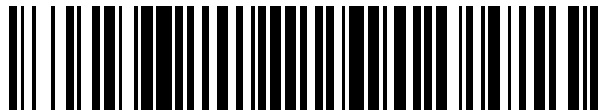


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 011**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2018 PCT/EP2018/069841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.01.2019 WO19016400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2018 E 18749741 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023 EP 3655778**

54 Título: **Agrina como marcador de cáncer de endometrio**

30 Prioridad:

21.07.2017 EP 17382483

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

07.11.2023

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL
D'HEBRON - INSTITUT DE RECERCA (100.0%)
Passeig Vall d'Hebrón, 119-129
08035 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MARTINEZ GARCÍA, ELENA;
COLÁS ORTEGA, EVA;
GIL MORENO, ANTONIO;
REVENTÓS PUIGJANER, JAUME;
DOMON, BRUNO;
LESUR, ANTOINE y
CAMPOY MONCAYO, IRENE**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 953 011 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

Agrina como marcador de cáncer de endometrio

5 **Campo técnico**

La invención se refiere al diagnóstico y pronóstico del cáncer de endometrio.

10 **Antecedentes de la técnica**

10 El cáncer de endometrio (CE) es el tumor invasivo del aparato genital femenino observado con mayor frecuencia y el
cuarto cáncer más común en mujeres en países desarrollados, lo que representa 61380 casos diagnosticados y
10.920 muertes estimadas en 2017 en los Estados Unidos. Hoy en día, el 70 % de los casos de CE se diagnostican
15 en estadios tempranos de la enfermedad en los que el tumor está localizado todavía dentro del endometrio y está
asociado con una tasa de supervivencia general a los 5 años del 96 %. Sin embargo, el 30 % de las pacientes con
CE son diagnosticadas sólo en el estadio avanzado de la enfermedad asociado a una disminución drástica de la
tasa de supervivencia a los 5 años, que se reduce hasta el 67 % cuando ya existe invasión miometrial y/o afectación
ganglionar y hasta el 18 % en casos de metástasis a distancia. Por tanto, mejorar el diagnóstico temprano es un
tema importante para manejar adecuadamente la CE y disminuir la mortalidad asociada con la enfermedad.

20 La detección temprana de pacientes con CE se ve favorecida por la presencia de síntomas como sangrado vaginal
anómalo presente en el 93 % de las mujeres diagnosticadas con CE. Sin embargo, muchos otros trastornos
benignos generan síntomas similares. La discriminación de pacientes con patologías endometriales benignas y con
CE sólo se logra después de un tedioso proceso de diagnóstico que consiste en un examen pélvico y una ecografía
25 transvaginal seguido de un examen histopatológico confirmatorio de una biopsia endometrial. La biopsia preferida
que se usa en este procedimiento se denomina biopsia por aspirado uterino y/o con Pipelle y se obtiene mediante
una aspiración mínimamente invasiva de líquido endometrial desde el interior de la cavidad uterina. Debido a que los
procedimientos de diagnóstico actuales en aspirados uterinos se basan en la presencia de material celular, este
proceso lamentablemente tiene un fallo de diagnóstico y una tasa de muestreo inadecuada asociada del 8 % y el
30 15 %, respectivamente. Esto se incrementa en mujeres posmenopáusicas hasta el 12 % y el 22 %. En esos casos
es necesario realizar una biopsia guiada por histeroscopia, donde esta técnica invasiva presenta un mayor riesgo de
complicaciones, incluyendo perforación uterina, hemorragia y posible daño a otros órganos.

35 Hasta la fecha, se han realizado muchos estudios para identificar biomarcadores de proteínas de CE, principalmente
en muestras de tejido y suero (véase, por ejemplo, DeSouza LV, *et al.*, "Endometrial cancer biomarker discovery and
verification using differentially tagged clinical samples with multidimensional liquid chromatography and tandem mass
spectrometry", *Mol Cell Proteomics MCP-* 2007, n.º de vol. 6, págs.: 1170-8, o Kemik P, *et al.* "Diagnostic and
prognostic values of preoperative serum levels of YKL-40, HE-4 and DKK-3 in endometrial cancer", *Gynecol Oncol-*
2016; n.º de vol. 140, págs.: 64-9). Ninguno de ellos se ha traducido en utilidad clínica.

40 Algunos documentos han correlacionado el análisis genético y las mutaciones en genes particulares con el
diagnóstico de cáncer de endometrio y el pronóstico para la identificación del grado de la enfermedad. Un ejemplo
es el documento de Mota *et al.*, "Genetic analysis of uterine aspirates improves the diagnostic value and captures the
intra-tumor heterogeneity of endometrial cancers", *Modern Pathology-*2016, vol. 30, n.º 1, págs.: 134-145. Este
45 documento muestra que la heterogeneidad genética intratumoral puede estar representada en los aspirados
uterinos, lo que brinda la ventaja de ser más representativos de todo el tumor que los datos de muestras de una sola
región del tumor. Algunas de las mutaciones informativas reveladas en genes se identificaron en el gen CTNNB1,
PIK3 o gen PTEN.

50 Aunque las biopsias deberían proporcionar información sobre la histología del tumor y el grado del tumor para
ayudar en la estratificación del riesgo de los pacientes con CE y guiar el procedimiento de estadificación quirúrgica,
desafortunadamente, el número limitado de células disponibles para el examen y la alta variabilidad entre
observadores en la interpretación patológica da como resultado el 40-50 % de discordancias en el histotipo de CE y
el grado entre las biopsias y las muestras finales de histerectomía. Por tanto, la identificación de biomarcadores
55 sensibles, específicos y reproducibles que mejoren el diagnóstico, el pronóstico y la evaluación preoperatoria del tipo
histológico y grado de los tumores de CE es crucial para manejar adecuadamente a los pacientes con CE y disminuir
la mortalidad y morbilidad asociadas a esta enfermedad.

60 Entre la variedad de subtipos o de manifestaciones de CE, el cáncer de endometrio endometriode (CEE) es la
histología más común en CE y tiene un buen pronóstico en comparación con los casos de CE no endometriode
(CENE). El CENE representa aproximadamente el 20 % de todos los casos de CE, pero representa más del 50 % de
las recaídas y muertes por CE. Entre el CENE, el CE seroso (CES) es el subtipo más común. No hay pruebas
disponibles para discriminar entre estas dos histologías con resultados diferentes.

65 En conclusión, a pesar de los esfuerzos realizados, aún existe la necesidad de biomarcadores que permitan el
diagnóstico, e incluso el pronóstico del cáncer de endometrio con alta sensibilidad y especificidad, en particular la

necesidad de biomarcadores para la práctica clínica.

Sumario de la invención

5 Los inventores han determinado que determinados marcadores de proteínas detectables en exosomas aislados de fluido uterino brindan valiosa información de diagnóstico en el cáncer de endometrio (CE). Muchas de estas proteínas se validaron en el propio fluido uterino sin aislar la fracción de exosomas. Por tanto, las proteínas son biomarcadores de diagnóstico significativos que permiten la discriminación con alta sensibilidad y especificidad entre CE y controles no cancerosos cuando se analizan en el fluido uterino.

10 Además, los inventores han determinado que algunas proteínas que pueden detectarse en dicho fluido uterino, y también en la fracción de exosomas de dicho fluido uterino, son biomarcadores de pronóstico significativos del cáncer de endometrio (CE). Estas proteínas permiten la discriminación entre los subtipos de cáncer de endometrio con alta sensibilidad y alta especificidad y, por tanto, permiten minimizar el riesgo de clasificación de falsos positivos y falsos negativos entre estos subtipos.

15 Además, el hecho de que las proteínas sean detectables en muestras que se obtienen sin prácticas invasivas, tal como en las muestras de fluido uterino, que a su vez son tipos de muestras de rutina en el diagnóstico de CE, supone una verdadera ventaja y mejora en la práctica clínica de clasificación y manejo de pacientes con CE.

20 En estudios previos, los inventores demostraron que la fracción de fluido de los aspirados uterinos tiene un valor importante para la detección de biomarcadores de proteínas de CE (véase, por ejemplo, Martínez-García E, *et al.* "Development of a sequential workflow based on LC-PRM for the verification of endometrial cancer protein biomarkers in uterine aspirate samples", *Oncotarget* -2016, n.º de vol. 7(33), págs.:53102-53114). Este documento muestra un estudio realizado con un flujo de trabajo secuencial basado en LC-PRM, que ilustra la importancia de una fase de verificación de biomarcadores para llenar el vacío entre el descubrimiento y la práctica clínica. Este estudio destacó el beneficio de 26 proteínas para diagnosticar pacientes con CE de pacientes sin CE (controles).

25 Un aspecto de la invención es un método de diagnóstico de cáncer de endometrio, comprendiendo el método determinar el nivel de expresión de agrina en una muestra de fluido uterino del aparato genital femenino.

30 En una realización particular del método, la muestra de fluido uterino es una muestra de fluido de aspirado uterino del aparato genital femenino.

35 En otra realización particular del método según la invención, la muestra de fluido uterino es una fracción que contiene exosomas aislada de un aspirado uterino.

40 En otra realización particular, el método comprende además determinar el nivel de expresión de una o más proteínas seleccionadas de PERM, OSTP, CTNB1, CAYP1, XPO2, NGAL, SG2A1, CADH1, SPIT1, MMP9, NAMPT, LDHA, CASP3, PRDX1, MIF, K2C8, CAPG, MUC1, ANXA1, HSPB1, PIGR, CH10, CD44, CLIC1, TPIS, GSTP1, GTR1, ENOA, PDIA1, KPYM, ANXA2 y FABP5.

45 En otra realización particular del método cuando la muestra de fluido uterino es la fracción que contiene exosomas, el método comprende determinar en la fracción que contiene exosomas aislada de un aspirado uterino el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; y agrina, BCAM.

50 En una realización particular del método en el que la muestra de fluido uterino es una muestra de fluido de aspirado uterino, el método comprende determinar en el aspirado uterino el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, MMP9, PODXL; y agrina, MMP9.

55 En una realización particular del método de diagnóstico de cáncer de endometrio, el método comprende determinar el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; y agrina, MMP9, en una fracción que contiene exosomas aislada de AU; y determinar el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: MMP9, PODXL, RAB8A; MMP9, PODXL, RSSA; agrina, MMP9, PODXL; MMP9, PODXL, VAMP8; MMP9, MX1; MMP9, RSSA; MMP9, MVP; MMP9, RAB8A; MMP9, VAMP8; BCAM, MMP9; MMP9, agrina en un aspirado uterino.

60 En otra realización particular del método, el nivel de expresión se determina a nivel de proteína.

65 En aún otra realización particular más del método de diagnóstico de cáncer de endometrio, el nivel de proteína se determina mediante un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquímica, espectrometría de masas, y combinaciones de los mismos.

El método de la invención se lleva a cabo, en una realización particular, mediante un kit que comprende un soporte sólido y medios para detectar el nivel de expresión de agrina.

5 Existen kits y herramientas que comprenden anticuerpos para la determinación de agrina en muestras aisladas de pacientes con cáncer. Véase, por ejemplo, el documento de Chakraborty *et al.*, "An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma. Nature Communications-2015, vol. 6, página 6184. En este documento se detectó la detección de agrina, una proteína implicada en la señalización oncogénica, mediante anticuerpos que provocaron la reducción de dicha señalización oncogénica y el crecimiento tumoral.

10 Otro aspecto de la invención es, no obstante, un nuevo y particular kit que comprende un soporte sólido y medios para detectar el nivel de expresión de agrina, y medios para detectar el nivel de expresión de las proteínas de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; agrina, BCAM; agrina, MMP9, PODXL; agrina, MMP9; y agrina, MMP9, PIGR, en el que los medios son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana.

15 En una realización particular del kit de la invención, los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para detectar el nivel de expresión de las proteínas son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para llevar a cabo un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquímica y combinaciones de los mismos.

20 Más en particular, los kits comprenden como medio para detectar el nivel de expresión de las proteínas, anticuerpos o fragmentos de los mismos.

En otra realización particular de los kits, se trata de kits para realizar un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

30 En otra realización particular, los kits comprenden además un diagrama de panel, para categorizar una muestra individual.

En otra realización particular del método de diagnóstico según la invención, el método comprende:

- 35 a) determinar, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina, en una muestra de fluido uterino del sujeto femenino;
- b) determinar opcionalmente, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina, en una fracción que contiene exosomas aislada de fluido uterino; y
- 40 c) comparar el nivel de la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) con un nivel de control de referencia, en el que si el nivel determinado en la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto es sospechoso de padecer carcinoma de endometrio.

