



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 323 429**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05820046 .0**

96 Fecha de presentación : **22.12.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1831696**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.09.2007**

54 Título: **Uso de la ASC, como marcador para cáncer colorrectal.**

30 Prioridad: **23.12.2004 EP 04030619**
20.04.2005 EP 05008660

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.07.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.07.2009

73 Titular/es: **F. Hoffmann-La Roche AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Andres, Herbert;**
Hagmann, Marie-Luise;
Karl, Johann;
Kunert, Ursula y
Pestlin, Gabriele

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 323 429 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de la ASC, como marcador para cáncer colorrectal.

5 La presente invención, se refiere a la diagnosis del cáncer colorrectal. Ésta da a conocer el uso de proteína semejante al moteado asociado a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a la caspasa (= ASC-[del inglés, apoptosis-associate speck-like protein (containing a caspase-associated recruitment domain)]-), en la diagnosis de cáncer colorrectal. Adicionalmente, además, ésta se refiere a un procedimiento para la diagnosis de un cáncer colorrectal, a partir de una muestra líquida, derivada de un individuo, procediendo a medir la ASC en la citada muestra.
10 Las mediciones de la ASC, pueden utilizarse, por ejemplo, en la detección temprana de cáncer colorrectal o en la vigilancia de pacientes que experimentan cirugía.

15 El cáncer, permanece como un desafío mayor de la salud pública, a pesar del progreso en la detección y la terapia. Entre los varios tipos de cáncer, el cáncer colorrectal (= CRC), es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo occidental.

El cáncer colorrectal, progresa, de la forma más frecuente, desde adenomas (pólipos) a carcinomas malignos. Las diferentes etapas de CRC, se clasifican, usualmente, según las etapas de Duke A a D.

20 La clasificación del cáncer en etapas, es la clasificación de la enfermedad, en términos de extensión, progresión, y gravedad. Ésta representa un sistema de clasificación mediante etapas, uniforme, internacionalmente aceptado. Existen tres variedades básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estatus de los ganglios linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis distante). Los criterios TNM, están publicados por parte de la UICC (Internacional Union Against Cancer-[Unión Internacional contra el cáncer]-), edición 1997 (Sobin, L.H., y Fleming, I.D. TNM 80 (1997), 1803-4).

25 Lo que esencialmente importante, es que, la diagnosis temprana del CRC, se traduce en una prognosis mucho mejor. Los tumores malignos del cáncer colorrectal, aparecen a partir de tumores benignos, por ejemplo, a partir de adenomas. Así, por lo tanto, la mejor prognosis, la tienen aquellos pacientes diagnosticados en la etapa de adenoma. Los pacientes diagnosticados en una etapa tan temprana como la correspondiente a la etapa T_{is}, N0, ó T1-3; N0, M0, si se tratan adecuadamente, tienen una esperanza de supervivencia del 90%, 5 años después de la diagnosis, si se compara a la tasa de supervivencia de únicamente un 10%, para pacientes diagnosticados cuando la metástasis distante se encuentra presente.

35 En el sentido de la presente invención, la diagnosis temprana del CRC, se refiere a la diagnosis en un estado pre-maligno (adenoma) o en una etapa tumoral en donde no existe metástasis en absoluto (ni próxima ni distal), es decir, adenoma, T_{is}, N0, M0 ó T1-4; N0; M0. T_{is}, significa carcinoma *in situ*.

40 Se prefiere adicionalmente el hecho de que, el CRC, se diagnostique cuando éste no haya todavía crecido completamente a través de la pared intestino y, así de este modo, no se haya perforado ni el peritoneo visceral ni tampoco se encuentran invadidos otros órganos o estructuras, es decir, que la diagnosis, se realice en la etapa T_{is}, N0, M0 ó T1-3; N0; M0(= T_{is}-3; N0; M0).

45 Cuanto antes pueda detectarse/diagnosticarse el cáncer, mejor es la tasa de supervivencia total. Esto es especialmente cierto, para el CRC. La prognosis, en etapas avanzadas del tumor, es pobre. Más de un tercio de los pacientes, morirán progresivamente dentro de los cinco años después de la diagnosis, correspondiendo, la tasa de supervivencia, a aproximadamente un 40%, para los cinco años. El tratamiento corriente, cura únicamente a una fracción de los pacientes, y tiene claramente el mejor efecto sobre aquellos pacientes diagnosticados en una etapa temprana de la enfermedad.
50

Con respecto al CRC, como un problema de salud pública, es esencial el hecho de que se desarrollen rastreos efectivos y medidas preventivas para el cáncer colorrectal.

55 Los procedimientos de detección más temprana disponibles en el momento presente, para el cáncer colorrectal, involucran tests de ensayo para la sangre fecal ó procedimientos endoscópicos. No obstante, debe existir un tamaño significativo del tumor, antes de que se detecte sangre fecal. La sensibilidad de los tests de ensayo de sangre oculta basados en guaiac, es de ~26%, lo cual significa el hecho de que, un 74% de los pacientes con lesiones malignas, permanecerán indetectados (Ahlquist, D.A. Gastroenterol, Clin. North Am. 26 (1997) 41-55). La visualización de lesiones precancerosas y cancerosas, representan el mejor procedimiento para la detección temprana, pero, la colonoscopia, es invasiva, con unos significativos costes, riesgos y complicaciones (Silvis, S.E., *et al.*, JAMA 235 (1976) 928-930; Greenen, J.E., *et al.*, Am. J. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F., *et al.*, J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133).

65 Con objeto de ser de utilidad clínica, un nuevo marcador de diagnósticos, como marcador individual, debería ser por lo menos tan bueno como el mejor marcador individual conocido en el arte especializado de la técnica. Ahora bien, un nuevo marcador, debería conducir a un progreso en la sensibilidad y/o especificidad del diagnóstico, tanto si se utiliza individualmente, como si se utiliza en combinación con uno o más marcadores distintos, respectivamente.

ES 2 323 429 T3

La sensibilidad y/o especificidad de diagnóstico de un test de ensayo, se valora, de la mejor forma, mediante sus características operativas de receptor, las cuales se describirán en mayor detalle, abajo, a continuación.

5 La utilidad clínica de marcadores bioquímicos en el cáncer colorrectal, se ha revisado, recientemente, por parte de European Group on Tumor Markers (EGTM-[Grupo Europeo de marcadores tumorales]-) (Duffy, M.J. *et al.*, *Eur. J. Cancer* 39 (2003) 718-727).

