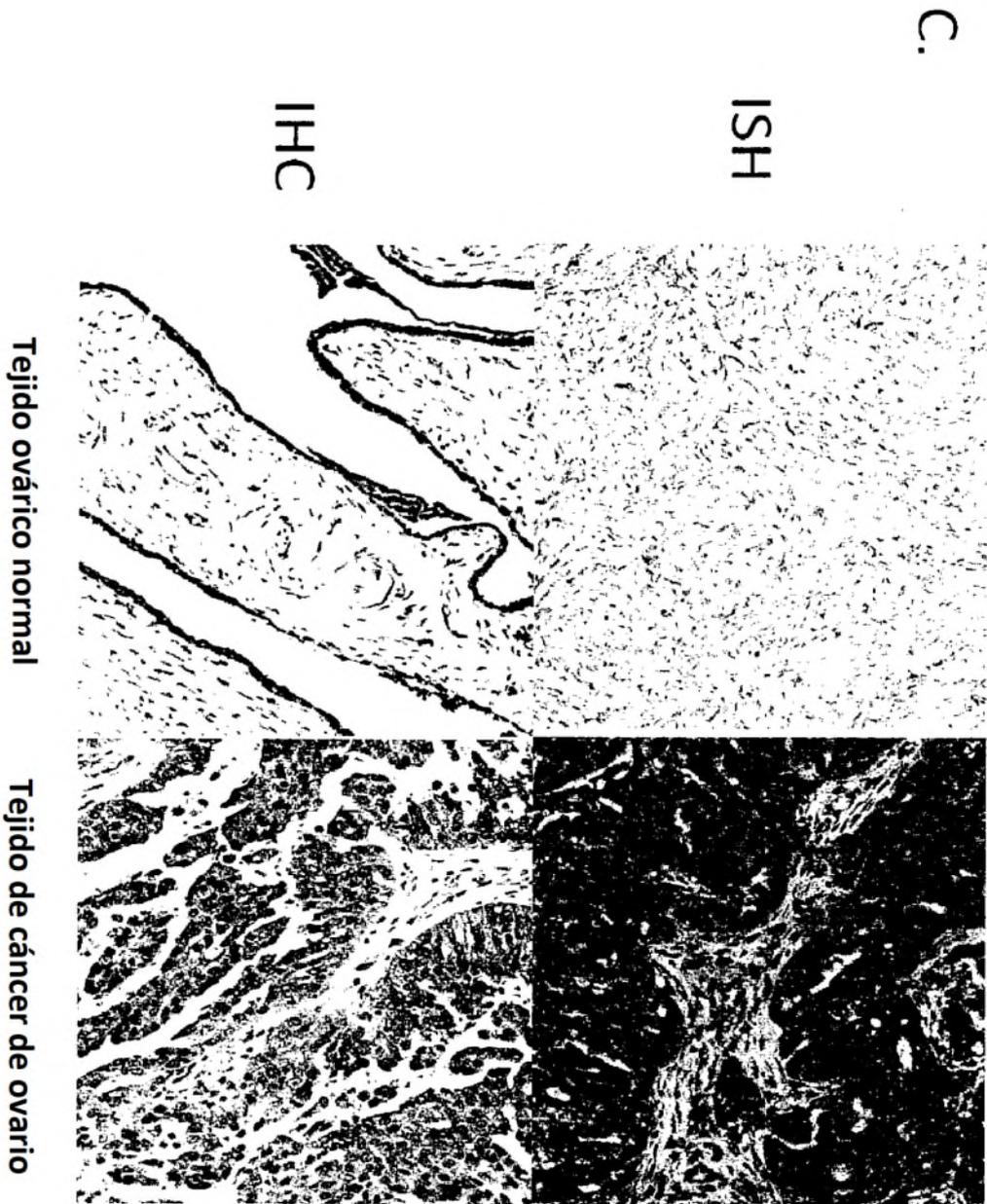


Figura 9