45 Aún otro aspecto de la invención es un método para decidir o recomendar si iniciar un régimen médico de un sujeto sospechoso de padecer carcinoma de endometrio, método que comprende las etapas de:

- a) determinar, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina en una muestra de fluido uterino del sujeto femenino;
- 50 b) determinar opcionalmente, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina en una fracción que contiene exosomas aislada de fluido uterino; y
- c) comparar el nivel de la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) con un nivel de control de referencia, en el que si el nivel determinado en la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto es sospechoso de padecer carcinoma de endometrio

55 en el que:

- i) si al sujeto se le diagnostica que padece carcinoma de endometrio, o se sospecha que padece carcinoma de endometrio, entonces se recomienda el inicio del régimen médico, y
- 60 ii) si a la paciente se le diagnostica que no padece carcinoma de endometrio, el seguimiento se realiza opcionalmente en consideración del resultado de un examen de la paciente por un médico.

65 Determinando el nivel del marcador en una muestra de prueba, el experto puede establecer, además, cuál es la terapia más adecuada que puede recomendarse, porque el nivel detectado en la muestra puede reflejar la extensión (es decir, la gravedad) de la enfermedad.

La invención incluye un método tal como se define en cualquiera de los aspectos anteriores, en el que después de la determinación del nivel de expresión de agrina, y las proteínas de los conjuntos de proteínas que incluyen agrina y enumeradas anteriormente para el diagnóstico de CE, se llevan a cabo las siguientes etapas implementadas por ordenador: a dicho(s) nivel(es) se le(s) da un valor y/o una puntuación, y opcionalmente se calcula(n) en una fórmula matemática para obtener un valor calculado; en el que en función de dicho(s) nivel(es), puntuación/puntuaciones y/o valor(es) calculado(s), se decide entre las opciones de padecer o no CE.

Otro aspecto de la invención es el uso de un kit que comprende un soporte sólido y medios para detectar el nivel de expresión de agrina y, opcionalmente, medios para detectar el nivel de expresión de las proteínas de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; agrina, BCAM; agrina, MMP9, PODXL; agrina, MMP9; y agrina, MMP9, PIGR, para el diagnóstico de cáncer de endometrio, en el que los medios son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana.

En una realización particular de dicho uso de un kit, el kit es uno en el que los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para detectar el nivel de expresión de las proteínas son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para llevar a cabo un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo electroquímico y combinaciones de los mismos.

Los métodos de la invención brindan importante información de diagnóstico y pronóstico, ya que puede realizarse un pronóstico preciso porque pueden diferenciarse dos manifestaciones histológicas diferentes de CE, a saber, cáncer de endometrio endometriode (CEE) y cáncer de endometrio no endometriode (CENE), teniendo CEE mejor resultado probable (es decir, mejor pronóstico). En otras palabras, la determinación de las proteínas en la muestra de fluido uterino permite diagnosticar diferencialmente CEE y CENE.

Tal como se describirá en los ejemplos a continuación, la agrina permitió el diagnóstico de CE o el preciso pronóstico de CE, en cuanto a que se expresó diferencialmente en muestras aisladas de pacientes que padecían CEE y de pacientes que padecían CENE. El valor diagnóstico podría detectarse diferencialmente debido a la expresión diferencial en muestras de fluido uterino de sujetos con CE en relación con muestras no de CE (controles sanos). El valor pronóstico de agrina da como resultado que aumentó significativamente en el subtipo de CEE en comparación con los niveles en el subtipo de CENE. De modo que permitió clasificar los tumores de los subtipos histológicos más prevalentes. La proteína es, por tanto, una herramienta que puede usarse para mejorar el diagnóstico, el pronóstico y/o la evaluación del riesgo preoperatorio, y para ayudar en la predicción del tratamiento quirúrgico óptimo. También, tal como se indica a continuación, se han desarrollado algunos paneles de proteínas (combinaciones de proteínas) con esta proteína que permiten la discriminación precisa de muestras de CE frente a no de CE y también para la discriminación precisa de tipos histológicos de CE (AUC de 0,99). En combinación con el examen histopatológico, se espera que estos paneles eliminen la necesidad de muestreos de diagnóstico más invasivos y ayuden a predecir el tratamiento quirúrgico óptimo para los pacientes con CE.

Es importante señalar que el biomarcador de proteínas agrina objeto de la presente invención puede evaluarse mediante métodos sencillos y de bajo coste, tales como inmunoquímica, ensayo quimioluminiscente o ELISA, plataformas ampliamente disponibles en hospitales. Por consiguiente, este biomarcador de proteínas puede implementarse fácilmente como kits de diagnóstico y/o pronóstico clínico de rutina con costes reducidos para el sistema de salud. Además, una prueba de kit de diagnóstico basada en el biomarcador proporcionado por la presente invención puede mejorar el proceso actual de diagnóstico y pronóstico, confiando a los aspirados uterinos la capacidad de proporcionar valiosa información de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad.

Según aspectos y realizaciones de la invención, el diagnóstico y pronóstico de CE puede realizarse usando un algoritmo matemático que evalúa un nivel detectable de biomoléculas, proteínas, anticuerpos y/o ARNm, que comprende uno o más de los biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de CE descrito anteriormente, o bien en conjunto con o bien independientemente de otros parámetros clínicos, para categorizar correctamente una muestra individual como procedente de un paciente sano, un paciente con una enfermedad no maligna del endometrio, un paciente con una enfermedad premaligna del endometrio, un paciente con cáncer de endometrio o, tal como se describió anteriormente, para categorizar aún más una muestra individual como proveniente de un sujeto con un subtipo histológico específico de cáncer de endometrio, un sujeto que tiene un grado o estadio histológico específico de la enfermedad, o un sujeto con un subtipo molecular específico de CE. En el sentido de la invención, el término "algoritmo" es también sinónimo de panel o diagramas de decisión, predictores y combinatorios de datos para categorizar correctamente una muestra individual.

El algoritmo de clasificación puede ser tan simple como determinar si la cantidad de agrina está por encima o por debajo de un número de corte particular. Cuando se usan múltiples biomarcadores que incluyen agrina de los conjuntos enumerados anteriormente, el algoritmo de clasificación puede ser una fórmula de regresión lineal. Alternativamente, el algoritmo de clasificación puede ser el producto de cualquiera de varios algoritmos de aprendizaje. En el caso de algoritmos de clasificación complejos, puede ser necesario realizar el algoritmo sobre los

datos, determinando así la clasificación, usando un ordenador, por ejemplo, un ordenador digital programable. En cualquier caso, puede registrarse el estado en un medio tangible, por ejemplo, en un formato legible por ordenador, como una unidad de memoria o disco, o simplemente impreso en papel. El resultado también podría informarse en una pantalla de ordenador. Este algoritmo se usa como método de diagnóstico y/o pronóstico, y en particular forma parte de los kits para llevar a cabo los métodos divulgados en aspectos anteriores.

Después de la determinación del nivel de expresión de agrina para el diagnóstico y/o para el pronóstico de CE en función de dicho nivel, puntuación y/o valor calculado, se decide entre las opciones de padecer o no lesiones premalignas, y/o CE, y/o entre las opciones de padecer diferentes subtipos de CE.

Descripción detallada de la invención

Todos los términos tal como se usan en esta solicitud, a menos que se indique lo contrario, se entenderán en su significado ordinario conocido en la técnica. Otras definiciones más específicas para determinados términos tal como se usan en la presente solicitud son las que se establecen a continuación y están destinadas a aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, a menos que una definición establecida expresamente de otra manera proporcione una definición más amplia.

La presente invención proporciona nuevos biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de endometrio en el fluido del aparato genital femenino.

El término "diagnóstico" es conocido por el experto en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, "diagnóstico" se entiende como darse cuenta de una complicación o riesgo de una afección médica particular en un sujeto; la determinación de la naturaleza de la enfermedad o afección; o la distinción de una enfermedad o afección de otra. Se refiere tanto al proceso de intentar determinar o identificar la posible enfermedad o trastorno, como a la opinión alcanzada por este proceso. Un diagnóstico, en el sentido de procedimiento de diagnóstico, puede considerarse como un intento de clasificación de la afección de un individuo en categorías separadas y distintas que permiten tomar decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico. Posteriormente, una opinión de diagnóstico a menudo se describe en cuanto a una enfermedad u otra afección. Sin embargo, un diagnóstico puede tomar muchas formas. Puede tratarse de detectar la presencia y nombrar la enfermedad, lesión, disfunción o discapacidad. Podría ser un ejercicio de atribuir una categoría para el manejo o para el pronóstico. Puede indicar el grado de anomalía en un continuo o el tipo de anomalía en una clasificación. En términos generales, los marcadores de diagnóstico enumerados en esta descripción son aquellas proteínas detectadas diferencialmente en el nivel de expresión en muestras aisladas de controles (individuos sin cáncer) frente a muestras de cáncer de endometrio (incluyendo varios tipos de CE).

El método *in vitro* del primer aspecto de la invención puede realizarse con una muestra de: (a) un sujeto asintomático, (b) un sujeto que ya ha sido identificado como sospechoso de padecer cáncer de endometrio, (c) un sujeto ya diagnosticado de cáncer de endometrio, como ensayo diagnóstico de confirmación complementaria o (d) un sujeto con alto riesgo de padecer la enfermedad.

En la presente invención, el término "nivel de control de referencia" al que se hace referencia en los métodos de cualquiera de los aspectos de la invención debe entenderse como un valor predefinido de un marcador molecular dado o una combinación de los marcadores moleculares dados, en el presente caso cualquiera de las proteínas enumeradas en el primer o segundo aspecto así como en realizaciones particulares, que deriva de los niveles de dicho marcador o marcadores moleculares en una muestra o grupo de muestras. Si el nivel de expresión se determina a nivel de proteína, entonces el "nivel de expresión de referencia" es un valor predefinido de cantidad de proteína, mientras que si el nivel de expresión se determina a nivel de ARNm, entonces el "nivel de expresión de referencia" es un valor predefinido de la cantidad de ARNm. Las muestras se toman de un sujeto o grupo de sujetos en los que previamente se ha realizado correctamente la presencia, ausencia, estadio, subtipo o grado histológico o evolución de la enfermedad. Este valor se usa como umbral para discriminar sujetos en los que la afección que va a analizarse está presente de aquellos en los que dicha afección está ausente (es decir, sujetos que tienen cáncer de endometrio de sujetos sin cáncer de endometrio), para determinar el subtipo histológico de la enfermedad, el riesgo de desarrollar o de estar padeciendo un carcinoma de endometrio, entre otros. Este nivel de control de referencia también es útil para determinar si el sujeto debe iniciar un régimen médico y la eficacia del régimen. El sujeto o sujetos de los cuales se deriva el "nivel de control de referencia" pueden incluir sujetos en los que la afección está ausente, sujetos en los que la afección está presente, o ambos. El experto en la técnica, haciendo uso de los conocimientos generales, es capaz de elegir el sujeto o grupo de sujetos más adecuado para obtener el nivel de control de referencia para cada uno de los métodos de la presente invención. Los métodos para obtener el valor de referencia del grupo de sujetos seleccionados son bien conocidos en el estado de la técnica (Burtis C. A. *et al.*, 2008, capítulo 14, sección "Statistical Treatment of Reference Values"). En un caso particular, "nivel de control de referencia" es un valor de corte definido por medio de un análisis ROC convencional (análisis de características operativas del receptor). Como apreciará el experto, el valor de corte óptimo se definirá según las aplicaciones particulares del método de diagnóstico o pronóstico: propósito, población objetivo para el diagnóstico o pronóstico, equilibrio entre especificidad y sensibilidad, etc.

“Pronóstico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la predicción de la probable progresión y desenlace de una enfermedad. Incluye: clasificación de la neoplasia (intento de expresar en términos replicables el nivel de diferenciación celular en las neoplasias, ya que el aumento de la anaplasia se correlaciona con la agresividad de la neoplasia), estadificación de la neoplasia (intento de expresar en términos replicables la extensión de la neoplasia en el paciente), subtipo histológico de neoplasia y subtipo molecular de neoplasia. Tal como se usa en el presente documento, pronóstico significa, en realizaciones particulares, diferenciación entre cáncer de endometrio endometriode y cáncer de endometrio no endometriode.

El término “muestra de fluido del aparato genital femenino” se refiere a un fluido producido por el órgano uterino que forma parte del aparato genital femenino y que ha sido tomado por aspiración, como aspiración por vacío (es decir, “muestra de aspirado uterino”), o por una Pipelle de Cornier, y/o por cualquier otro método que recupere fluido de la cavidad uterina. Por tanto, incluye lavados uterinos. Según la presente invención, la aspiración del fluido se realiza en particular sin una etapa previa de infusión salina. Es decir, el término “aspirado” no engloba aquellas muestras resultantes de lavados uterinos.