10 En la actualidad, se encuentran disponibles tests de ensayo primarios de diagnóstico en la sangre, basados en la detección del antígeno carcinoembrionario, (CEA), una glicoproteína asociada a los tumores, para ayudar en la diagnosis, en el sector del CRC. El CEA, se encuentra incrementado, en un 95% de las muestras de tejido obtenidas de pacientes con cánceres colorrectales, gástricos, o pancreáticos y en la mayoría de carcinomas de pecho, de pulmón y de la cabeza y el cuello (Goldenberg, D.M. *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst. Bethesda*) 57 (1976) 11-22). Se han reportado también niveles elevados del CEA en el suero, especialmente, durante la etapa temprana de la enfermedad (Carriquiry, L.A., y Pineyro, A., *Dis. Colon Rectum* 42 (1999) 921-929; Herrera, M.A., *et al.*, *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J., *et al.*, *N. Eng., J. Med.* 299 (1978) 448-451). La utilidad del CEA, medido en el suero o en el plasma, en la 15 detección de recidivos o repeticiones, se reporta como siendo controversial y debe no obstante aplicarse extensamente (Martell, R.E. *et al.*, *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149; Moertel, C.G., *et al.*, *JAMA* 270 (1993) 943-947).

20 A la luz de los datos disponibles, la determinación del CEA en el suero, no posee ni la sensibilidad ni la especificidad para capacitar su uso, como un ensayo de rastreo para el cáncer colorrectal, en la población asintomática (Reynoso, G. *et al.*, *JAMA* 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., *Clinical Chemistry* 49 (2002) 1151-1159).

25 La sangre entera, el suero o el plasma, son las fuentes de muestras más ampliamente utilizadas, en la rutina clínica. La identificación de un marcador temprano del CRC que ayudaría en la detección fidedigna del cáncer, o que proporcionaría una información temprana del pronóstico, podría conducir a un ensayo de diagnóstico que ayudaría en gran manera en la diagnosis y el manejo del cáncer. Así, por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente, en cuanto al hecho de poder mejorar el enjuiciamiento o valoración *in vitro* del CRC. Es especialmente importante el mejorar la diagnosis temprana del CRC, debido al hecho de que, para los pacientes diagnosticados tempranamente, las posibilidades de supervivencia, son mucho mayores, si se comparan con las de aquéllos diagnosticados en una etapa 30 progresada o avanzada de la enfermedad.

Era una tarea de la presente invención, el investigar el hecho de si, puede identificarse un marcador bioquímico, el cual pueda utilizarse para enjuiciar el CRC.

35 De una forma sorprendente, se ha encontrado el hecho de que, el uso del marcador ASC, puede superar, por lo menos parcialmente, los problemas conocidos en estado actual del arte de la técnica especializada.

40 La presente invención, se refiere, correspondientemente en concordancia, a un procedimiento para valorar el cáncer colorrectal, *in vitro*, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende, a) la medición, en una muestra, de la concentración de ASC, y b) correlacionar la concentración determinada en la etapa (a), a la diagnosis de cáncer colorrectal, en donde, un elevado nivel de ASC, es indicativo para el CRC.

45 Todavía otra forma de presentación preferida de la presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el cáncer colorrectal, *in vitro*, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de ASC y otro u otros marcadores adicionales del cáncer colorrectal, y correlacionar las concentraciones determinadas, a la diagnosis de cáncer colorrectal.

50 La presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, que comprende por lo menos ASC y CYFRA 21-1, en la valoración *in vitro* de CRC.

La presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, que comprende por lo menos ASC y NSE, en la valoración *in vitro* de CRC.

55 Puede utilizarse un equipo a modo de "kit", para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente ASC y CYFRA 21-1, respectivamente, y opcionalmente, reactivos auxiliares para realizar las mediciones.

60 De una forma alternativa, puede utilizarse un equipo a modo de "kit", para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente ASC y NSE, respectivamente, y opcionalmente, reactivos auxiliares para realizar las mediciones.

65 En una forma de presentación preferida, adicional, la presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el cáncer colorrectal, *in vitro*, que comprende las etapas de, a) la medición, en una muestra, de la concentración de ASC, y b) opcionalmente, medir, en la muestra, la concentración de otro u otros marcadores adicionales de cáncer colorrectal, y c), correlacionar las concentraciones determinadas en la etapa (a) y opcionalmente la etapa (b), a la diagnosis de cáncer colorrectal, en donde, un elevado nivel de ASC, es indicativo para CRC.

ES 2 323 429 T3

Tal y como se utiliza aquí, en este documento, cada uno de los términos que se facilitan a continuación, tiene el significado asociado con éste, en esta sección.

Los artículos “uno” y “una”, se utilizan aquí, en este documento, para referirse a uno o más de uno (es decir, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, “un marcador”, significa un marcador o más de un marcador.

El término “marcador” o “marcador bioquímico”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a moléculas a ser utilizadas como diana, para analizar muestras de ensayo de pacientes. Los ejemplos de tales tipos de dianas moleculares, son proteínas o polipéptidos en sí mismos, así como también anticuerpos presentes en una muestra. Las proteínas y polipéptidos usados como marcadores, en la presente invención, se contemplan como incluyendo cualesquiera variantes de la citada proteína así como fragmentos de la citada proteína o de la citada variante, de una forma particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Una persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocería el hecho de que, las proteínas que se liberan por parte de la células, o que se encuentran presentes en la matriz extracelular que se convierte en dañada, por ejemplo, durante la inflamación, podría convertirse en degradada o segregada en dos fragmentos. Ciertos marcadores, se analizan en una forma inactiva, la cual puede activarse subsiguientemente, mediante proteólisis. Tal y como apreciará un persona experta en el arte especializado de la técnica, las proteínas o fragmentos de éstas, pueden encontrarse presentes como parte de un complejo. Tal tipo de complejo, puede también utilizarse como marcador, en el sentido de la presente invención. Variantes de un polipéptido marcador, se codifican mediante el mismo gen, pero difieren en su PI ó MW, ó ambos (por ejemplo, como resultado de un procesamiento de mRNA ó pre-procesado de mRNA, alternativos, como por ejemplo, corte y empalme alternativo o proteólisis limitada) y, adicionalmente, o de una forma alternativa, puede producirse a raíz de modificación diferencial de post-traducción (por ejemplo, glicosación, acilación, y/o fosforilación).