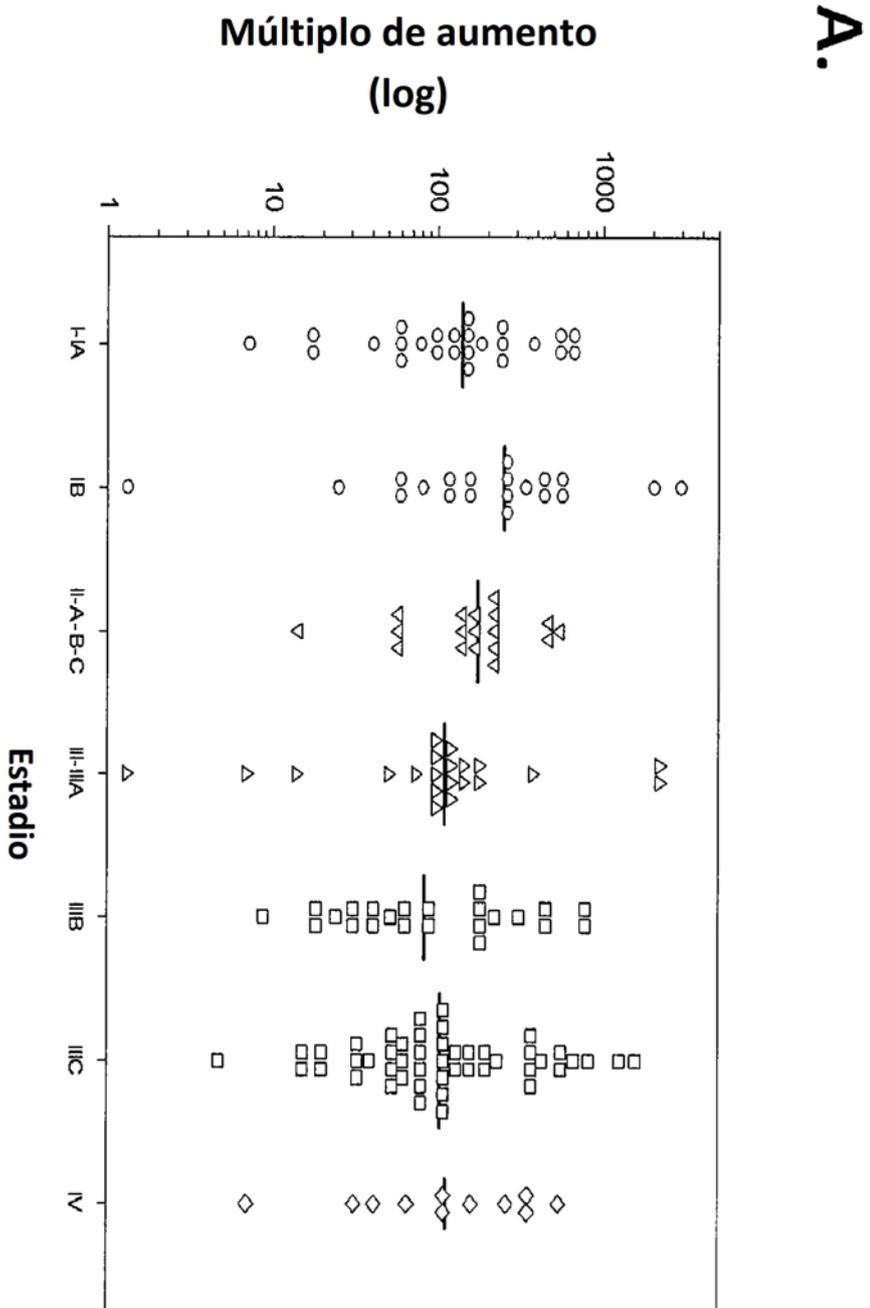


Figura 9

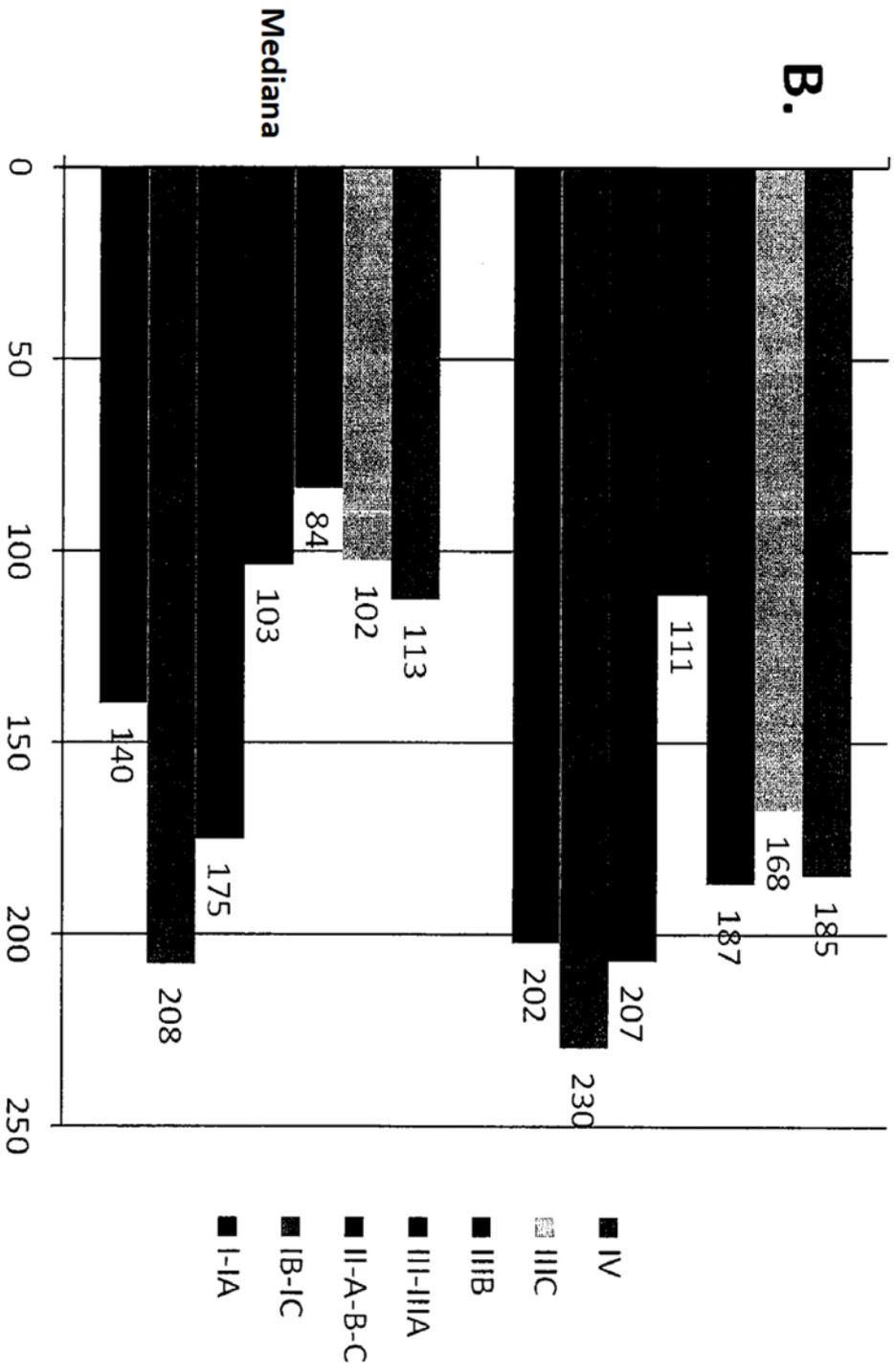