En la presente invención, los “exosomas” denominados indistintamente como “vesículas extracelulares”, “microvesículas”, “vesículas similares a exosomas” o “uterosomas” son vesículas derivadas de células que están presentes en muchos fluidos eucariotas, incluyendo sangre, orina y medio cultivado de cultivos celulares. El diámetro informado de los exosomas está entre 30 y 100 nm, que es más grande que las lipoproteínas de baja densidad (LDL) pero mucho más pequeño que, por ejemplo, los glóbulos rojos. Los exosomas se liberan de la célula cuando los cuerpos multivesiculares se fusionan con la membrana plasmática o se liberan directamente de la membrana plasmática. Los exosomas pueden usarse potencialmente para el diagnóstico, el pronóstico, la terapia y como biomarcadores para la salud y la enfermedad. Por “fracción que contiene exosomas aislada de AU” se entiende cualquier fracción purificada del aspirado uterino que comprende principalmente exosomas. A continuación se detallan ejemplos no limitativos de métodos para aislar exosomas de aspirados uterinos.

En otra realización, el método de diagnóstico de CE comprende determinar el nivel de expresión de agrina en una fracción que contiene exosomas aislada de AU; y el nivel de expresión de agrina en una muestra de fluido uterino del aparato genital femenino, esta última muestra sin aislamiento ni purificación de exosomas.

En otra realización particular, el método de diagnóstico de CE comprende además determinar el nivel de expresión de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: PERM, OSTP, CTNB1, CAYP1, XPO2, NGAL, SG2A1, CADH1, SPIT1, MMP9, NAMPT, LDHA, CASP3, PRDX1, MIF, K2C8, CAPG, MUC1, ANXA1, HSPB1, PIGR, CH10, CD44, CLIC1, TPIS, GSTP1, GTR1, ENOA, PDIA1, KPYM, ANXA2 y FABP5.

Tal como se indicó, en otra realización particular, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posterior, el método de diagnóstico de CE comprende determinar el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas (es decir, biomarcadores) seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; y agrina, MMP9, en una fracción que contiene exosomas aislada de AU; y determinar el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas (es decir, biomarcadores) seleccionadas del grupo que consiste en: MMP9, PODXL, RAB8A; MMP9, PODXL, RSSA; agrina, MMP9, PODXL; MMP9, PODXL, VAMP8; MMP9, MX1; MMP9, RSSA; MMP9, MVP; MMP9, RAB8A; MMP9, VAMP8; BCAM, MMP9; MMP9, agrina en un aspirado uterino.

Otra disposición de la invención es el uso de agrina como marcador *in vitro* para diagnosticar CE en una muestra de fluido uterino del aparato genital femenino. Esta disposición también puede formularse como un método *in vitro* para detectar uno o más marcadores de cáncer de endometrio en un sujeto, que comprende: (a) obtener una muestra de fluido del aparato genital femenino; y (b) detectar en la muestra una cantidad de al menos un marcador de cáncer de endometrio seleccionado de agrina en una muestra de fluido uterino del aparato genital femenino, proporcionando dicho marcador información del diagnóstico de CE. En términos generales, se engloba el uso de agrina como marcador *in vitro* para el diagnóstico de cáncer de endometrio en una muestra de fluido uterino aislado del aparato genital femenino.

Otro aspecto de la invención es el uso de kits, que comprenden un soporte sólido y anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la proteína diana para detectar el nivel de expresión de agrina, para el diagnóstico de CE.

En una realización particular del uso de dichos kits, los kits comprenden además medios para detectar el nivel de expresión de las proteínas de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; agrina, BCAM; agrina, MMP9, PODXL; agrina, MMP9; y agrina, MMP9, PIGR, para el diagnóstico de cáncer de endometrio, en los que los medios son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana.

En otra realización particular del uso de los kits, los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para detectar el nivel de expresión de las proteínas son anticuerpos o fragmentos de los

mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para llevar a cabo un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquímica y combinaciones de los mismos.

5 Los números de registro de la base de datos Uniprot de todas las proteínas enumeradas en el presente documento corresponden a versiones accesibles el 7 de julio de 2017.

La agrina tiene el número de registro de la base de datos Uniprot O00468. Esta proteína es una glicoproteína de la lámina basal de sulfato de heparina implicada en la formación y el mantenimiento de la unión neuromuscular.

10 MVP, también conocida como proteína principal de la bóveda, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot Q14764. Está implicada en la transducción de señales.

15 VAMP8, también conocida como proteína de membrana 8 asociada a vesículas, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot Q9BV40. Es un receptor de proteína de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble (SNARE) implicado en la autofagia a través del control directo de la fusión de la membrana del autofagosoma con la membrana del lisosoma.

20 RAB8A, también conocida como proteína Rab-8A relacionada con Ras, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P61006. Es una pequeña GTPasa Rab implicada en el tráfico de membranas intracelulares.

25 MX1, también conocida como proteína de unión a GTP inducida por interferón Mx1, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P20591. Tiene actividad antiviral contra una amplia gama de virus de ARN y algunos virus de ADN.

IMB1, también conocido como subunidad beta-1 de importina, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot Q14974. Participa en la importación de proteínas nucleares.

30 TERA, también conocida como ATPasa de retículo endoplásmico de transición, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P55072. Esta proteína está implicada en la formación del retículo endoplásmico de transición.

BCAM, también conocida como molécula de adhesión de células basales, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P50895. Esta proteína es un receptor de laminina alfa-5.

35 ANXA2, también conocida como anexina A2, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P07355. Esta proteína es una proteína de unión a membrana regulada por calcio que inhibe la degradación de LDLR potenciada por PSCK9.

40 RSSA, también conocida como proteína ribosomal 40S SA o receptor de laminina 1, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P08865. Se requiere para el ensamblaje y/o estabilidad de la subunidad ribosomal 40S.

45 AGR2, también conocido como homólogo de proteína 2 de gradiente anterior o HPC8, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot O95994. Esta proteína está implicada en la síntesis y secreción postranscripcional de MUC2.

PODXL, también conocida como podocalicina o antígeno GCTM-2, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot O00592. Está implicada en la regulación de la adhesión, la morfología celular y la progresión del cáncer.

50 CD59, también conocida como glicoproteína CD59 o proteína inhibidora de MAC, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P13987. Está implicada en la inhibición de la acción del complejo de ataque a la membrana del complemento (MAC).

55 CD166, también conocido como antígeno CD166, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot Q13740. Está implicado en los contactos célula-célula tanto heterotípicos como homotípicos.

CD81, también conocido como antígeno CD81 o tetraspanina-28, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P60033. Esta proteína puede estar implicada en la regulación del crecimiento de células de linfoma.

60 PIGR, también conocido como receptor polimérico de inmunoglobulina, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P01833, 26 de junio de 2007 - v4. Este receptor se une a IgA e IgM poliméricas en la superficie basolateral de las células epiteliales.

65 CTNB1, también conocido como catenina beta-1, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P35222, 1 de febrero de 1994 - v1. Actúa como un regulador negativo de la cohesión del centrosoma y bloquea el anóikis de las células epiteliales renales e intestinales malignas.

ES 2 953 011 T3

- CAYP1, también conocido como calcifosina, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot Q13938, 1 de noviembre de 1997 - v1. Es una proteína de unión al calcio que puede desempeñar un papel en los acontecimientos de señalización celular.
- 5 CADH1, también conocida como cadherina-1 o E-cadherina, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P12830, 1 de julio de 1993 - v3. Esta proteína está implicada en los mecanismos que regulan las adherencias célula-célula, la movilidad y la proliferación de células epiteliales. Tiene un potente papel supresor invasivo.
- 10 CD44, también conocido como antígeno CD44, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P16070, 5 de octubre de 2010 - v3. Interviene en las interacciones célula-célula y célula-matriz a través de su afinidad por HA, y posiblemente también a través de su afinidad por otros ligandos tales como osteopontina, colágenos y metaloproteinasas de matriz (MMP).
- 15 XPO2, también conocido como exportina-2, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P55060, 29 de marzo de 2005 - v3. Entre otros, esta proteína se ha divulgado como receptor exportador de importina-alfa, que media la reexportación de importina-alfa desde el núcleo al citoplasma después de importar sustratos (cargas) y se une cooperativamente a la importina-alfa y a la GTPasa Ran en su forma activa unida a GTP.
- 20 SG2A1, también conocido como mamaglobina-B, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot O75556, 1 de noviembre de 1998 - v1. Puede unirse a los andrógenos y otros esteroides.
- 25 ENOA, también conocida como alfa-enolasa, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P06733, 23 de enero de 2007 - v2. Es una enzima multifuncional que, además de su papel en la glucólisis, interviene en diversos procesos como el control del crecimiento, la tolerancia a la hipoxia y las respuestas alérgicas. También puede funcionar en el sistema fibrinolítico intravascular y pericelular debido a su capacidad para actuar como receptor y activador del plasminógeno en la superficie celular de varios tipos de células, tales como leucocitos y neuronas. Estimula la producción de inmunoglobulinas.
- 30 CAPG, también conocida como proteína protectora de macrófagos, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P40121, 30 de noviembre de 2010 - v2. Es una proteína sensible al calcio que bloquea reversiblemente los extremos punzantes de los filamentos de actina pero no corta los filamentos de actina preformados. Puede desempeñar un papel importante en la función de los macrófagos.
- 35 PRDX1, también conocido como peroxirrédoxina-1, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot Q06830, 1 de junio de 1994 - v1. Está implicada en la regulación redox de la célula.
- 40 CLIC1, también conocida como proteína 1 del canal intracelular de cloruro, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot O00299, 23 de enero de 2007 - v4. Se inserta en las membranas y forma canales de iones de cloruro. La actividad del canal depende del pH. La inserción de la membrana parece estar regulada por redox y puede producirse sólo en condiciones oxidantes. Está implicada en la regulación del ciclo celular.
- PDIA1, también conocida como proteína disulfuro-isomerasa, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P07237, 1 de noviembre de 1997 - v3. Cataliza la formación, rotura y reordenamiento de enlaces disulfuro.
- 45 KP YM, también conocida como piruvato cinasa PKM, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P14618, 23 de enero de 2007 - v4. Es una enzima glicolítica que cataliza la transferencia de un grupo fosforilo del fosfoenolpiruvato (PEP) al ADP, generando ATP y desempeña un papel general en la muerte celular independiente de caspasa de las células tumorales.
- 50 GSTP1, también conocido como glutatión S-transferasa P, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P09211, 23 de enero de 2007 - v2. Regula negativamente la actividad de CDK5 a través de la translocación p25/p35 para prevenir la neurodegeneración.
- 55 GTR1 tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P11166, 3 de octubre de 2006 - v2. Es un transportador facilitador de glucosa. Esta isoforma puede ser responsable de la captación de glucosa constitutiva o basal. Tiene una especificidad de sustrato muy amplia; puede transportar una amplia gama de aldosas, incluyendo pentosas y hexosas.
- 60 CH10, también conocida como proteína mitocondrial de choque térmico de 10 kDa, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P61604, 23 de enero de 2007 - v2. Es esencial para la biogénesis de proteínas mitocondriales, junto con CPN60. Se une a CPN60 en presencia de Mg-ATP y suprime la actividad ATPasa de este último.
- 65 MIF, también conocido como factor inhibidor de la migración de macrófagos, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P14174, 23 de enero de 2007 - v4. Está implicado en la respuesta inmunitaria innata frente a los patógenos bacterianos.

TPIS, también conocida como trisafosfato isomerasa, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P60174, 19 de octubre de 2011 - v3. Esta proteína está implicada en la ruta de la gluconeogénesis, que forma parte de la biosíntesis de hidratos de carbono.

5 NGAL, también conocida como lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P80188, 1 de noviembre de 1995 - v2. Está implicado en la apoptosis debida a la privación de interleucina-3 (IL3) y en la inmunidad innata.

10 LDHA, también conocida como cadena A de L-lactato deshidrogenasa, tiene el número de registro de la base de datos Uniprot P00338, 23 de enero de 2007 - v2. Esta proteína está implicada en la etapa 1 de la subruta que sintetiza (S)-lactato a partir de piruvato.

15 Algunas de estas proteínas se han relacionado con la gradación de CE en muestras de tejido. Sin embargo, no hay datos significativos que se correlacionen con valores en muestras de fluido uterino del aparato genital femenino. Tal como se expuso anteriormente, la detección de marcadores en fluidos uterinos (aspirados o lavados) implica la ventaja de recoger datos de muestreo de rutina en la práctica clínica de las enfermedades ginecológicas, evitando costes y, lo que es más importante, biopsias de tejido.

20 Tal como se indica, en otra realización particular del método, el nivel de expresión se determina a nivel de proteína.

En una realización más particular, el nivel de proteína se determina mediante un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquímica, espectrometría de masas y combinaciones de los mismos.