El término “valoración del cáncer colorrectal”, se utiliza para indicar el hecho de que, el procedimiento en concordancia con la presente invención ayudará (sólo, o conjuntamente con otros marcadores o variables, como por ejemplo, el criterio expuesto por la UICC (Internacional Union Against Cancer-[Unión Internacional contra el cáncer]-), edición 1997 (Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), TNM Classification of Malignant Tumours, -Clasificación TNM de tumores Malignos-, quinta edición, 1997), al médico a establecer o confirmar la ausencia o presencia de CRC, o ayudará al médico en la prognosis, la detección de recurrencia o recidivo (seguimiento de pacientes después de la cirugía) y/o el control del tratamiento, especialmente, de quimioterapia.

El término “ejemplo”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de evaluación *in vitro*. En los procedimientos de la presente invención, la muestra o muestra de un paciente, puede comprender, de una forma preferible, cualquier fluido corporal. Las muestras de ensayo preferidas, incluyen a la sangre, suero, plasma orina, saliva, y fluido sinovial. Las muestras preferidas, son la sangre entera, suero, plasma o fluido sinovial, siendo el plasma o el suero, los mayormente preferidos. Tal y como apreciará el experto en el arte especializado de la técnica, cualquier valoración de este tipo, se realiza *in vitro*. La muestra del paciente, a continuación, se desecha. La muestra del paciente, se utiliza solamente para el procedimiento *in vitro* de la invención y, el material de la muestra del paciente, no se transfiere de vuelta al cuerpo de paciente. De una forma típica, la muestra, es una muestra líquida, como por ejemplo, sangre entera, suero o plasma.

En una forma preferida de presentación, la presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el CRC *in vitro*, mediante marcadores bioquímicos que comprende la medición, en una muestra, de la concentración de ASC, y la correlación de la concentración determinada, a la diagnosis del CRC, en donde, un nivel elevado de ASC, es indicativo para el CRC.

La proteína semejante al moteado asociado a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a la caspasa (ASC), también conocida como “diana de silenciamiento inducido mediante metilación 1 (TMS1) (Swiss-PROT: Q9ULZ3), se caracteriza por la secuencia proporcionada en la SEQ ID NO: 1. Esta secuencia, se traduce a un peso molecular teórico de 12,627 Da, y a un punto isoeléctrico teórico de pH 6,29.

Los dominios de reclutamiento asociados a la caspasa (CARDs), mediatizan la interacción entre adaptadores de proteínas, tales como el APAF-1 (factor de activación de la proteasa apoptótica) y la pro-forma de caspasas (por ejemplo, CASP 9) que participan en la opostosis. ASC es un miembro de la familia de adaptadores de proteínas que contienen CARD.

Mediante inmunobarrido de exploración de una línea celular promielocítica, Masumoto *et al.*, aislaron un cDNA que codificaba para la ASC. La proteína deducida de 195 aminoácidos, contiene un dominio N-terminal, semejante a la pirina (PYD) y un CARD C-terminal de 87 residuos. Un análisis de transferencia de Western, mostró la expresión de una proteína de 22 kDa, e indicaba el hecho de que, la ASC, puede tener actividad proapoptótica mediante el incremento de la susceptibilidad de las líneas celulares de leucemia a estímulos apoptóticos mediante fármacos anti-cáncer. Masumoto, J., *et al.*, J. Biol. Chem. 274 (1999) 33835-22838).

Los análisis de PCR de restricción sensible a la metilación, y de PCR específica de metilación (MSP), de Conway *et al.*, indicaron el hecho de que la ASC, se correlaciona con la hipermetilación del exón 1, circundante de la isla de CpG y que, la sobre-expresión de la DNMT1 (DNA-citosin-5-metiltransferasa), fomenta la hipermetilación de la ASC, y el silenciamiento de la ASC. Las líneas celulares de cáncer de pecho, pero no el tejido de pecho normal,

exhibían una metilación completa de la ASC, y no expresaban ningún mensaje de ASC. La expresión de la ASC, en las líneas celulares del cáncer de pecho, inhibían el crecimiento, y reducían el número de colonias supervivientes. Conway *et al.*, concluyeron que, las funciones de la ASC, en la fomentación de la apoptosis caspasa-dependiente, y que la sobreexpresión de la ASC, inhibe el crecimiento de la células de cáncer de pecho (Conway, K. E., *et al.*, Cancer Research 60 (2000) 6236-6242).

McConnell y Vertino, mostraron que, la expresión inducible de la ASC, inhibe la proliferación celular e induce la fragmentación del DNA que puede bloquearse mediante inhibidor de caspasa. La microscopia de inmunofluorescencia, demostró el hecho de que, la inducción de apoptosis, provoca un traslado CARD-dependiente desde la expresión citoplásmica difusa, a agregados esféricos perinucleares (McConnell, B. B., y Vertino, P.M. Cancer Research 60 (2000) 6243-6247).

Moriani *et al.*, observaron la metilación del gen de la ASC, no únicamente en la células de cáncer de pecho, sino también en cáncer gástrico. Éstos sugirieron un rol interpretativo directo para la metilación aberrante del gen de la ASC, en la progresión del cáncer de pecho y gástrico, que involucra una regulación hacia abajo del gen de la ASC proapoptótica (Moriani, R., *et al.*, Anticancer Research 22 (2002) 4163-4168).

Conway *et al.*, examinaron los tejidos principales del pecho, para la metilación de MTS1 y compararon los resultados a la metilación en tejidos sanos (Conway K.E., *et al.*, Cancer Research 60 (2000) 6236-6242). Levine *et al.*, encontraron que, el silenciamiento de la ASC, no se correlacionaba con la metilación de sitios de GpG específicos, sino que, más bien, se encontraba asociado con la metilación densa la isla CpG de la ASC. Las líneas celulares del tumor de pecho que contienen exclusivamente copias metiladas de ASC, no expresan ASC, mientras que, en líneas de células parcialmente metiladas, los niveles de expresión de ASC, se encuentran directamente relacionadas al porcentaje de alelos de ASC metilada, presentes en la población de células (Levine, J. J. *et al.*, Oncogen 22 (2003) 3475-3488).

Virmani *et al.*, examinaron el estatus de metilación de ASC, en tejido de cáncer de pulmón y cáncer de pecho. Éstos encontraron la metilación aberrante de ASC presente en un 46% de las líneas celulares de cáncer de pulmón, y en un 32% del tejido de cáncer de pecho. La metilación, era rara, en tejido de pecho no maligno (7%) (Virmani, A., *et al.*, Int. J. Cancer 106 (2003) 198-204).

Shiohara *et al.*, descubrieron que la regulación mediante aumento de la ASC, se encuentra íntimamente asociada con la inflamación y apoptosis en neutrofilos humanos (Shiohara, M., *et al.*, Blood 98 (2001), 229a).