Figura 9

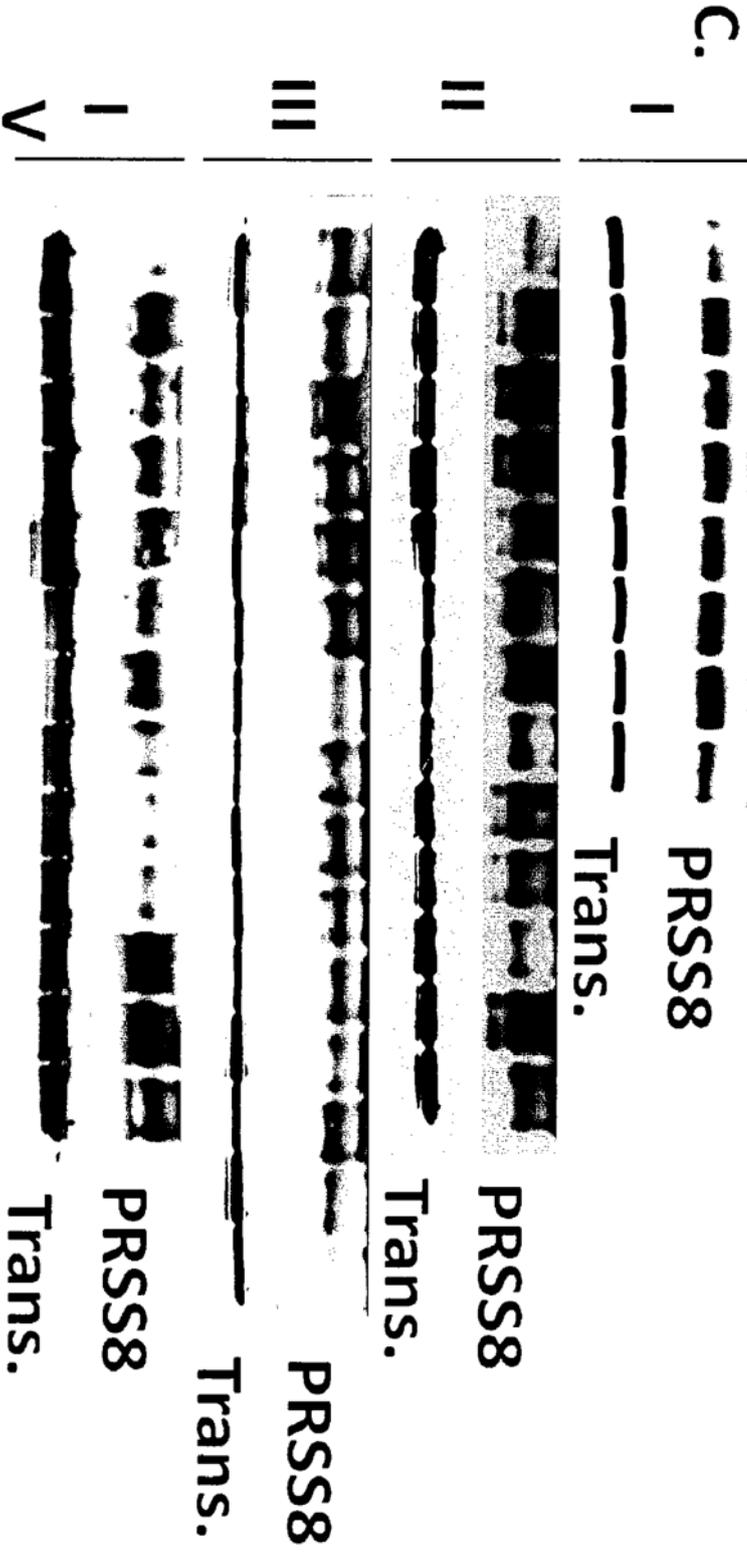


Figura 9

D.