25 En otra realización particular, el nivel de expresión de la proteína se determina usando un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a la proteína.

30 Más en particular, dicho anticuerpo o fragmento del mismo forma parte de un kit.

La invención también se refiere a un método implementado por ordenador para llevar a cabo el método de diagnóstico diferencial tal como se divulgó anteriormente y tal como se define en cualquiera de las realizaciones, en el que después de la determinación del nivel de expresión de una o más de las proteínas para el diagnóstico y/o para el pronóstico de CE, a dicho(s) nivel(es) se les da un valor y/o una puntuación, y opcionalmente se calculan en una fórmula matemática para obtener un valor calculado; en el que en función de dicho(s) nivel(es), puntuación/puntuaciones y/o valor(es) calculado(s), se decide entre las opciones de padecer o no CE y/o entre las opciones de padecer diferentes subtipos de CE.

40 Se determinó que la combinación particular de agrina, MMP9, PIGR tenía un alto valor pronóstico cuando se detectaron los niveles de expresión de las proteínas en un aspirado uterino. La siguiente tabla B muestra el AUC y el intervalo de confianza (IC) de los valores del 95 %. Los datos derivan del análisis de muestras de CEE y CENE. En la tabla C, también se indican los valores de AUC.

45 Por otro lado, la tabla A muestra los valores de AUC y el IC del 95 % de la siguiente combinación: agrina, BCAM, lo que brinda importante información de pronóstico cuando se detectaron los niveles de expresión de las proteínas en una fracción que contiene exosomas aislada de aspirado uterino. Los datos derivan del análisis de muestras de CEE y CENE.

TABLA A

50

PROTEÍNA 1	PROTEÍNA 2	AUC	IC del 95 % inf.	IC del 95 % sup.	Muestra
AGRINA	BCAM	0,903	0,821	0,984	Exosomas

TABLA B

PROTEÍNA 1	PROTEÍNA 2	PROTEÍNA 3	AUC	IC del 95 % inf.	IC del 95 % sup.	Muestra
AGRINA	MMP9	PIGR	0,98	0,946	1	Aspirado uterino

55 En cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, para cualquiera de los aspectos de la invención, el nivel de expresión se determina a nivel de proteína. En esta realización, los marcadores de proteínas incluyen, pero no se limitan a, péptidos de secuencia nativa, isoformas, polipéptidos quiméricos, todos los homólogos, fragmentos y precursores de los marcadores, incluyendo las formas modificadas de los polipéptidos y derivados de los mismos. En una realización más particular, el nivel de proteína se determina mediante un ensayo o

tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo electroquímico, espectrometría de masas y combinaciones de los mismos.

- 5 En realizaciones particulares proporcionadas anteriormente o a continuación, el nivel de expresión se determina mediante inmunológica.

El término “inmunológica” tal como se usa en el presente documento se refiere a una variedad de técnicas para detectar antígenos (generalmente proteínas y péptidos, y en el presente caso cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente solas o en combinación) en una muestra explotando el principio de la unión de anticuerpos específicamente a dichos antígenos. La visualización de una interacción antígeno-anticuerpo puede lograrse de varias maneras. En el caso más común, un anticuerpo se conjuga con una enzima, tal como la peroxidasa, que puede catalizar una reacción productora de color. Alternativamente, el anticuerpo también puede marcarse con un fluoróforo, tal como fluoresceína o rodamina. La técnica de inmunológica puede ser directa o indirecta. El método directo es un método de tinción de una sola etapa e implica un anticuerpo marcado (por ejemplo, antisuero conjugado con FITC) que reacciona directamente con el antígeno. Si bien esta técnica usa solo un anticuerpo y, por tanto, es simple y rápida, la sensibilidad es menor debido a la poca amplificación de la señal, como con los métodos indirectos, y se usa con menos frecuencia que los métodos indirectos. El método indirecto implica un anticuerpo primario no marcado (primera capa) que se une al antígeno diana en la muestra y un anticuerpo secundario marcado (segunda capa) que reacciona con el anticuerpo primario. Este método es más sensible que las estrategias de detección directa debido a la amplificación de la señal debido a la unión de varios anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario si el anticuerpo secundario se conjuga con el indicador fluorescente o enzimático.

Puede lograrse una amplificación adicional si el anticuerpo secundario se conjuga con varias moléculas de biotina, que pueden reclutar complejos de enzima avidina, estreptavidina o neutravidina. El método indirecto, además de su mayor sensibilidad, también tiene la ventaja de que sólo es necesario generar un número relativamente pequeño de anticuerpos secundarios conjugados (marcados) convencionales. Con el método directo, sería necesario marcar cada anticuerpo primario para cada antígeno de interés. Hay que tener en cuenta que las técnicas de inmunológica también pueden usarse para detectar determinadas secuencias de ácidos nucleicos si una sonda de ácido nucleico marcada (diseñada para unirse específicamente a una determinada secuencia de ácido nucleico diana) puede detectarse posteriormente con un anticuerpo marcado. Por tanto, la detección de la proteína podría realizarse usando un ácido nucleico marcado diseñado para unirse a una secuencia específica del ARN de la proteína diana y luego detectando dicho ácido nucleico marcado con un anticuerpo marcado que se une selectivamente a la etiqueta.

Los procedimientos de inmunoensayo adecuados incluyen ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA, como ELISA múltiple), ensayo de inmunotransferencia por puntos enzimático, ensayo de aglutinación, ensayo en sándwich de anticuerpo-antígeno-anticuerpo, ensayo en sándwich de antígeno-anticuerpo-antígeno, inmunocromatografía u otros formatos de inmunoensayo bien conocidos para el experto habitual, tal como el radioinmunoensayo, así como los formatos de micromatrices de proteínas.

En una realización, en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nivel de expresión de la proteína se determina mediante un inmunoensayo.

En otra realización, en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nivel de expresión de la proteína se determina mediante ELISA; más en particular ELISA múltiple.

Alternativamente, el nivel de expresión de la proteína puede determinarse mediante bioluminiscencia, fluorescencia, quimioluminiscencia, electroquímica o espectrometría de masas.

Alternativamente, el nivel de expresión de la proteína puede determinarse midiendo los niveles de péptidos proteotípicos de la proteína (péptidos con una secuencia de aminoácidos asociada únicamente con la proteína estudiada en un proteoma dado) mediante espectrometría de masas.

En otra realización, en combinación con cualquiera de las realizaciones proporcionadas anteriormente o a continuación, el nivel de expresión de la proteína se determina usando un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a la(s) proteína(s) diana.

El término “anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a la(s) proteína(s) diana” debe entenderse como cualquier inmunoglobulina o fragmento de la misma capaz de unirse selectivamente a la proteína diana. Incluye anticuerpos monoclonales y policlonales. El término “fragmento del mismo” abarca cualquier parte de un anticuerpo que tenga el tamaño y la conformación adecuados para unirse a un epítipo de la proteína diana. Los fragmentos adecuados incluyen F(ab), F(ab') y Fv. Un “epítipo” es la parte del antígeno que reconoce el sistema inmunitario (células B, células T o anticuerpos).

Los anticuerpos usados para la detección específica pueden ser policlonales o monoclonales. Existen medios bien conocidos en el estado de la técnica para preparar y caracterizar anticuerpos. Los métodos para generar anticuerpos policlonales son bien conocidos en la técnica anterior. Brevemente, se preparan anticuerpos policlonales inmunizando un animal con la proteína; luego, se recoge el suero del animal inmunizado y se aíslan los anticuerpos. Puede usarse una amplia gama de especies animales para la producción del antisuero. Normalmente, el animal usado para la producción de antisueros puede ser un conejo, un ratón, una rata, un hámster, un conejillo de indias o una cabra.

Además, los anticuerpos monoclonales (AcM) pueden prepararse usando técnicas bien conocidas. Normalmente, el procedimiento implica inmunizar a un animal adecuado con la proteína asociada con la enfermedad. La composición inmunizante puede administrarse en una cantidad eficaz para estimular las células productoras de anticuerpos. Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales se inician generalmente siguiendo las mismas líneas que la preparación de anticuerpos policlonales. El inmunógeno se inyecta en animales como antígeno. El antígeno puede mezclarse con adyuvantes tales como el adyuvante de Freund completo o incompleto. A intervalos de dos semanas, aproximadamente, se repite la inmunización con el mismo antígeno.

En otra realización particular del tercer aspecto, los medios para llevar a cabo la invención forman parte de un kit. El anticuerpo o fragmento del mismo para detectar la(s) proteína(s) diana puede incluirse en un kit. El kit puede comprender adicionalmente medios (aditivos, disolventes) para visualizar las interacciones anticuerpo-proteína.

Estos anticuerpos pueden usarse, tal como como describió anteriormente, como "medios" para determinar la expresión de las proteínas diana en el quinto aspecto de la invención.

Por tanto, en una realización particular del primer y otros aspectos del método de la invención, el nivel de expresión de una proteína se determina usando un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de unirse a la proteína.

En otra realización particular, dicho anticuerpo o fragmento del mismo forma parte de un kit.

Alternativamente, el nivel de expresión se determina a nivel de ARNm.

En una realización, la cantidad de ARNm de cada uno de los marcadores se detecta a través de la reacción en cadena de la polimerasa usando, por ejemplo, cebadores de oligonucleótidos que se hibridan con uno o más marcadores de cáncer de endometrio de polinucleótidos o complementos de tales polinucleótidos. Dentro de otras realizaciones, la cantidad de ARNm se detecta usando una técnica de hibridación, empleando sondas de oligonucleótidos que se hibridan con uno o más marcadores de cáncer de endometrio de polinucleótidos o complementos de tales polinucleótidos.

Cuando se usa la detección de ARNm, el método puede llevarse a cabo combinando ARNm aislado con reactivos para convertirlo en ADNc según métodos convencionales bien conocidos en la técnica, tratando el ADNc convertido con reactivos de reacción de amplificación (tales como reactivos de reacción PCR de ADNc) en un recipiente junto con una mezcla apropiada de cebadores de ácidos nucleicos; hacer reaccionar el contenido del recipiente para producir productos de amplificación; y analizar los productos de amplificación para detectar la presencia de uno o más de los marcadores de cáncer de endometrio de polinucleótidos en la muestra. Para el ARNm, la etapa de análisis puede realizarse usando el análisis de transferencia de tipo Northern para detectar la presencia de marcadores de cáncer de endometrio de polinucleótidos en la muestra. La etapa de análisis puede llevarse a cabo adicionalmente detectando cuantitativamente la presencia de marcadores de cáncer de endometrio de polinucleótidos en el producto de amplificación y comparando la cantidad de marcador detectado frente a un panel de valores esperados para la presencia o ausencia conocida de tales marcadores en tejido normal y maligno derivado usando cebadores similares.

En otra realización, la invención proporciona un método en el que el ARNm se detecta: (a) aislando el ARNm de una muestra y combinando el ARNm con reactivos para convertirlo en ADNc; (b) tratar el ADNc convertido con reactivos de reacción de amplificación y cebadores de ácido nucleico que hibridan con uno o más de los marcadores de cáncer de endometrio de polinucleótidos para producir productos de amplificación; (c) analizar los productos de amplificación para determinar la cantidad de ARNm presente que codifica para la proteína marcadora de cáncer de endometrio; y (d) comparar la cantidad determinada de ARNm con una cantidad detectada frente a un panel de valores esperados para tejido normal y enfermo (por ejemplo, tejido maligno) derivados usando métodos similares.

En realizaciones particulares de la invención, la RT-PCR puede usarse para amplificar el ARNm de marcadores de proteínas de cáncer de endometrio para detección y análisis. Otras realizaciones de la invención usan RT-PCR cuantitativa para determinar cuantitativamente la cantidad de ARNm para marcadores de proteínas de cáncer de endometrio. Realizaciones adicionales de la invención usan RT-PCR en tiempo real para la cuantificación y el análisis.

Con respecto al dispositivo o kits de la invención, dichos kits son, en realizaciones particulares de la invención, proporcionados para el análisis de muestras de pacientes. Los dispositivos de interés incluyen matrices, donde los

reactivos se separan espacialmente sobre un sustrato como un portaobjetos, gel, placa de pocillos, etc. Alternativamente, los reactivos pueden proporcionarse como un kit que comprende reactivos en una suspensión o forma suspendible, por ejemplo, reactivos unidos a perlas. Los reactivos de interés incluyen reactivos específicos para marcadores de autoanticuerpos. Tales reactivos pueden incluir proteínas o péptidos antigénicos y similares. Tales dispositivos o kits pueden comprender además anticuerpos específicos de citocinas o fragmentos de los mismos; y similares.