Yokohama *et al.*, examinaron la metilación de DNA de gen de la ASC, en el cáncer colorrectal humano. Éstos observaron una regulación mediante disminución de expresión de la proteína ASC, en líneas de células de cáncer colorrectal (Yokohama, T., *et al.*, Cancer Setter 202 (2003) 101-108).

Mesumoto *et al.*, observaron altos niveles de ASC abundantemente expresada, en células y leucocitos epiteliales (Masumoto, J. *et al.*, Journal Histochem. Citochem. 49 (2001) 1269-1275).

Tal y como resultará obvio para aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, la presente invención, no debe interpretarse como limitándose a la proteína ASC de longitud total de la SEQ ID NO: 1. Fragmentos fisiológicos o artificiales de ASC, modificaciones secundarias de ASC, así como también variantes alélicas de ASC, se encuentran también abarcados mediante la presente invención. Los fragmentos adicionales, abarcan, de una forma preferible, a un péptido producido sintéticamente o mediante técnicas de recombinación, las cuales, comprenden por lo menos un epítipo de interés de diagnóstico, consistente en por lo menos 6 aminoácidos contiguos, según se deriva de la secuencia dada a conocer en la SEQ ID NO:1. Tal tipo de fragmento, puede utilizarse, de una forma ventajosa, para la generación de anticuerpos apropiados para establecer un inmunoensayo del tipo sándwich.

Este procedimiento de valoración en concordancia con la presente invención, se basa en una muestra líquida, la cual se deriva de un individuo. De forma distinta a los procedimientos conocidos en el arte especializado de la técnica, la ASC, se mide específicamente a partir de esta muestra de líquido, mediante la utilización de un agente de enlace específico.

Un agente de enlace específico es, por ejemplo, una lectina que se enlaza a la ASC, o un anticuerpo a la ASC. Un agente de enlace específico, tiene por lo menos una afinidad de 10^7 l/mol, para su correspondiente molécula diana. El agente de enlace específico, tiene de una forma preferible una afinidad de 10^8 l/mol, o incluso de una forma más preferible, de 10^9 l/mol, para su molécula diana. Tal y como apreciará la persona experta en el arte especializado de la técnica, el término específico, se utiliza para indicar el hecho de que, otras biomoléculas presentes en la muestra, no se enlazan específicamente al agente específico para la ASC. De una forma preferible, el nivel de enlace a una biomolécula distinta de la molécula diana, tiene como resultado una afinidad de enlace, la cual es de únicamente un 10%, de una forma preferible, de únicamente un 5% de la afinidad de la molécula diana, o menos. Un agente específico mayormente preferido, cumplirá con ambos, el criterio anterior mínimo para la afinidad, así como para la especificidad.

Un agente de enlace específico es, de una forma preferible, un anticuerpo reactivo con la ASC. El término anticuerpo, se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de tales tipos de anticuerpos, así como a construcciones genéticas que comprenden el dominio de enlace de un anticuerpo.

Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que retenga el criterio anterior de una agente de enlace específico. Los anticuerpos, se generan mediante procedimientos correspondientes al estado actual del arte especializado de la técnica, como por ejemplo, según se describe por parte de Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of exime immunoassays 11, -Práctica y teoría de inmunoensayos enzimáticos 11, -(1980), en la totalidad del libro, específicamente, en las páginas 43-78); Elsevier, Ámsterdam). Adicionalmente, además, el artesano experto en el arte especializado de la técnica, está al corriente de los procedimientos basados en inmunoabsorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante éstos, se entiende la calidad de los anticuerpos policlonales y, así, de este modo, pueden mejorarse sus prestaciones técnicas en inmunoensayos. (Tijssen, P. mencionado anteriormente, arriba, páginas 108-115).

Para las realizaciones dadas a conocer en la presente invención, se han utilizado anticuerpos policlonales provocados o crecidos en conejos. Naturalmente, no obstante, pueden también utilizarse anticuerpos policlonales procedentes de diferentes especies, como por ejemplo, de ratas o de conejillos de indias, así como también anticuerpos monoclonales. Puesto que, los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, éstos representan unas herramientas ideales en desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. Así, de este modo, los anticuerpos monoclonales a la ASC, pueden generarse y utilizarse, en un procedimiento en concordancia con la presente invención.

Tal y como podrá apreciar ahora el artesano experto en el arte especializado de la técnica, el hecho de que la ASC, se haya identificado como un marcador, el cual es de utilidad en la diagnosis del CRC, permite que puedan utilizarse vías alternativas para alcanzar un resultado comparable a las realizaciones de la presente invención. Así, por ejemplo, pueden utilizarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Tales tipos de estrategias, comprenden, entre otras, el uso de péptidos sintéticos, que representan un epítipo de la ASC, para la inmunización. De una forma alternativa, puede también utilizarse la inmunización de DNA, también conocida como vacunación de DNA.

Para la medición, la muestra líquida obtenida a partir de un individuo, se incuba con el agente de enlace específico para la ASC, bajo unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de enlace a la ASC. Tales tipos de condiciones, no tienen por qué ser específicas, debido al hecho de que, el artesano experto en el arte especializado de la técnica, puede identificar, sin ningún esfuerzo inventivo, tales tipos de condiciones apropiadas de incubación.

Como una etapa final en concordancia con el procedimiento descrito en la presente invención, la cantidad de complejo, se mide, y se correlaciona con la diagnosis de CRC. Tal y como podrá apreciar el artesano experto en el arte especializado de la técnica, existen numerosos procedimientos para medir la cantidad de complejo de agente específico de enlace a la ASC, todos ellos descritos en detalle en los libros de texto relevantes (compárese, por ejemplo, con Tijssen P., citado anteriormente, arriba, o con Diamandis, *et al.*, eds. (1996) Immunoassay, -Inmunoensayo-, Academic Press, Boston).

De una forma preferible, la ASC, se detecta en un formato de ensayo del tipo sándwich. En tal tipo de ensayo, se utiliza un primer agente específico, para capturar la ASC, sobre un lado, y un segundo agente de enlace específico, el cual se marca para ser directamente o indirectamente detectable, sobre el otro lado.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, se ha encontrado, de una forma sorprendente, el hecho de que, la ASC, puede medirse a partir de una muestra líquida obtenida a partir de una muestra de individuo. No se requiere ninguna muestra de tejido ni ninguna muestra de biopsia, para aplicar el marcador de ASC en la valoración del CRC.

En una forma preferida de presentación, el procedimiento en concordancia con la presente invención, se practica con suero, como material de muestra líquido. En una forma adicionalmente preferida de presentación, el procedimiento de la presente invención, se practica con plasma, como material de muestra líquido. En una forma adicionalmente preferida de presentación, el procedimiento de la presente invención, se practica con sangre entera, como material de muestra líquido.