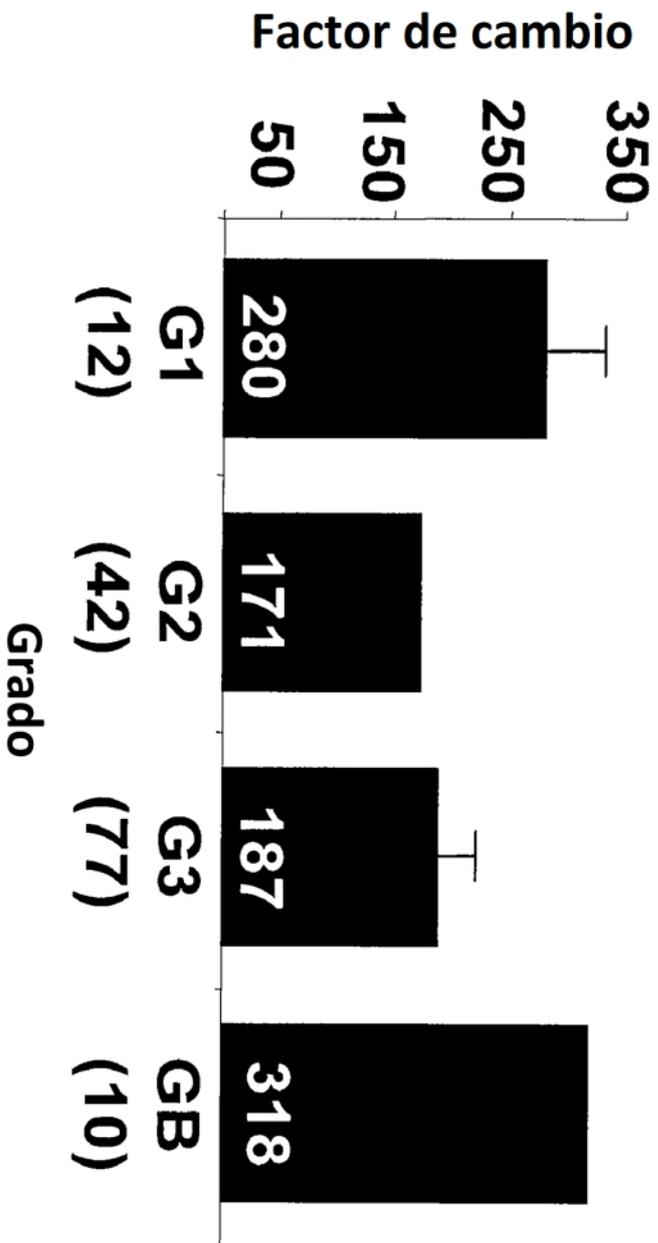


Figura 10

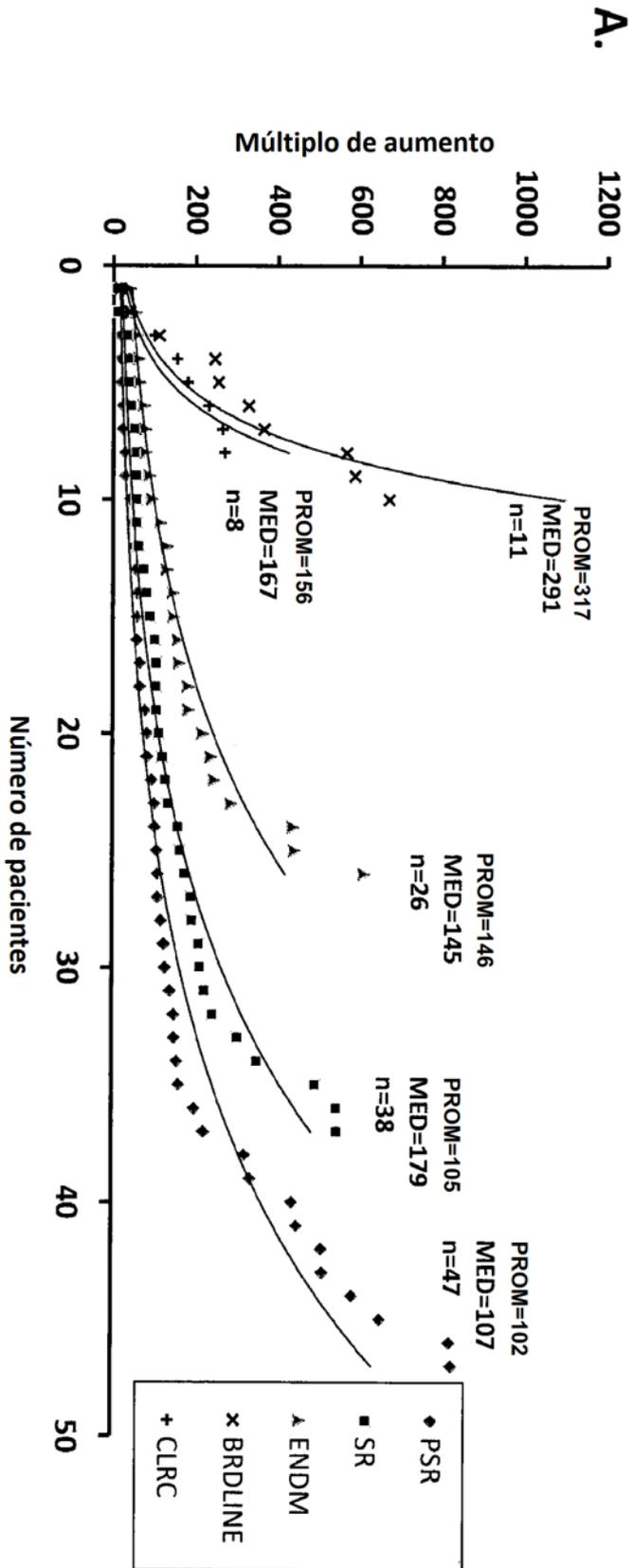


Figura 10

B.

TIPO de OVC		n	MÍN	MÁX	PROM	MED	EE	
ENDOMT	ESTADIO	TODOS	37	1,3	2105	277	145	74,4
		I	20			280	146	
		II	4			255	203	
		III	12			281	83	
		IV	1					
	PSR	TODOS	53	6,9	2284	263	106	58
		I	6			165	109	
		II	5			85	59	
		III	37			319	102	
		IV	5			143	112	
	SR	TODOS	40	1,3	544	154	108	24,4
		I	2			68	68	
		II	7			270	213	
III		28			113	103		
IV		3			319	374		