Se determinó que la combinación particular de la siguiente tabla E tenía un alto valor de diagnóstico cuando los niveles de expresión de las proteínas se detectaron en un aspirado uterino. La siguiente tabla E muestra el AUC y el intervalo de confianza (IC) de los valores del 95 %. Los datos derivan del análisis de muestras de CE y no CE (incluyendo CEE y CENE).

TABLA E. Combinación de valor diagnóstico en aspirado uterino

PROTEÍNA 1	PROTEÍNA 2	PROTEÍNA 3	AUC	IC DEL 95 % inf.	IC DEL 95 % sup.	Muestra
AGRINA	MMP9	PODXL	0,979	0,953	1	Aspirado uterino
MMP9	AGRINA		0,94	0,89	0,992	Aspirado uterino

TABLA F. Combinaciones de valor diagnóstico en una fracción que contiene exosomas aislada de aspirado uterino

PROTEÍNA 1	PROTEÍNA 2	PROTEÍNA 3	AUC	IC DEL 95 % inf.	IC DEL 95 % sup.	Muestra
AGRINA	CD81	TERA	0,944	0,902	0,986	Exosomas
AGRINA	CD59	MVP	0,944	0,902	0,986	Exosomas
AGR2	AGRINA	CD81	0,943	0,903	0,982	Exosomas
AGRINA	CD166	MVP	0,938	0,896	0,98	Exosomas
AGRINA	CD81		0,934	0,89	0,979	Exosomas
AGRINA	CD166		0,926	0,878	0,975	Exosomas
AGRINA	CD59		0,921	0,871	0,97	Exosomas
AGRINA	MMP9		0,9	0,848	0,961	Exosomas

Por otro lado, la tabla F muestra valores de AUC y IC del 95 % de las siguientes combinaciones: agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9, brindando importante información de diagnóstico cuando los niveles de expresión de las proteínas se detectaron en una fracción que contenía exosomas aislada de aspirado uterino. Los datos derivan del análisis de muestras de CE y no CE (incluyendo CEE y CENE).

El “soporte sólido” incluye una membrana de nitrocelulosa, vidrio o un polímero. Los polímeros más usados habitualmente son la celulosa, la poli(acrilamida), el nailon, el poliestireno, el poli(cloruro de vinilo) o el polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tiras, tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para realizar un inmunoensayo.

Los ensayos de unión para medir los niveles de biomarcadores pueden usar formatos homogéneos o de fase sólida. Los métodos de ensayo adecuados incluyen ensayos de enlace competitivo o sándwich. Los ejemplos de inmunoensayos sándwich se describen en la patente estadounidense n.º 4.168.146 y la patente estadounidense n.º 4.366.241, los cuales se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. Los ejemplos de inmunoensayos competitivos incluyen los divulgados en la patente estadounidense n.º 4.235.601, la patente estadounidense n.º 4.442.204 y la patente estadounidense n.º 5.208.535, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Pueden medirse múltiples biomarcadores usando un formato de ensayo multiplexado, por ejemplo, multiplexando mediante el uso de matrices de reactivos de unión, multiplexando usando discriminación espectral de marcadores, multiplexando el análisis de citometría de flujo de ensayos de unión realizados en partículas, por ejemplo, usando el sistema Luminex®.

Los ensayos de la presente invención pueden realizarse mediante cualquier método adecuado. En una realización, los niveles de biomarcadores se miden en una sola muestra, y esas mediciones pueden realizarse en una sola cámara de ensayo o dispositivo de ensayo, incluyendo, pero sin limitarse a, un solo pocillo de una placa de ensayo, un solo cartucho de ensayo, un solo flujo lateral dispositivo, un solo tubo de ensayo, etc. Los niveles de biomarcadores pueden medirse usando cualquiera de las técnicas disponibles para el experto en la técnica, por

ejemplo, mediciones físicas directas (por ejemplo, espectrometría de masas) o ensayos de unión (por ejemplo, inmunoensayos, ensayos de aglutinación y ensayos inmunocromatográficos). El método también puede comprender la medición de una señal que resulta de una reacción química, por ejemplo, un cambio en la absorbancia óptica, un cambio en la fluorescencia, la generación de quimioluminiscencia o electroquimioluminiscencia, un cambio en la reflectividad, el índice de refracción o la dispersión de la luz, la acumulación o liberación de marcadores detectables de la superficie, la oxidación o reducción o especies redox, una corriente o potencial eléctrico, cambios en campos magnéticos, etc. Las técnicas de detección adecuadas pueden detectar acontecimientos de unión midiendo la participación de reactivos de unión marcados mediante la medición de los marcadores a través de su fotoluminiscencia (por ejemplo, a través de la medición de fluorescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo, fluorescencia de onda evanescente, fósforos de conversión ascendente, fluorescencia multifotónica, etc.), quimioluminiscencia, electroquimioluminiscencia, dispersión de luz, absorbancia óptica, radiactividad, campos magnéticos, actividad enzimática (por ejemplo, midiendo la actividad enzimática a través de reacciones enzimáticas que provocan cambios en la absorbancia óptica o fluorescencia o provocan la emisión de quimioluminiscencia). Alternativamente, pueden usarse técnicas de detección que no requieran el uso de marcadores, por ejemplo, técnicas basadas en la medición de masa (por ejemplo, mediciones de ondas acústicas superficiales), índice de refracción (por ejemplo, mediciones de resonancia de plasmones superficiales) o la luminiscencia inherente de un analito.

En otra realización, el kit es una micromatriz que incluye un conjunto definido de genes que codifican para marcadores de proteínas de cáncer de endometrio. Todas las realizaciones proporcionadas anteriormente para analizar la proteína agrina particular, cuya expresión está significativamente alterada por la enfermedad endometrial, también son realizaciones particulares de micromatrices.

Los métodos *in vitro* de la invención proporcionan información de diagnóstico y/o pronóstico. En una realización, los métodos de la invención comprenden además las etapas de (i) recopilar la información de diagnóstico y/o pronóstico, y (ii) guardar la información en un soporte de datos.

En el sentido de la invención, un “soporte de datos” debe entenderse como cualquier medio que contenga datos de información significativos para el diagnóstico y/o pronóstico del carcinoma de endometrio, tal como papel. Por ejemplo, el soporte puede comprender un medio de almacenamiento, tal como una ROM, por ejemplo, un CD ROM o una ROM de semiconductores, o un medio de grabación magnético, por ejemplo, un disquete o un disco duro. Además, el soporte puede ser un soporte transmisible tal como una señal eléctrica u óptica, que puede transmitirse a través de un cable eléctrico u óptico o por radio u otros medios. Cuando los datos de diagnóstico/pronóstico estén incorporados en una señal que pueda ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, el soporte podrá estar constituido por tal cable u otro dispositivo o medio. Otros soportes se refieren a dispositivos USB y archivos informáticos. Ejemplos de soportes de datos adecuados son papel, CD, USB, archivos informáticos en PC o registro de sonido con la misma información.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, no se pretende que la palabra “comprende” y las variaciones de la palabra excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra “comprende” abarca el caso de “que consiste en”. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción o se podrán aprender mediante la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en este documento.

Ejemplos

Ejemplo 1. Biomarcadores de diagnóstico y pronóstico de CE en exosomas derivados de fluido uterino, y en fluido uterino.

1. Muestras, reactivos y métodos

1.1 Pacientes y descripción de la muestra

Los pacientes fueron reclutados en tres instituciones diferentes: HUVH (Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, España), HUAV (Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, España) y UMCF (Centro Médico Universitario de Freiburg, Freiburg, Alemania). Cada institución participante obtuvo la aprobación ética y las muestras se obtuvieron después de que los participantes firmaron el consentimiento informado.

Los aspirados uterinos (AU) se obtuvieron por aspiración con Pipelle de Cornier (Gynetics Medical Products). Las muestras se colocaron en tubos de 1,5 ml y se mantuvieron en hielo durante todo el procesamiento, que incluyó la adición de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en una razón de 1:1 (v/v), el pipeteo suave de la muestra y la centrifugación a 2500 g (4 °C) en un rotor F45-30-11 (microcentrífuga Eppendorf 5417R) durante 20 min para retirar la fracción celular. La fracción restante del sobrenadante (SN) se dividió en alícuotas y se congeló a -80 °C hasta que se necesitó.

Para el aislamiento de exosomas (abreviado como ELV), los ELV se obtuvieron de los SN de AU mediante centrifugación diferencial, siguiendo una modificación de un protocolo de aislamiento de ELV descrito previamente por Thery *et al.* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18228490>. Brevemente, los SN se descongelaron y diluyeron en PBS hasta un volumen final de 25 ml. Se realizó una etapa de centrifugación a 10.000 x g (4 °C) durante 30 min en una centrífuga Thermo Scientific Heraeus MultifugeX3R (rotor FiberLite F15-8x-50c) para retirar restos celulares, macropartículas y cuerpos apoptóticos. El precipitado resultante enriquecido en MV se resuspendió en 50 µl de PBS y se congeló a -80 °C. Luego, el sobrenadante se transfirió a tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter) y se llenó con PBS para realizar una primera etapa de ultracentrifugación a 100.000 xg (4 °C) durante 2 h en una centrífuga Thermo Scientific Sorvall WX UltraSeries con un rotor AH-629. El sobrenadante de esta segunda centrifugación fue la fracción soluble y se congeló a -80 °C. Este primer sedimento se resuspendió en PBS y se centrifugó de nuevo a 100.000 xg (4 °C) durante 1 h. El sedimento final enriquecido en ELV (posiblemente junto con microvesículas (MV) y algunos cuerpos apoptóticos restantes) se resuspendió en 50 µl de PBS. Se reservaron cinco microlitros de gránulos de MV y ELV a -80 °C para determinar la cuantificación y la distribución del tamaño de las partículas mediante NTA, mientras que el resto de la muestra se congeló a -80 °C para la extracción de proteínas.

1.2 Extracción e identificación de proteínas mediante análisis de monitorización de reacción en paralelo con cromatografía de líquidos (LC-PRM)

Para la fase de descubrimiento, los ELV se resuspendieron en un tampón de lisis que se compone de Tris 40 mM pH 8, NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, Triton X-100 al 2 % e inhibidores de la proteasa 1:100 (Sigma-Aldrich) en una razón 1:1 (v/v). Luego, las muestras se congelaron a -20 °C durante al menos 8 horas y luego se descongelaron en hielo y se sometieron a ultrasonidos en cinco ciclos de 5 segundos a una amplitud del 100 % (Labsonic M, Sartorius Stedim Biotech) para garantizar la ruptura de la membrana. Las proteínas extraídas se almacenaron a -20 °C hasta que se necesitaron.

La fase de validación se realizó en los ELV y en el aspirado uterino (AU) sin necesidad de aislar los ELV. Para extraer proteínas de los ELV para la fase de validación, el detergente contenido en el tampón de lisis se cambió por <1 % de NP-40, para que la extracción de proteínas ya fuera adecuada para la digestión directa en disolución y CL-EM/EM. El resto del procedimiento siguió siendo el mismo. Para extraer proteínas de las fracciones fluidas de AU; estos se sonicaron en 5 ciclos de 5 segundos cada uno al 100 % de amplitud (Labsonic M, Sartorius Stedim Biotech) para romper las microvesículas, los agregados de proteínas y/o la mucosidad presentes en la muestra. Luego, se usó el kit de trampa giratoria para el agotamiento de albúmina e IgG (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante para retirar la albúmina y la inmunoglobulina G de las muestras. Todas las proteínas extraídas se almacenaron a -20°C hasta que se necesitaron. También se obtuvieron datos de valor diagnóstico y pronóstico con muestra de fluido uterino (ELV o AU sin aislamiento de ELV) en la que no se llevó a cabo agotamiento de albúmina e inmunoglobulina G.

Para la fase de descubrimiento, los péptidos disueltos en ácido fórmico al 0,1 % se cargaron en primer lugar en un dispositivo nano-LC de DI de 150 µm x 20 cm en una columna empaquetada interna (Jupiter C18, 3 µm, 300 Å, Phenomenex, Torrance, CA) y se separaron con un sistema EASY nanoLC (Thermo Scientific). Para la elución de los péptidos, se usó un gradiente lineal de 1 hora de ACN al 5-40 % (FA al 0,2 %) a un caudal constante de 600 nL/min. El sistema de LC se acopló a un espectrómetro de masas en tándem QExactive plus Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) y los archivos RAW se adquirieron con el software XCalibur (Thermo Fisher Scientific). Los espectros de masas en tándem se realizaron con un método Top-12 con una ventana de aislamiento de precursores de m/z 2,0. La resolución fue de 70,000 a m/z 400 para el barrido topográfico (con AGC 1e⁶, tiempo máximo de inyección de 200 ms y un intervalo de barrido de m/z 300-2000) y 17.500 para espectros de EM/EM (AGC a 5e⁵, tiempo máximo de inyección 50 ms e intervalo de barrido m/z 200-2000). La energía de colisión normalizada (NCE) se fijó en 25 y el tiempo de exclusión se fijó en 10 s.