Adicionalmente, además, pueden asimismo prepararse heces, en varias formas, conocidas por parte del artesano experto en el arte especializado de la técnica. Tal tipo de muestra líquida derivada de las heces, representa, también, una forma preferida de presentación en concordancia con la presente invención.

Los inventores de la presente invención, han sido sorprendentemente capaces de detectar la proteína ASC, en una muestra de fluido corporal. De una forma todavía más sorprendente, éstos han sido capaces de demostrar el hecho de que, la presencia de ASC, en tal tipo de muestra líquida obtenida de procedencia de un individuo, puede correlacionarse a la valoración de cáncer colorrectal. De una forma preferible, se utiliza un anticuerpo a la ASC, en un inmunoensayo cualitativo (ASC presente o ausente), o cuantitativo (se determina la cantidad de ASC).

La medición del nivel de proteína ASC, ha probado ser muy ventajoso en el sector de la CRC. Así, por lo tanto, en una forma de presentación adicionalmente preferida, la presente invención, se refiere al uso de proteína ASC, como una molécula marcadora, en la valoración de cáncer colorrectal, a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

El escenario ideal para la diagnosis, sería una situación en donde, un acontecimiento o proceso, provocara la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los otros casos, la diagnosis

correcta, puede ser muy difícil, especialmente, cuando la etología de la enfermedad, no se entiende de una forma completa, tal y como es el caso del CRC. Tal y como apreciará la persona experta en el arte especializado de la técnica, ningún marcador bioquímico, por ejemplo, en el sector del CRC, es un diagnóstico con un 100% de especificidad, y al mismo tiempo, con un 100% de sensibilidad, para una enfermedad dada. Más bien, los marcadores bioquímicos, se utilizan para valorar, con una cierta probabilidad o valor predictivo, la presencia o ausencia de una enfermedad. Así, por lo tanto, en la diagnosis clínica de rutina, se consideran generalmente varios síntomas clínicos y marcadores biológicos, conjuntamente, en la diagnosis, tratamiento, y control de la enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos, pueden determinarse, o bien individualmente, o bien, en una forma preferida de presentación de la invención, éstos pueden medirse simultáneamente utilizando una tecnología de un conjunto u orden de disposición basado en astillas o en perlas. La concentraciones de los biomarcadores, se interpretan entonces de una forma independiente, utilizando un corte individual de cada marcador, o éstos se combinan para la interpretación.

En una forma de presentación adicionalmente preferida de la invención, la valoración de cáncer colorrectal, en concordancia con la presente invención, se realiza en un procedimiento que comprende las etapas de a) medir, en una muestra, la concentración de ASC, b) opcionalmente, medir, en la muestra, uno o más marcadores de cáncer colorrectal, y c) correlacionar la concentración determinada en la etapa a) y opcionalmente, la(s) concentración(nes) determinada(s) en la etapa (b), a la diagnosis de cáncer colorrectal, en donde, un elevado nivel de ASC, es indicativo para CRC.

De una forma preferible, el procedimiento para la valoración de CRC, se realiza mediante la medición de la concentración de ASC, y de uno o más marcadores distintos, y mediante la utilización de la concentración de ASC y de la(s) concentración(es) del (de los) uno o más marcadores distintos, en la valoración de CRC.

La presente invención, se dirige, también, a un procedimiento para asesorar la CRC *in vitro*, mediante marcadores bioquímicos, que comprende la medición, en una muestra, de la concentración de ASC y de uno o más marcadores de CRC, y correlacionar las concentraciones determinadas a la diagnosis de CRC.

En concordancia con los datos que se muestran en la sección de los ejemplos, el marcador ASC, en el análisis univariante, tiene (a una especificidad de aproximadamente un 90%), una sensibilidad para CRC, del 54,7%. En la valoración de CRC, el marcador ASC, será ventajoso, en uno o más de los siguientes aspectos: barrido de exploración; ayuda de diagnóstico; control de la quimioterapia, y seguimiento.

Barrido de exploración

La CRC, es la segunda malignidad más común de ambos, hombres y mujeres, en los países desarrollados. Debido a su alta frecuencia, su larga fase asintomática y la presencia de lesiones premalignas, el CRC, reúne muchos de los criterios para un barrido de exploración. Claramente, un marcador tumoral en suero que tiene una sensibilidad y especificidad aceptables, sería más apropiado para el barrido de exploración, que ambos, el ensayo de FOB o la endoscopia.

Tal y como demuestran los datos proporcionados en la sección de los ejemplos, la ASC sola, no es suficiente como para permitir un barrido general de exploración, por ejemplo, de la población en riesgo para CRC. De una forma más verosímil, ningún marcador bioquímico individual en la circulación, cumplirá jamás los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para los propósitos de un barrido de exploración. Más bien, debe esperarse el hecho de que, deberá usarse un panel de marcadores en el barrido de exploración del CRC. Los datos establecidos en la presente invención, indican el hecho de que, el marcador ASC, formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado para los propósitos de un barrido de exploración. La presente invención, se refiere, por lo tanto, al uso de la ASC, como un marcador de un panel de marcadores de CRC, para propósitos de barrido de exploración para el CRC. Los presentes datos, indican, adicionalmente, el hecho de que, ciertas combinaciones de marcadores, serán ventajosas, en el barrido de exploración para el CRC. Así, por lo tanto, la presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores que comprende ASC y CYFRA 21-1, ó de un panel de marcadores que comprende ASC y NSA, o de un panel de marcadores que comprende ASC y CYFRA-21-1 y NSA, para los propósitos de barrido de exploración del CRC.

Ayuda de diagnóstico

Los valores preparativos de CRC, son de un valor de diagnóstico limitado. No obstante, el European Committee on Tumor Markers [(ECTM)-Comité Europeo para los marcadores de tumours-], recomienda que, debería medirse el CFA, antes de la cirugía, con objeto de establecer un valor de línea de base y para valorar la prognosis. Puesto que, la ASC, como un marcador individual en concordancia con los datos de la presente invención, puede ser por lo menos tan bueno como un marcador individual como el CEA, o incluso superior, debe esperarse el hecho de que, la ASC, se utilice como una ayuda de diagnóstico, especialmente, para establecer un valor de línea de base, antes de la cirugía.

La presente invención, se refiere, también, al uso de ASC, para establecer una valor de línea de base, antes de la cirugía, para el CRC.