Figura 10

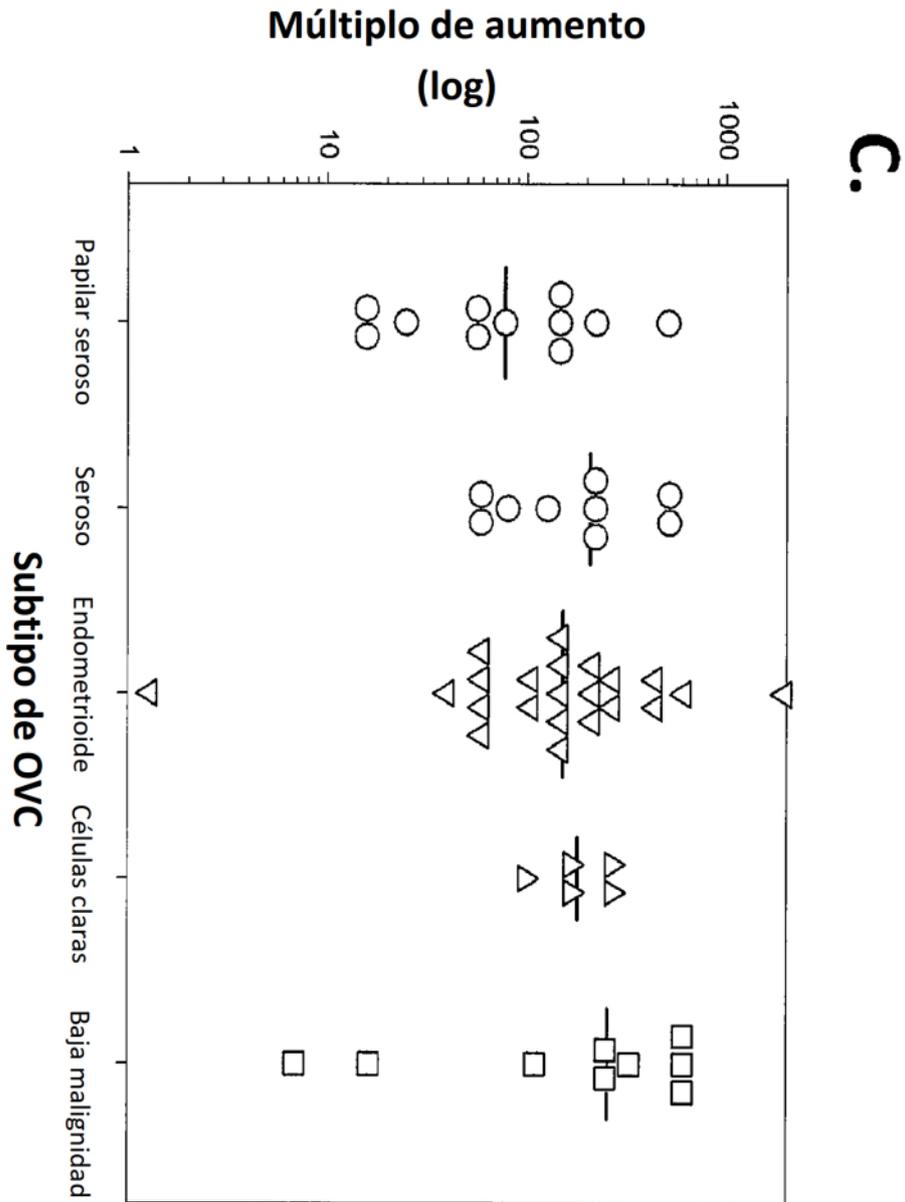


Figura 11

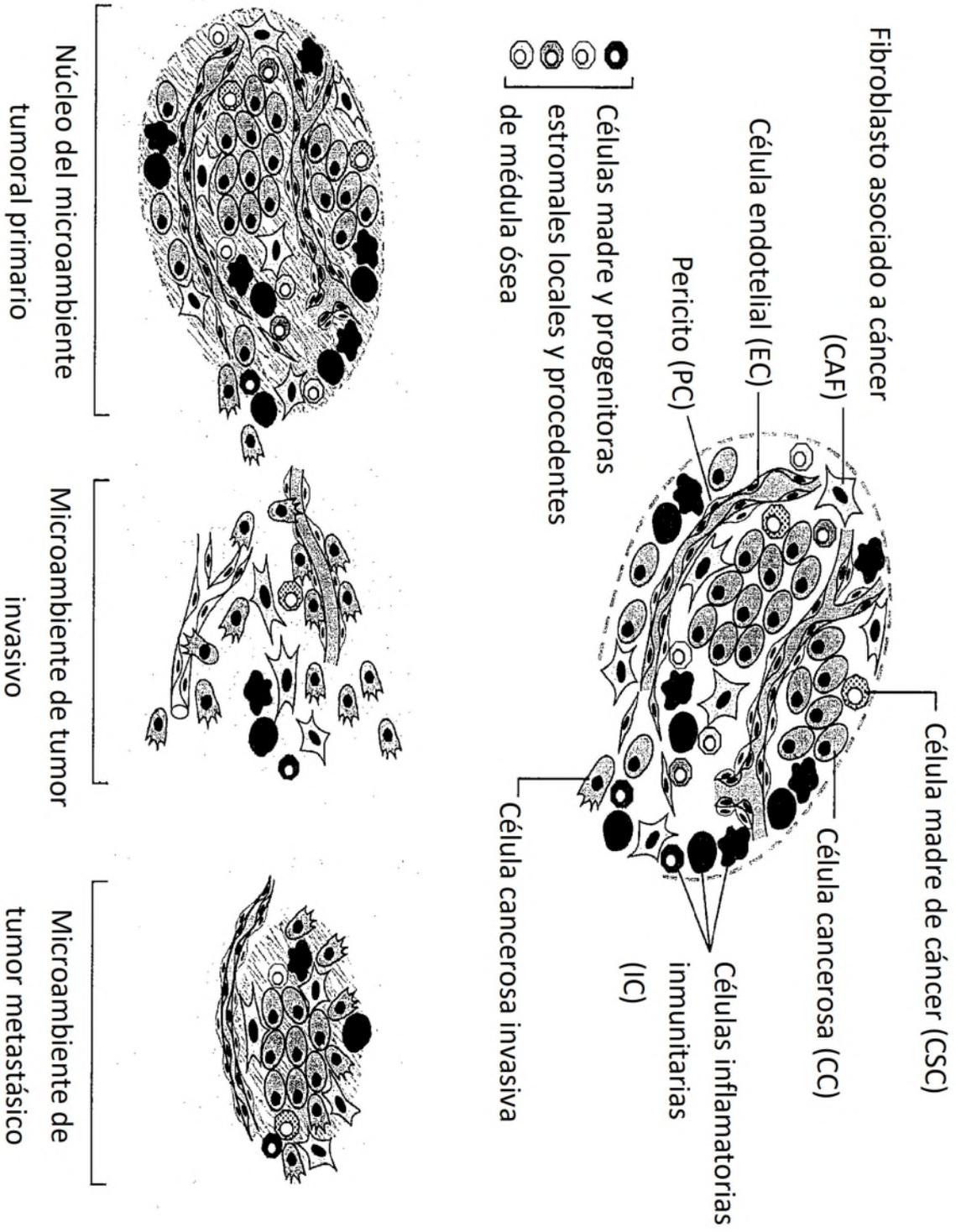