En cuanto a la identificación de proteínas, para la cuantificación de SILAC, los archivos RAW se analizaron usando MaxQuant (versión 1.3.0.3). Se tomaron los parámetros predeterminados: tolerancia de error de fragmento de EM/EM de 20 ppm, carbamidometilación (C) fija y oxidación (M) así como acetilo (proteína N-term) como modificación variable. Se seleccionaron arginina (Arg10) y lisina (Lys8) como el marcador pesado y se aplicó la opción "coincidencia entre ejecución". Los archivos RAW se buscaron en la base de datos HUMAN SwissProt. Para el análisis de presencia/ausencia se realizó un análisis sin marcador con PEAKS 7.0 (<http://www.bioinform.com/>). Para la búsqueda en la base de datos, se buscaron archivos RAW en la base de datos Human Uniprot que contenía 37254 entradas. Para los parámetros de búsqueda, la tolerancia de error del precursor se fijó en 10 ppm y para los fragmentos de MS2 la tolerancia fue de 0,01 Da. Se permitió un máximo de 2 escisiones erróneas para la tripsina. La carbamidometilación (C), la desamidación (NQ) y las oxidaciones (M) fueron modificaciones variables. Sólo se consideraron los péptidos con tasas de descubrimiento falso (FDR) inferiores al 1 %. Para la validación de biomarcadores potenciales, los resultados de PEAKS se cargaron en el software de proteoma Scaffold (<http://www.proteomesoftware.com/>).

El análisis estadístico de la fase de descubrimiento se realizó para obtener dos resultados diferentes: (1) datos cualitativos que consisten en proteínas que estaban presentes o ausentes en los diferentes subgrupos de pacientes;

y (2) datos cuantitativos que consisten en las medidas de expresión obtenidas de las razones SILAC que representan la abundancia relativa de cada proteína frente a los patrones internos.

Para los datos cualitativos, se aplicó una prueba exacta de Fisher a cada proteína para comparar la presencia/ausencia entre grupos (valor de $p < 0,001$). Para los datos cuantitativos, se realizó una prueba de la t de Student entre cada par de grupos para seleccionar proteínas expresadas diferencialmente. La prueba se realizó sólo para aquellas proteínas que estaban presentes en más de 4 individuos por grupo. Para abordar el problema de las comparaciones múltiples derivadas de realizar muchas pruebas (una por proteína), los valores de p se ajustaron para obtener un fuerte control sobre FDR usando los métodos de Benjamini y Hockberg (valor de $p_{aj.} < 0,25$ y $FC > 1,3$).

Todos los análisis se realizaron usando el programa estadístico "R" (R versión 3.2, Copyright (C) 2015 The R Foundation for Statistical Computing).

Se seleccionaron un total de 54 proteínas para el experimento objetivo mediante la monitorización de reacciones seleccionadas (SRM) en función de los resultados de la fase de descubrimiento (49), junto con 5 candidatos seleccionados de resultados anteriores del grupo del presente estudio. Se seleccionaron dos péptidos únicos por proteína para monitorizarse mediante SRM en función de su detectabilidad en experimentos espectrométricos de masas anteriores. Para cada péptido seleccionado, se adquirió una versión marcada isotópicamente ($^{15}\text{N}_2$, $^{13}\text{C}_6$ -lisina, $^{15}\text{N}_4$, $^{13}\text{C}_6$ -arginina) y se realizó una adición conocida en cada muestra que va a usarse como patrón interno. Se realizó una adición conocida de los patrones internos en una concentración dentro del intervalo de respuesta lineal, que se estableció para cada péptido individual en función de las curvas de dilución experimentales (datos no mostrados). Paralelamente, los péptidos marcados isotópicamente se mezclaron y se usaron para generar una biblioteca espectral de MS2 y una base de datos de conocimiento del tiempo de retención.

Se midió un total de 85 péptidos endógenos y sus patrones internos correspondientes mediante SRM en Lys-C y muestras digeridas con tripsina de una cohorte independiente de 107 pacientes. Las cinco transiciones más intensas por péptido se monitorizaron en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (5500 Q-Trap, AB Sciex Instruments, Foster, CA, EE. UU.) equipado con una columna de 25 cm de cromatografía de fase inversa con un diámetro interno de 75 μM , empaquetado con partículas C18 1,9 μM (NikkyoTechnos Co., Ltd. Japón) y una precolumna de 2 cm (Acclaim PepMap 100, C18, 15 μM , 100A). Tampón de carga: H_2O con ácido fórmico al 0,1 %; tampón de elución: ACN, ácido fórmico al 0,1 %. La velocidad de flujo usada fue de 250 nl/min y se usó un gradiente cromatográfico que oscilaba desde el 5 hasta el 40 % de tampón de elución en 40 min. Se realizaron análisis en blanco entre las mediciones de SRM de muestras biológicas para evitar el arrastre de muestras. Las mediciones se realizaron en modo SRM programado, usando una ventana de 300 segundos y un tiempo de ciclo objetivo de 1,5 segundos.

Para el análisis de datos de la fase de verificación, los grupos de transición correspondientes a los péptidos objetivo se evaluaron con Skyline v2.5 en función de la coelución de las trazas de transición asociadas con un péptido objetivo, tanto en su forma ligera como pesada; la correlación entre las intensidades relativas de SRM ligero y el homólogo pesado. Todos los picos de péptidos se inspeccionaron visualmente. Las áreas de todas las transiciones se usaron como entrada para el modelo lineal de efectos mixtos implementado en el complemento MSstats Skyline (v3.3) para calcular los cambios de pliegue de proteínas y los valores de p ajustados entre los diferentes grupos de muestras.

Para el desarrollo de predictores, se usó MSstats para estimar la cantidad de proteínas presentes en todas las muestras en función de las áreas de transición transformadas en \log_2 , que luego se utilizaron como variables de entrada para un modelo de regresión logística entre grupos definidos. La capacidad de clasificación de cada proteína se evaluó dentro de los 2/3 del conjunto de datos usando el área bajo la curva (AUC) como indicador de rendimiento. La proteína más discriminadora se seleccionó como el primer clasificador. La mayoría de las proteínas discriminatorias se añadieron repetidamente mientras aumentaban los valores de AUC ($\text{deltaAUC} > 0,02$). El procedimiento de evaluación de la clasificación se repitió 500 veces usando un subconjunto diferente de pacientes en cada iteración. Los subconjuntos de muestra se generaron seleccionando aleatoriamente pacientes de la cohorte original sin reemplazo y equilibrados para cada subgrupo de muestra. Un modelo de consenso final estuvo compuesto por la combinación de proteínas, que se seleccionaron más en 500 repeticiones. El modelo final se ajustó al conjunto de datos completo y la precisión predictiva se cuantificó usando el área bajo la curva ROC, la sensibilidad, la especificidad y la precisión. El paquete pROC para el programa estadístico "R" se usó para dibujar ROC, calcular AUC y otros valores de rendimiento (es decir, sensibilidad, especificidad y precisión); estos se obtuvieron considerando el "punto de corte óptimo" como el punto donde la suma de sensibilidades y especificidades alcanzaba el valor máximo.

2. Resultados

2.1. Fase de descubrimiento

Para la fase de descubrimiento de este proyecto, se usaron aspirados uterinos de 10 pacientes CEE (también

abreviado CE1), 10 pacientes CENE (también abreviado CE2, y que eran particularmente CES) y 10 pacientes de control (N = 30) para aislar los ELV.

5 Una vez asegurada la pureza de las vesículas aisladas, se realizó una adición conocida de la misma cantidad de mezcla Super-SILAC (patrón interno) en cada una de las 30 muestras (CEE n=10, CENE n=10 y CTRL n=10) en una razón pesado/ligero 2:1, justo antes de la separación por 1D-SDS-PAGE. Cada carril de gel se cortó en 10 bandas, y cada banda se sometió a digestión con tripsina para extraer péptidos, lo que dio como resultado 300 ciclos de CL-EM/EM individuales. La búsqueda en la base de datos de proteínas de los datos de EM/EM dio como resultado la identificación general de 2138 proteínas, considerando sólo aquellas proteínas identificadas con al menos 1 péptido
10 único y aquellos péptidos con una tasa de descubrimiento falso (FDR) inferior al 1 %. Los espectros de EM/EM se procesaron adicionalmente con el software MaxQuant, lo que condujo a la cuantificación de 920 proteínas, es decir, una tasa de cuantificación general del 43 % del proteoma identificado.

15 Un total de 152 proteínas se expresaron diferencialmente con un valor de p ajustado < 0,25 y un cambio en veces inferior a -1,3 o superior a 1,3. De ellos, 147 proteínas eran biomarcadores de diagnóstico potenciales (diferencial de la comparación CTRL frente a CE) y 28 proteínas eran biomarcadores de pronóstico potenciales (diferencial de la comparación CEE frente a CENE). Paralelamente al análisis cuantitativo, se llevó a cabo un estudio de presencia/ausencia para tener en cuenta las proteínas que no se cuantificaron porque carecían del homólogo pesado pero que aún eran relevantes por estar presentes en un grupo determinado. Para ello, volvieron a analizarse
20 los archivos RAW con el software PEAKS y se realizó una prueba de Fisher para seleccionar aquellas proteínas significativamente presentes en un grupo (valor de p < 0,001). Después de este análisis se incluyeron un total de 30 candidatos, correspondientes a 29 biomarcadores de diagnóstico potenciales y 9 biomarcadores de pronóstico potenciales.

25 En total, se generó una lista final de 54 candidatos combinando (i) el análisis de cuantificación relativa, (ii) el estudio de presencia/ausencia y (iii) criterios biológicos tales como la exclusión de proteínas cuya familia estaba sobrerrepresentada en la lista de candidatos, o proteínas reguladas por disminución en el cáncer; siempre respetando las restricciones estadísticas expuestas anteriormente. De esos 54 biomarcadores candidatos, 50 correspondían a biomarcadores de diagnóstico y 15 a biomarcadores de pronóstico, de los cuales 37 tenían sólo
30 potencial diagnóstico, 2 sólo potencial pronóstico y 13 tenían tanto potencial diagnóstico como pronóstico.

2.2. Verificación de biomarcadores de proteínas en los ELV de los AU

35 Una vez obtenida la lista de 54 candidatos descrita en la sección anterior, se pretendía comprobar el potencial de dichos candidatos mediante el uso de LC-SRM en una nueva y mayor cohorte de pacientes. Al igual que en el estudio de la fase de descubrimiento, la fracción de ELV de los AU fue la muestra de análisis seleccionada. Además de evaluar el potencial individual de cada marcador para diagnosticar CE y diferenciar entre subtipos histológicos, aquí también se buscó generar modelos diagnósticos y pronósticos combinando diferentes candidatos. Además, se evaluó el poder de clasificación de cada candidato en toda la fracción fluida de AU en una cohorte independiente.

40 Se reclutaron un total de 107 pacientes para la fase de verificación (cohorte B), divididos en tres grupos: CEE o CE1 (n=45), CENE o CE2 (n=21) y CTRL (n=41). Específicamente, CENE correspondía a pacientes con diagnóstico de cáncer de endometrio seroso (CES). A partir de ellos, se aislaron y caracterizaron los ELV de los AU tal como se observó en las secciones anteriores (datos no mostrados). La lista de 54 biomarcadores de proteínas candidatas generadas en la fase de descubrimiento se verificó mediante LC-SRM. Para ello, se seleccionaron dos péptidos
45 trípticos únicos por proteína, de los cuales finalmente se monitorizaron mediante SRM programado un total de 85 péptidos endógenos. Sin embargo, sólo se detectaron 69 de los 85 péptidos correspondientes a 51 proteínas; tres de los candidatos (TNR6, CLH1 y PSB3) no fueron detectados en ninguna de las muestras. Como resultado de este experimento de SRM, se observó que 43 de los 48 (89,6 %) biomarcadores de diagnóstico potenciales (es decir, se observaron diferencias significativas en la abundancia entre CTRL y CE) también fueron significativos en esta fase
50 de verificación (valor de p aj. < 0,01), confirmando así su potencial como biomarcadores de diagnóstico individuales. Un total de 29 de las 45 proteínas cuantificadas presentaron alta precisión para discriminar individualmente entre casos de CE y CTRL. Los 5 biomarcadores individuales más significativos fueron agrina (AUC= 0,90, IC95: 0,85-0,96), TACD2 (AUC= 0,87, IC95: 0,81-0,94), SORT (AUC=0,86, IC95: 0,79-0,93), MVP (AUC= 0,86, IC95: 0,78-0,93)
55 y FAS (AUC= 0,85, IC95: 0,78-0,92). La tabla 2.1 a continuación muestra la lista de biomarcadores seleccionados para el diagnóstico de CE en ELV.