Prognosis

Los patrones standard de oro, para determinar la prognosis, en pacientes con CRC, es la extensión de la enfermedad, según se define mediante los sistemas de Duke, TNM, u otros sistemas de clasificación por etapas. Si un marcador, tal como el CEA, debe utilizarse para predecir resultados, éste debe: proporcionar una información del pronóstico más fuerte que la que se ofrece mediante los sistemas de clasificación por etapas, existentes, proporcionar una información independiente de los sistemas existentes, o proporcionar datos de prognosis dentro de subgrupos específicos, definidos mediante criterios existentes, como por ejemplo, en pacientes del la etapa B de Duke, ó nódulo-negativos.

Recientemente, una conferencia de consenso de la American Joint Committee on Cancer [(AJCC)-Comité solidario americano del cáncer-], sugirió el hecho de que, el CEA, debería añadirse al sistema de clasificación TNM, para el cáncer colorrectal. El nivel de CEA, debería designarse del siguiente modo: CX, CEA no puede valorarse; CO, CEA no elevado (<5 µg/l), ó CEA1, CEA elevado (>5 µg/l)(Compton, C., *et al*, Cancer 88 (2000) 1739-1757).

Puesto que la ASC solo, contribuye de una forma significativa a la diferenciación de pacientes de CRC, de los controles sanos o de los controles sanos más enfermedades de colon no malignas, debe esperarse el hecho de que, ésta, ayudará en la valoración de la prognosis de los pacientes que sufren de CRC. El nivel de ASC preoperativa, se combinará, de una forma más probable, con uno o más marcadores distintos para el CRC y/o el sistema de clasificación por etapas TNM, según se recomienda para el CEA, por parte del AJCC. En una forma preferida de presentación, la ASC, se utiliza en la prognosis de pacientes con CRC.

Control de la quimioterapia

Un gran número de informes, han descrito el uso del CEA, en el control del tratamiento de pacientes con CRC avanzado (para una revisión, véase Refs. Duffy, M.J., Clin. Chem. 47 (2001) 625-630; Fletcher, R.H., Ann. Int. Med. 104 (1986) 66-73; Anonymous, J. Clin. Oncol. 14 (1996) 2843-2877). La mayoría de éstos, eran retrospectivos, no aleatorios, y contenían reducidos números de pacientes. Estos estudios, sugerían: a) que los pacientes con un decrecimiento en los niveles de CEA, mientras recibían quimioterapia, tenían un mejor resultado que aquéllos cuyos niveles de CEA, no decrecían y b) para casi todos los pacientes, los incrementos en los niveles de CEA, se asociaron con una progresión de la enfermedad.

Debido a los datos mostrados en la sección de los ejemplos, debe esperarse el hecho de que, la ASC, será por lo menos tan buena, como marcador para el control de la quimioterapia, que el CEA. Así, por lo tanto, la presente invención, se refiere, también, al uso de la ASC, en el control de pacientes de CRC, que están experimentando quimioterapia.

Seguimiento

Aproximadamente un 50% de los pacientes que experimentan una resección quirúrgica encaminada a la cura, posteriormente, desarrollan una recurrencia de la enfermedad metastásica (Berman, J.M., *et al*, Lancet 355 (2000) 395-399). La mayoría de estas recidivas, acontecen dentro de los primeros 2-3 años de la diagnosis, y se confinan usualmente en el hígado, los pulmones o en las áreas locorregionales. Puesto que, la enfermedad recurrente/metastásica, es invariablemente fatal, una investigación considerable, se ha centralizado en su identificación, en un estado temprano y así, de este modo, potencialmente tratable. Por consiguiente, muchos de estos pacientes, experimentan un programa de vigilancia post-operativa, la cual, de una forma frecuente, incluye el control regular con CEA.

Los controles en serie con CEA, han mostrado detectar enfermedad recurrente/metastásica, con una sensibilidad de aproximadamente un 80%, una especificidad de aproximadamente un 70% y proporciona un tiempo de indicación medio de 5 meses (para una revisión, véase Duffy, M. J. *et al.*, mencionado anteriormente, arriba y Fletcher, R.H., mencionado anteriormente, arriba). Adicionalmente, además, el CEA, era el indicador más frecuente de recurrencia en pacientes asintomáticos (Pietra, N., *et al.*, Dis. Colon Rectum 41 (1998) 1127-1133 y Gram., R. A., *et al.*, Ann. Surg. 228 (1998) 59-63) y era más efectivo, en cuanto a costes, que la radiología, para la detección de enfermedades recurrentes potencialmente curables. En cuanto a lo concerniente a la metástasis de recurrencia/metástasis, el CEA, era mayormente sensible (aproximadamente un 100%), para la detección de metástasis en el hígado. Por otro lado, el CEA, era menos fiable para diagnosticar recurrencias colorregionales, siendo la sensibilidad de únicamente aproximadamente un 60% (Moertel, C.G., *et al.*, Jama 270 (1993) 943-7).

Como compromiso entre la conveniencia del paciente, los costes y la eficiencia de la detección de la enfermedad, el Panel EGTM, como el Panel ASCO (Anonymous, J., Clin. Oncol. 14 (1996) 2843-2877), sugiere el hecho de que, el ensayo de de la CEA, se lleve a cabo cada 2-3 meses, durante un transcurso de por lo menos 3 años, después de la diagnosis inicial. Después de un transcurso de tiempo de 3 años, el ensayo, podría realizarse de una forma menos frecuente, como por ejemplo, cada 6 meses. No existe no obstante ninguna evidencia, en cuanto al hecho de mantener esta frecuencia del ensayo.

Tal y como muestra la discusión anterior de arriba, con respecto al estado actual del arte de la técnica especializada, el seguimiento de los pacientes con CRC, después de la cirugía, es uno de los sectores más importantes, en cuanto al uso de un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad de la ASC, en pacientes investigados con CRC, se espera el hecho de que, la ASC, sola o en combinación con uno o más marcadores distintos, será de una gran ayuda en el seguimiento de pacientes con CRC, especialmente, en pacientes con CRC, después de la cirugía. El uso

ES 2 323 429 T3

de un panel de marcadores que comprende ASC y uno o más marcadores distintos del CRC, en el seguimiento de pacientes con CRC, representa una forma de presentación adicional de la presente invención.

5 La presente invención, da a conocer y, por lo tanto, en una forma de presentación, se refiere, al uso de la ASC, en el sector de diagnóstico de CRC, o en la valoración del CRC, respectivamente.