Figura 12

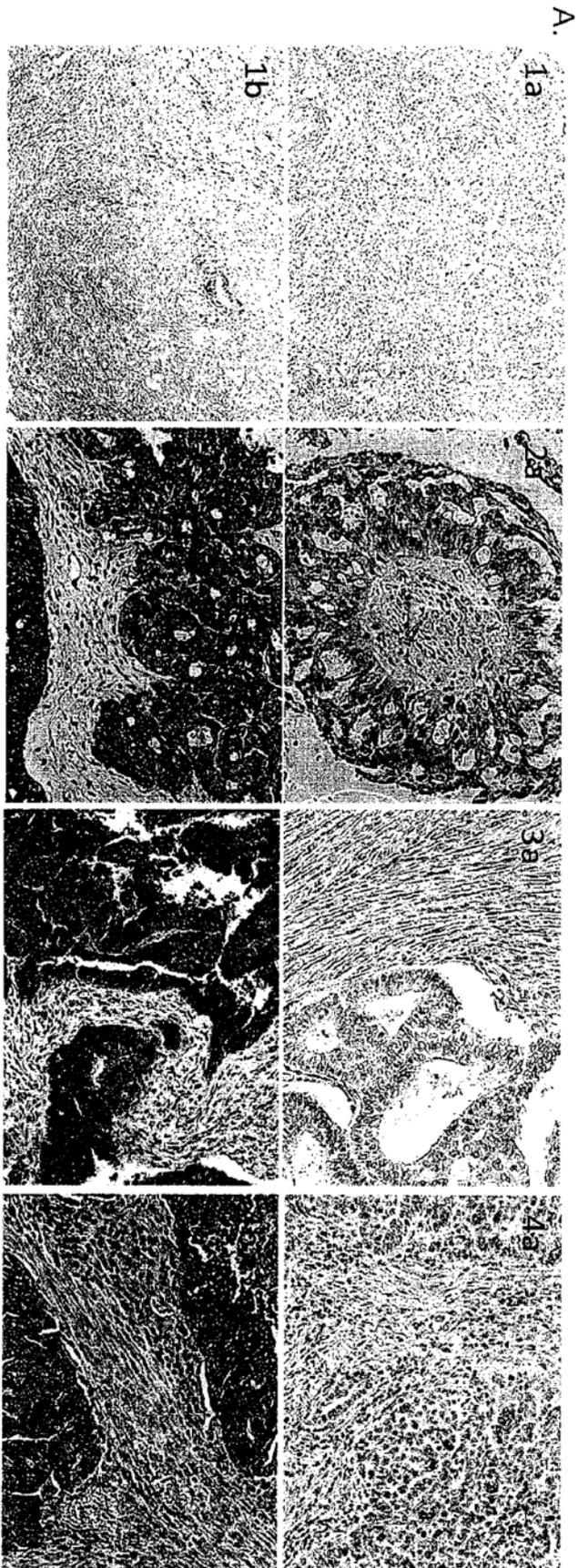


Figura 12



Figura 12

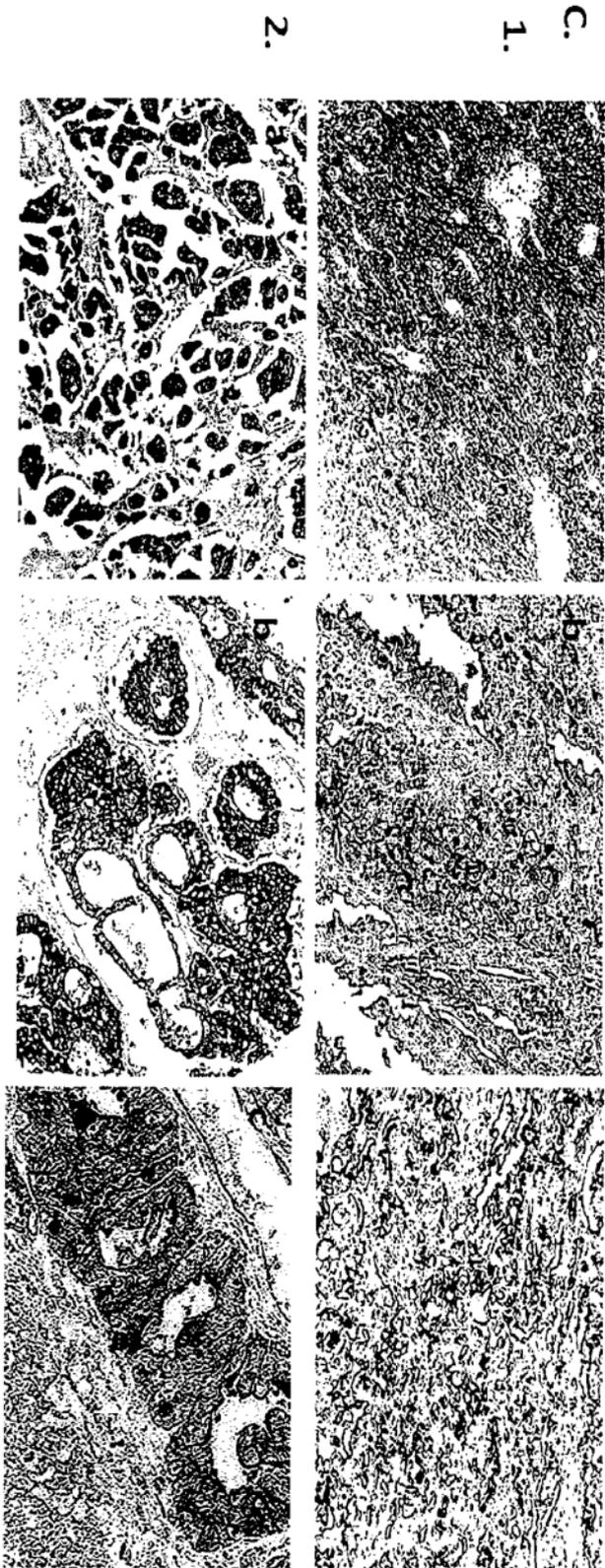