60 Con respecto a los posibles biomarcadores de pronóstico (es decir, la comparación de CE1 (CEE) frente a CE2 (CENE)), sólo se encontró que 5 proteínas de los 15 candidatos se expresaron de forma diferencial en la fase de verificación (valor de p aj. < 0,01). Los biomarcadores verificados fueron CLD6, IF2B3, BCAM, PLD3 y MX1. Un total de 4 de las 45 proteínas cuantificadas presentaron alta precisión para discriminar individualmente entre casos de CE1 y CE2 con valores de AUC superiores a 0,75: CLD6 (AUC= 0,88, IC95: 0,76-1,00), BCAM (AUC= 0,87, IC95: 0,76-0,97), IF2B3 (AUC=0,80, IC95: 0,68-0,93) y PLD3 (AUC= 0,79, IC95: 0,66-0,93). La tabla 2.2 a continuación muestra la lista de biomarcadores seleccionados para el pronóstico de CE en los ELV.

65 2.3. Verificación de candidatos mediante proteómica dirigida en el fluido total de AU

5 Para comprender si sería factible trasladar el uso de estos biomarcadores a una muestra de más fácil acceso y que no requiriera el aislamiento de las vesículas extracelulares, se tuvo como objetivo estudiar los biomarcadores identificados en exosomas en la fracción fluida total de AU. Para ello, se seleccionaron un total de 67 pacientes (cohorte C) y se dividieron en tres grupos: CEE (n=22), CENE (n=20) y CTRL (n=25).

10 Para esta parte del estudio, se analizaron un total de 51 proteínas. Se seleccionaron dos péptidos trípticos únicos por proteína, de los cuales finalmente se monitorizaron un total de 75 péptidos endógenos mediante SRM programado. Sólo se detectaron un total de 37 proteínas y posteriormente se cuantificaron para la estimación del AUC.

15 Los resultados obtenidos en este estudio de verificación se evaluaron en comparación con el realizado anteriormente, con el fin de comprender la viabilidad de traducir los biomarcadores basados en ELV al fluido total de AU. En primer lugar, se observó que la detectabilidad de los biomarcadores de ELV en el fluido total de AU era muy limitada en comparación con la detectabilidad cuando se analizaban ELV; de los 51 biomarcadores detectados en ELV, sólo 34 (66,7 %) se detectaron en los AU.

20 En la siguiente tabla 1.1 y tabla 1.2, se muestra la lista de biomarcadores significativos para el diagnóstico de CE en fracción líquida total de AU, y para el pronóstico de CE (comparación entre CEE y CENE) en dicha fracción líquida total de AU.

Tabla 1.1. Biomarcadores de diagnóstico en aspirados uterinos

Biomarcadores de diagnóstico en aspirados uterinos										
Proteína	log2FC	FC	SE	valor de T	DF	valor de p	valor de p aj.	AUC	IC95 %	
sp P14780 MMP9_HUMANA	-2,76	0,15	0,37	-7,44	64	3,12E-10	1,15E-08	0,914	0,843	0,985
sp O00468 AGRINA_HUMANA	-1,43	0,37	0,21	-6,83	64	3,63E-09	6,72E-08	0,864	0,772	0,956
sp Q14764 MVP_HUMANA	-1,41	0,38	0,21	-6,63	64	8,23E-09	1,01E-07	0,884	0,805	0,962
sp Q9BV40 VAMP8_HUMANA	-1,00	0,50	0,18	-5,57	64	5,51E-07	5,10E-06	0,855	0,766	0,944
sp P41252 SYIC_HUMANA	-1,55	0,34	0,29	-5,40	64	1,05E-06	7,76E-06	0,854	0,762	0,947
sp P61006 RAB8A_HUMANA	-1,11	0,46	0,21	-5,23	64	1,96E-06	1,21E-05	0,836	0,737	0,936
sp P20591 MX1_HUMANA	-1,48	0,36	0,30	-4,98	64	5,09E-06	2,69E-05	0,859	0,770	0,948
sp Q14974 IMB1_HUMANA	-1,68	0,31	0,35	-4,81	64	9,39E-06	4,34E-05	0,849	0,756	0,941
sp O00299 CLIC1_HUMANA	-1,38	0,38	0,29	-4,78	64	1,07E-05	4,40E-05	0,832	0,736	0,929
sp P62318 SMD3_HUMANA	-1,11	0,46	0,24	-4,72	64	1,31E-05	4,86E-05	0,792	0,683	0,902
sp Q12905 ILF2_HUMANA	-0,98	0,51	0,21	-4,56	64	2,39E-05	8,03E-05	0,838	0,737	0,939
sp P55072 TERA_HUMANA	-0,77	0,59	0,17	-4,41	64	4,09E-05	1,26E-04	0,789	0,682	0,895
sp P62913 RL11_HUMANA	-1,15	0,45	0,28	-4,16	64	9,62E-05	2,74E-04	0,768	0,653	0,882
sp P50895 BCAM_HUMANA	-0,79	0,58	0,19	-4,11	64	1,15E-04	3,04E-04	0,773	0,664	0,882
sp P07355 ANXA2_HUMANA	-1,15	0,45	0,28	-4,04	64	1,48E-04	3,41E-04	0,759	0,642	0,876
sp Q01650 LAT1_HUMANA	-0,87	0,55	0,22	-4,05	64	1,43E-04	3,41E-04	0,827	0,718	0,936
sp Q9Y265 RUVB1_HUMANA	-1,13	0,46	0,28	-4,02	64	1,58E-04	3,45E-04	0,796	0,691	0,901
sp Q9H299 SH3L3_HUMANA	-0,83	0,56	0,21	-3,95	64	2,00E-04	4,11E-04	0,774	0,663	0,885
sp P40429 RPL13A_HUMANA	-1,33	0,40	0,35	-3,80	64	3,26E-04	6,35E-04	0,790	0,674	0,905
sp P62249 RS16_HUMANA	-1,24	0,42	0,33	-3,69	64	4,59E-04	8,50E-04	0,693	0,562	0,825
sp P08865 RSSA_HUMANA	-1,01	0,50	0,28	-3,59	64	6,40E-04	1,13E-03	0,782	0,670	0,894
sp P30050 RL12_HUMANA	-1,18	0,44	0,33	-3,57	64	6,76E-04	1,14E-03	0,779	0,670	0,889
sp P07237 PDIA1_HUMANA	-0,68	0,62	0,19	-3,55	64	7,25E-04	1,17E-03	0,795	0,689	0,901
sp P47914 RL29_HUMANA	-1,07	0,48	0,30	-3,53	64	7,76E-04	1,20E-03	0,761	0,643	0,879
sp P62937 PPIA_HUMANA	-0,98	0,51	0,32	-3,03	64	3,56E-03	5,26E-03	0,741	0,625	0,857
sp O95994 AGR2_HUMANA	-0,93	0,52	0,33	-2,83	64	6,14E-03	8,74E-03	0,703	0,580	0,826
sp P14618 KPYP_HUMANA	-1,04	0,49	0,37	-2,82	64	6,45E-03	8,84E-03	0,798	0,692	0,904

Tabla 1.2. Biomarcadores de pronóstico en aspirados uterinos

Biomarcadores de pronóstico en aspirados uterinos									
Proteína	log2FC	SE	valor de T	DF	valor de p	valor de p aj.	AUC	IC95 %	
sp P01833 PIGR_HUMANA	-3,18	0,58	-5,43	64,00	0	3,38E-05	8,80E-01	0,769	0,991
sp O95994 AGR2_HUMANA	-1,72	0,35	-4,95	64,00	0	1,06E-04	8,30E-01	0,709	0,950
sp P50895 BCAM_HUMANA	0,91	0,21	4,43	64,00	0	4,58E-04	1,66E-01	0,042	0,290
sp O00592 PODXL_HUMANA	-1,86	0,46	-4,08	64,00	0	1,18E-03	8,43E-01	0,721	0,965
sp P14780 MMP9_HUMANA	-1,59	0,43	-3,69	64,00	0	3,41E-03	8,02E-01	0,665	0,940
sp P13987 CD59_HUMANA	-0,94	0,28	-3,32	64,00	0	9,17E-03	8,05E-01	0,660	0,949

Tabla 2.1. Biomarcadores de diagnóstico en fracción que contiene exosomas (ELV) aislada de AU:

Nombre de entrada	Número UniProt	FC	log2FC	valor de p aj.	AUC	IC95 %
AGRINA_HUMANA	O00468	4,46	2,16	1,25E-13	0,90	0,85 - 0,96
MVP_HUMANA	Q14764	7,50	2,91	3,01E-10	0,86	0,78 - 0,93
TACD2_HUMANA	P09758	4,76	2,25	3,01E-10	0,87	0,81 - 0,94
FAS_HUMANA	P49327	4,90	2,29	4,30E-10	0,85	0,78 - 0,92
SYIC_HUMANA	P41252	9,74	3,28	1,20E-09	0,84	0,77 - 0,91
VAMP8_HUMANA	Q9BV40	4,17	2,06	1,57E-09	0,84	0,76-0,92
SORT_HUMANA	Q99523	3,10	1,63	1,57E-09	0,86	0,79-0,93
LAT1_HUMANA	Q01650	5,65	2,50	4,51E-09	0,84	0,76 - 0,91
TERA_HUMANA	P55072	4,93	2,30	9,49E-09	0,82	0,74 - 0,90
RUVB1_HUMANA	Q9Y265	4,76	2,25	9,49E-09	0,82	0,74 - 0,90
RSSA_HUMANA	P08865	3,63	1,86	9,49E-09	0,82	0,74 - 0,90
SMD3_HUMANA	P62398	4,38	2,13	1,09E-08	0,82	0,75 - 0,90
ADA10_HUMANA	O14672	2,44	1,29	2,21E-08	0,80	0,71-0,89
RPL13A_HUMANA	P40429	10,98	3,46	3,01E-08	0,80	0,72 - 0,88
PGBM_HUMANA	P98160	3,95	1,98	3,05E-08	n.c.	n.c.
RL11_HUMANA	P62913	8,32	3,06	3,53E-08	0,80	0,71 - 0,88
IMB1_HUMANA	Q14974	3,27	1,71	3,53E-08	0,80	0,71 - 0,89
AGR2_HUMANA	O95994	5,84	2,55	5,10E-08	0,79	0,69 - 0,88
ITA3_HUMANA	P26006	2,26	1,18	5,10E-08	0,81	0,73 - 0,89
RUXE_HUMANA	P62304	3,03	1,60	7,34E-08	0,78	0,70 - 0,87
RL12_HUMANA	P30050	9,82	3,30	7,80E-08	0,79	0,71 - 0,88
RS16_HUMANA	P62249	9,04	3,18	1,36E-07	0,79	0,71 - 0,87
PSMD2_HUMANA	Q13200	5,09	2,35	3,02E-07	0,79	0,70 - 0,87
MX1_HUMANA	P20591	3,94	1,98	3,77E-07	0,81	0,73 - 0,89
VPS35_HUMANA	Q96QK1	2,00	1,00	7,86E-07	0,78	0,69 - 0,87
ILF2_HUMANA	Q12905	3,2Q	1,68	8,51E-07	0,79	0,70 - 0,88
PDIA1_HUMANA	P07237	2,65	1,41	9,50E-07	0,77	0,68 - 0,86
MMP9_HUMANA	P14780	1,97	0,98	7,67E-06	0,79	0,70 - 0,88
ANXA4_HUMANA	P09525	3,58	1,84	1,20E-05	0,72	0,61 - 0,82

RAB8A_HUMANA	P61006	3,18	1,67	1,20E-05	0,73	0,62 - 0,84
SH3L3_HUMANA	Q9H299	2,32	1,22	1,28E-05	0,72	0,62 - 0,83
RL29_HUMANA	P47914	7,00	2,81	1,55E-05	0,74	0,64 - 0,83
PLD3_HUMANA	Q8IV08	1,74	0,80	1,82E-05	0,75	0,65 - 0,85
PPIA_HUMANA	P62937	3,86	1,95	2,86E-05	0,71	0,60 - 0,82
ANXA2_HUMANA	P07355	3,49	1,80	3,66E-05	0,70	0,59 - 0,81
S10AC_HUMANA	P80571	7,75	2,95	5,40E-05	n.c.	n.c.
CD14_HUMANA	P08571	3,89	1,96	6,48E-05	n.c.	n.c.
SSRA_HUMANA	P43307	3,05	1,61	6,67E-05	0,72	0,61-0,82
LAMP2_HUMANA	P13473	2,16	1,11	7,78E-05	0,72	0,62 - 0,83
PODXL_HUMAN	O00592	2,86	1,52	2,61E-04	0,71	0,61 - 0,81
CLD6_HUMANA	P56747	1,83	0,87	2,61E-04	0,67	0,57 - 0,77
IF2B3_HUMANA	O00425	1,97	0,98	4,27E-04	0,77	0,68 - 0,86
CD59_HUMANA	P13987	2,80	1,49	6,17E-04	0,64	0,52 - 0,76
MLEC_HUMANA	Q14165	2,05	1,04	2,55E-03	0,68	0,57 -0,78
H10_HUMANA	P07305	1,65	0,72	6,93E-03	n.c.	n.c.
CD166_HUMANA	Q13740	1,59	0,67	9,42E-03	0,66	0,55 - 0,77
CD81_HUMANA	P60033	2,01	1,00	1,15E-02	0,63	0,51 - 0,75
AR6P1_HUMANA	Q15041	2,47	1,31	3,43E-02	n.c.	n.c.
BCAM_HUMANA	P50895	1,24	0,31	3,78E-02	0,63	0,52 - 0,74
VAC14_HUMANA	Q08AM6	1,61	0,68	5,29E-02	n.c.	n.c.
ITB3_HUMANA	P05106	1,33	0,41	5,61E-02	0,61	0,50 - 0,73

Tabla 2.2. Biomarcadores para el pronóstico de CE en ELV.