10 En todavía otra forma de presentación, la presente invención, se refiere al uso de la ASC, como una molécula marcadora, para el cáncer colorrectal, en combinación con una o más moléculas marcadoras, para el cáncer colorrectal, en la valoración de cáncer colorrectal, a partir de una muestra líquida obtenida de un paciente. En este sentido, la expresión “uno o más”, se refiere de 1 a 20, de una forma preferible, de 1 a 5, de una forma más preferible, 3 ó 4. La ASC y el uno o más marcadores, forman un panel de marcadores de CRC.

15 Así, de este modo, una forma preferida de presentación de la presente invención, es el uso de la ASC, como molécula marcadora para el cáncer colorrectal, en combinación con una o más moléculas marcadoras para el cáncer colorrectal, en la valoración del cáncer colorrectal, a partir de una muestra líquida obtenida de un paciente. Los otros marcadores seleccionados, preferidos, con lo cuales puede combinarse la valoración de ASC, son los NSE, CYFRA 21-1, NMMT, CA 19-9, CA 72-4 y/o CEA. Todavía de una forma preferida, el panel de marcadores utilizado en la valoración de CRC, comprende ASC y por lo menos una de las moléculas marcadoras seleccionadas de entre el grupo consistente en NSE, CYFRA 21-1 y NMMT.

20 Los marcadores que de una forma preferible se combinan con la ASC o que forman parte del panel de marcadores de CRC que comprenden ASC, respectivamente, se discuten, en mayor detalle, abajo, a continuación.

25 *NSE (enolasa neuronal-específica)*

La enzima glicolítica enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa), EC 4.2.1.11, peso molecular aprox. 80 kD), acontece en una variedad de isoformas diméricas, comprendiendo tres subunidades inmunológicamente diferentes, denominadas $\alpha\beta$, $\alpha\gamma$, y $\gamma\gamma$. La subunidad α de la enolasa, acontece en numerosos tipos de tejidos de mamíferos, mientras que, las subunidades β , se encuentran principalmente en el corazón y en la musculatura estriada. Las isoformas de enolasa $\alpha\gamma$, y $\gamma\gamma$, a las cuales se les hace referencia como enolasa neuronal- específica (NSE) ó γ -enolasa, son principalmente detectables en altas concentraciones, en neuronas y células neuro-endocrinas, así como en tumores que se originan a partir de éstas. (Lamerz R., NSE (Neuronen-spezifische Enolasa-Enolasa neuronal-específica), γ -Enolase. In: Thomas L (ed) Clinical Laboratory Diagnosis, -Diagnosis Clínica de Laboratorio, TH-Books, Frankfurt, 1st English Edition (1ª edición Inglesa) 1998: 979-981, 5. deutsche Auflage (5ª edición alemana) 1998: 1000-1003).

35 La NSA, se describe como el marcador de primera elección en el control del carcinoma bronquial de células pequeñas, (Lamerz R., mencionado anteriormente, arriba), mientras que, el CYFRA-21, es superior a la NSE, para el carcinoma bronquial de células no pequeñas.(Ebert W., *et al.*, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem 32 (1994) 189-199).

40 Las concentraciones elevadas de NSE, se encuentran, en un 60-81% de los casos del carcinoma bronquial de células pequeñas.

45 Para la NSE, no existe una correlación al sitio de metástasis o la metástasis cerebral, pero existe una correlación al estado clínico, es decir, la extensión de la enfermedad.

50 Como respuesta a la quimioterapia, hay un incremento temporal en el nivel de NSE, 24-72 horas después del primer ciclo de terapia, como resultado de la citólisis de las células tumorales. Esto viene seguido, dentro del transcurso de una semana, o hacia el final del primer ciclo de terapia, por una rápida caída de los valores en suero (los cuales se encuentran elevados, previamente a la terapia). Como contraste de ello, los no respondientes a la terapia, exhiben unos elevados niveles, los cuales se encuentran constantemente elevados o fallan en encontrarse en el rango de referencia. Durante la remisión, un porcentaje del 80-96% de los pacientes, tienen unos valores normales. En el caso de recidiva, se encuentran valores incrementantes de NSE. El incremento, acontece, en algunos casos, con un período latente de 1-4 meses, éste es a menudo exponencial (con un tiempo de duplicación de 10-94 día) y se correlaciona con el período de supervivencia. La NSA, es de utilidad como un factor de pronóstico individual, y marcador de la actividad, durante el control de la terapia y el transcurso de la enfermedad, en el carcinoma bronquial de células pequeñas: sensibilidad de diagnóstico, 93%, valor predictivo positivo 92% (Lamerz, R., mencionado anteriormente, arriba).

60 En el neuroblastoma, se encuentran valores de NSE en suero por encima de 30 ng/ml, en un porcentaje del 62% de los niños afectados. Las medias, crecen en concordancia con la etapa de la enfermedad. Existe una correlación significativa, entre la magnitud o frecuencia de los valores patológicos de NSE, y la etapa de la enfermedad; existe una correlación inversa con la supervivencia exenta de enfermedad.

65 El 68-73% de los pacientes con seminoma, tienen una elevación clínica significativa de la NSE. (Lamers R., mencionado anteriormente, arriba). Existe una correlación utilizable con el curso clínico de la enfermedad.

La NSA, se ha medido en otros tumores: Las enfermedades no pulmonares malignas, muestran valores por encima de 25 ng/ml, en el 22% de los casos (carcinomas, en todos los estados). Los tumores del cerebro, tales como el glioma, meningioma, neurofibroma, y neurinoma, se encuentran únicamente ocasionalmente acompañados por ele-

ES 2 323 429 T3

vados valores de NSA en suero. En tumores primarios del cerebro o metástasis cerebral y en el melanoma y feocromocitoma malignos, pueden acontecer valores elevados de NSE, en el CSF (fluido cerebroespinal). Se han reportado concentraciones incrementadas de NSE, para el 14% de carcinomas renales con órgano restringido y el 46% de carcinomas renales metastasizantes, con una correlación con respecto al grado como un factor independiente de prognosis.

En enfermedades malignas, se han encontrado concentraciones elevadas de NSE en suero (> 12 ng/ml), en pacientes con enfermedades pulmonares malignas, y enfermedades cerebrales. Se han encontrado valores elevados, principalmente en el licor, en meningitis cerebrovascular, encefalitis diseminada, degeneración espinocerebelar, isquemia cerebelar, infarto cerebral, hematoma intracerebral, hemorragia subaracnoidea, heridas en la cabeza, enfermedades inflamatorias del cerebro, epilepsia orgánica, esquizofrenia, y la enfermedad de Jakob-Creutzfeld. (Lamerz R., mencionado anteriormente, arriba).

La NSE, se midió en un analizador del tipo Elecsys[®], utilizando el producto Roche número 12133113, en concordancia con las instrucciones de los fabricantes.