Figura 12

C.



5.

b

C.

6.



7.



Figura 12

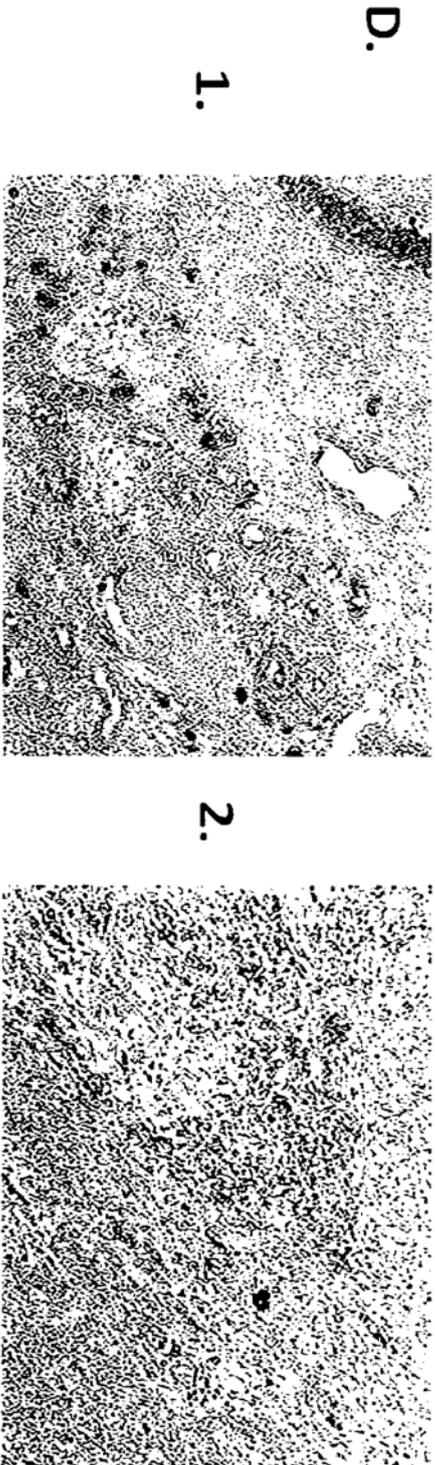


Figura 12

E.