Nombre de entrada	Número UniProt	FC	log2FC	valor de p aj.	AUC	IC95 %
CLD6_HUMANA	P56747	4,06	2,02	9,63E-13	0,88	0,76 - 1,00
BCAM_HUMANA (*)	P50895	2,12	1,08	4,60E-08	0,87	0,76 - 0,97
IF2B3_HUMANA	O00425	3,27	1,71	5,28E-06	0,80	0,68 - 0,93
PLD3_HUMANA	Q8IV08	2,01	1,01	6,72E-05	0,79	0,66 - 0,93
MX1_HUMANA	P20591	3,49	1,80	7,91E-04	0,74	0,61 - 0,87

5 Lista de referencias

- DeSouza LV, *et al.*, “Endometrial cancer biomarker discovery and verification using differentially tagged clinical samples with multidimensional liquid chromatography and tandem mass spectrometry”, *Mol Cell Proteomics MCP-* 2007, vol. no.6, págs.: 1170-8.
- Kemik P, *et al.* “Diagnostic and prognostic values of preoperative serum levels of YKL-40, HE-4 and DKK-3 in endometrial cancer”, *Gynecol Oncol-* 2016; n.º de vol. 140, págs.:64-9.
- Martinez-Garcia E, *et al.* “Development of a sequential workflow based on LC-PRM for the verification of endometrial cancer protein biomarkers in uterine aspirate samples”, *Oncotarget* -2016, n.º de vol. 7(33), págs.: 53102-53114.
- Robin *et al.*, “pROC: and open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves”, *BMC Bioinformatics*-2011, n.º de vol. 12:77.
- Mota *et al.*, “Genetic analysis of uterine aspirates improves the diagnostic value and captures the intra-tumor heterogeneity of endometrial cancers”, *Modern Pathology*-2016, vol. 30, n.º 1, págs.: 134-145.

5

- Cabrera *et al.*, “Targeted proteomics identifies proteomic signatures in liquid-biopsies of the endometrium to diagnose endometrial cancer and assist the prediction of the optimal surgical treatment”, *International Journal of Gynecological Cancer*-2017, vol. 27, suplemento n.º 4, págs.: 340-340.
- Chakraborty *et al.*, “An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma”, *Nature Communications*-2015, vol. 6, página 6184.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de diagnóstico de cáncer de endometrio, comprendiendo el método determinar el nivel de expresión de agrina en una muestra de fluido uterino del aparato genital femenino.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de fluido uterino es una muestra de fluido de aspirado uterino del aparato genital femenino.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la muestra de fluido uterino es una fracción que contiene exosomas aislada de un aspirado uterino.
- 20 4. Método según la reivindicación 3, que comprende determinar en una fracción que contiene exosomas aislada de un aspirado uterino el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; y agrina, BCAM.
- 25 5. Método según la reivindicación 2, que comprende determinar en un aspirado uterino el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, MMP9, PODXL; y agrina, MMP9.
- 30 6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además determinar el nivel de expresión de una o más proteínas seleccionadas de PERM, OSTP, CTNB1, CAYP1, XPO2, NGAL, SG2A1, CADH1, SPIT1, MMP9, NAMPT, LDHA, CASP3, PRDX1, MIF, K2C8, CAPG, MUC1, ANXA1, HSPB1, PIGR, CH10, CD44, CLIC1, TPIS, GSTP1, GTR1, ENOA, PDIA1, KPYM, ANXA2 y FABP5.
- 35 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende determinar el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; y agrina, MMP9, en una fracción que contiene exosomas aislada de AU; y determinar el nivel de expresión de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: MMP9, PODXL, RAB8A; MMP9, PODXL, RSSA; agrina, MMP9, PODXL; MMP9, PODXL, VAMP8; MMP9, MX1; MMP9, RSSA; MMP9, MVP; MMP9, RAB8A; MMP9, VAMP8; BCAM, MMP9; MMP9, agrina en un aspirado uterino.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el nivel de expresión se determina a nivel de proteína.
- 45 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el nivel de proteína se determina mediante un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquímica, espectrometría de masas y combinaciones de los mismos.
- 50 10. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que se lleva a cabo mediante un kit que comprende un soporte sólido y medios para detectar el nivel de expresión de agrina.
- 55 11. Kit que comprende un soporte sólido y medios para detectar el nivel de expresión de agrina y medios para detectar el nivel de expresión de las proteínas de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en agrina, CD81, TERA; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; agrina, BCAM; agrina, MMP9, PODXL; agrina, MMP9; y agrina, MMP9, PIGR, en el que los medios son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana.
- 60 12. Kit según la reivindicación 11, en el que los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para detectar el nivel de expresión de las proteínas son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para llevar a cabo un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo electroquímico y combinaciones de los mismos.
- 65 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende:
 - a) determinar, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina, en una muestra de fluido uterino del sujeto femenino;
 - b) determinar opcionalmente, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina, en una fracción que contiene exosomas aislada de fluido uterino; y
 - c) comparar el nivel de la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) con un nivel de control de referencia,

en el que si el nivel determinado en la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto es sospechoso de padecer carcinoma de endometrio.

- 5 14. Método para decidir o recomendar si iniciar un régimen médico de un sujeto sospechoso de padecer carcinoma de endometrio, método que comprende las etapas de:
- 10 a) determinar, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina en una muestra de fluido uterino del sujeto femenino;
- b) determinar opcionalmente, *in vitro*, el nivel de expresión de agrina en una fracción que contiene exosomas aislada de fluido uterino; y
- 15 c) comparar el nivel de la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) con un nivel de control de referencia, en el que si el nivel determinado en la etapa (a) y opcionalmente el de la etapa (b) es mayor que el nivel de control de referencia, es indicativo de que el sujeto es sospechoso de padecer carcinoma de endometrio
- en el que:
- 20 i) si al sujeto se le diagnostica que padece carcinoma de endometrio, o se sospecha que padece carcinoma de endometrio, entonces se recomienda el inicio del régimen médico, y
- ii) si a la paciente se le diagnostica que no padece carcinoma de endometrio, el seguimiento se realiza opcionalmente en consideración del resultado de un examen de la paciente por un médico.
- 25 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que después de la determinación del nivel de expresión de agrina, y las proteínas de los conjuntos de proteínas para el diagnóstico de CE, se llevan a cabo las siguientes etapas implementadas por ordenador: a dicho(s) nivel(es) se le(s) da un valor y/o una puntuación y, opcionalmente, se calcula(n) en una fórmula matemática para obtener un valor calculado; en el que en función de dicho(s) nivel(es), puntuación/puntuaciones y/o valor(es) calculado(s), se decide entre las opciones de padecer o no CE.
- 30 16. Uso de un kit que comprende un soporte sólido y medios para detectar el nivel de expresión de agrina y, opcionalmente, medios para detectar el nivel de expresión de las proteínas de al menos un conjunto de proteínas seleccionadas del grupo que consiste en agrina, CD81, TERA ; agrina, CD59, MVP; AGR2, agrina, CD81; agrina, CD166, MVP; agrina, CD81; agrina, CD166; agrina, CD59; agrina, MMP9; agrina, BCAM; agrina, MMP9, PODXL; agrina, MMP9; y agrina, MMP9, PIGR, para el diagnóstico de cáncer de endometrio, en el que los medios son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana.
- 35 17. Uso del kit según la reivindicación 16, en el que los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para detectar el nivel de expresión de las proteínas son anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de unirse a la(s) proteína(s) diana para llevar a cabo un ensayo o tecnología seleccionado del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo de bioluminiscencia, un ensayo de fluorescencia, un ensayo de quimioluminiscencia, un ensayo de electroquímica y combinaciones de los mismos.
- 40
- 45

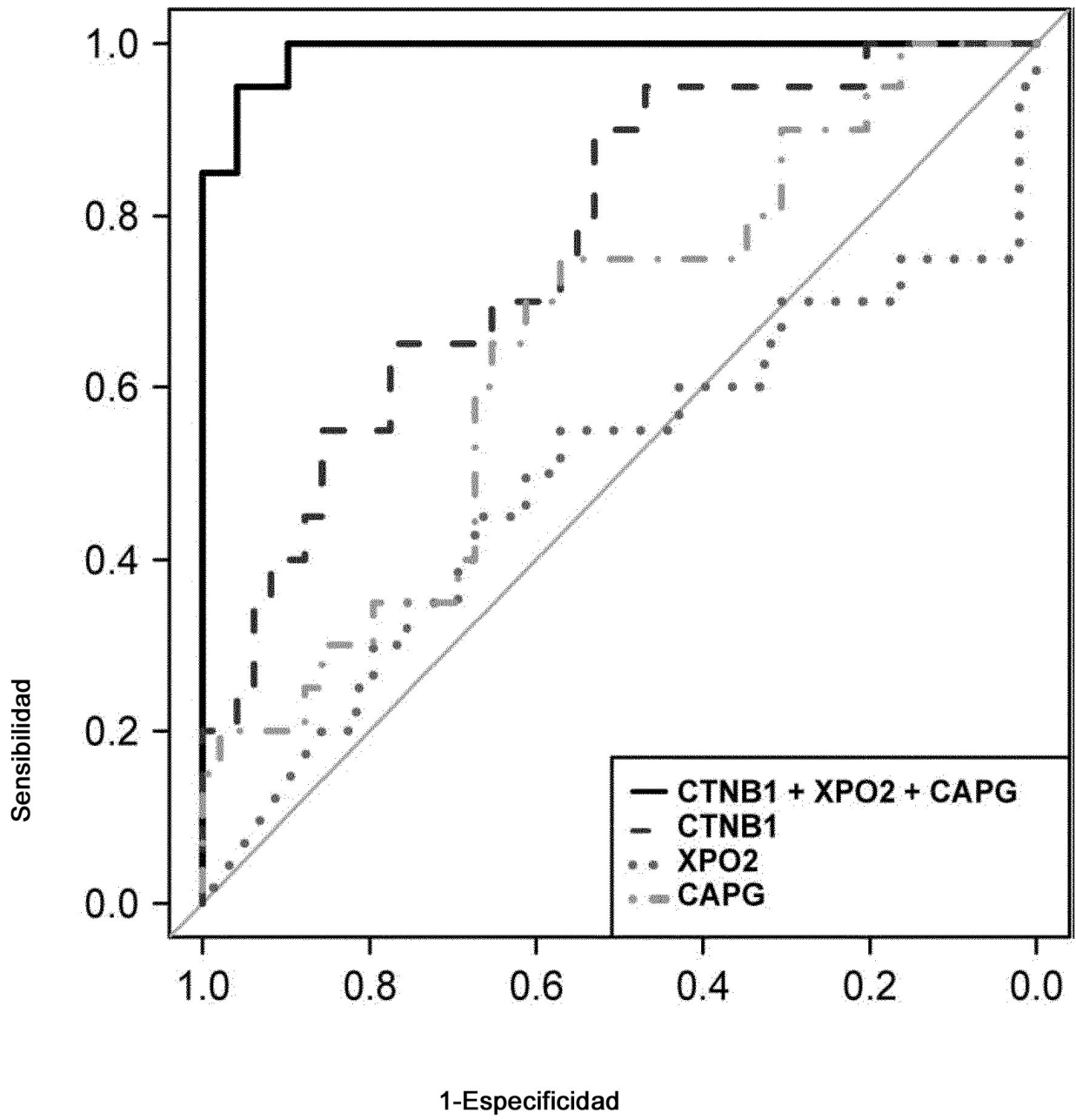


FIG. 1