CA 19-9, Antígeno Carbohidrato 19-9

Los valores de CA 19-9 medidos, se definen mediante el uso del anticuerpo monoclonal 1116-NS-19-9. Se miden los determinantes 1116-NS-19-9-reactivos en un glicolípido que tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 daltons. Esta mucina, corresponde a un hapteno de los determinantes del grupo de sangre de Lewis a, y es un componente de un gran número de células membranas de la mucosa (Koprowski, H., *et al.*, Somatic Cell Genet 5, -Genética de las células somáticas 5-, (1979) 957-971).

Un porcentaje del 3-7% de la población, tiene la configuración del grupo de sangre de Lewis a-negativo/b-negativo, y son incapaces de expresar la mucina con el determinante reactivo CA 19-9. Este hecho, debe tomarse en consideración, cuando se interpretan los descubrimientos.

La mucina, se origina en el epitelio fetal gástrico, intestinal y pancreático. Pueden encontrarse también pequeñas concentraciones en el tejido de los adultos, en el hígado, los pulmones, y el páncreas (Stieber, P. y Fateh-Mogahdam, A., Boeringer Mannheim, Cat n° 1536869 (inglés) 1320947 (alemán). ISBN 2-926725-07-9 alemán/inglés, Juergen Hartmann Verlag, Marloffstein-Rathsberg (1993); Herlyn, M., *et al.*, J. Clin. Immunol 2 (1982) 135-140).

Los valores de ensayo del CA 19-9, pueden asistir en la diagnosis diferencial y control de pacientes con carcinoma pancreático (sensibilidad del 70-87%) (Ritts, R.E., Jr., *et al.*, Int. J. Cancer 33 (1984) 229-345). No existe correlación entre la masa tumoral y los valores de ensayo del CA 19-9. No obstante, los pacientes con niveles de suero de CA 19-9 por encima de 10.000 U/ml, tienen casi siempre metástasis distal.

La determinación del CA 19-9, no puede utilizarse para la detección temprana de carcinoma pancreático (Steinberg, W. M., *et al.*, Gastroenterology 90 (1986) 343-349).

En el carcinoma hepatobiliar, los valores del CA 19-9, proporcionan una sensibilidad del 50-75%. Se recomienda la determinación concomitante del CA 72-4 y del CEA, en el caso del carcinoma gástrico. En el carcinoma colorrectal, la determinación del CEA solo, es adecuada: sólo en raros casos CEA-negativos, puede ser de utilidad la determinación del CA 19-9.

Puesto que la mucina se excreta exclusivamente vía el hígado, incluso una ligera colestasis, puede conducir, en algunos casos, a unos niveles de CA 19-9 en suero claramente elevados. Se encuentran, también unos elevados valores del CA 19-9, con un gran número de enfermedades inflamatorias benignas del tracto gastrointestinal y el hígado, así como también en fibrosis cística.

El CA 19-9, se midió con un analizador del tipo Elecsys[®], utilizando el producto número 11776193, en concordancia con las instrucciones de los fabricantes.

55 Antígeno carcinoembrionario CEA

El CEA, es una glicoproteína monomérica (peso molecular de aproximadamente 180.000 dalton), con un componente variable de hidratos de carbono de aproximadamente un 45-60% (Gold, P. and Freedmann, S.O., J. Exp Med 121 (1965) 439-462).

El CEA, como el AFP, pertenece al grupo de antígenos carcinofetales que se producen durante el período embrionario y fetal. La familia de genes CEA, consiste en aproximadamente 17 genes activos, en dos subgrupos. El primer grupo, contiene CEA y antígenos no específicos de reacción cruzada (NCA-del inglés, Non specific Cross-reacting Antigens-); el segundo grupo, contiene las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG-del inglés, Pregnancy-Specific Glycoproteins-).

El CEA, se encuentra, principalmente, en el tracto gastrointestinal fetal y el suero fetal. Este se origina, también, en ligeras cantidades, en el tejido intestinal, pancreático, y hepático de adultos sanos. La formación de CEA, se reprime,

ES 2 323 429 T3

después del nacimiento y, correspondientemente en concordancia, los valores del CEA en suero, son difícilmente medibles en pacientes adultos.

5 Se encuentran frecuentemente altas concentraciones de CEA, en casos de adenocarcinoma colorrectal (Stieber, P. y Fathe-Moghadam, A., mencionado anteriormente, arriba). Unas ligeras a moderadas elevaciones del CEA (raramente > 10 ng/ml), acontecen, en un porcentaje del 20-50% de enfermedades benignas del intestino, del páncreas, del hígado y de los pulmones (por ejemplo, cirrosis hepática, hepatitis crónica, pancreatitis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfisema)(Stieber, P. y Fathe-Moghadam, A., mencionado anteriormente, arriba). Los fumadores, tienen también valores elevados del CEA.

10 La indicación principal para la determinaciones del CEA, es el control de seguimiento y de la terapia del cáncer colorrectal.

15 Las determinaciones del CEA, no se recomiendan, para el barrido de exploración del cáncer, en la población general. Las concentraciones de CEA, dentro del rango normal, no excluyen la posible presencia de una enfermedad maligna.

20 Los anticuerpos, en ensayos fabricados por parte de la firma Roche Diagnostics, reaccionan con el CEA y (como en casi la totalidad de procedimientos de CEA), con el antígeno de meconio (NCA2). La reactividad cruzada con el NCA1, es del 0,7% (Hammarstrom, S., *et al.*, Cancer Res. 49 (1989) 4852-4858 y Bormer, O.P., Tumor Biol. 12 (1991) 9-15).

25 El CEA, se midió con un analizador del tipo Elecsys[®], utilizando el producto número 117731629, en concordancia con las instrucciones de los fabricantes.

CYFRA 21-1

30 Un ensayo para "CIFRA 21-1", mide específicamente un fragmento soluble de citoqueratina 19, como encontrándose presente en la circulación. La medición de CIFRA 21-1, se basa típicamente en dos anticuerpos monoclonales (Bodenmueller, H., *et al.*, Int. J. Biol. Markers 9 (1994) 75-81). En el ensayo de CIFRA 21-1 de procedencia de la firma Roche Diagnostics, Alemania, se utilizan los dos anticuerpos monoclonales específicos (KS 19.1 y BM 19-21), y se mide un fragmento soluble de citoqueratina 19 que tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons.

35 Las citoqueratinas, son proteínas estructurales que forman las subunidades de filamentos intermediarios epiteliales. Hasta ahora, se han identificado veinte polipéptidos diferentes de citoqueratinas. Debido a sus modelos patrón de distribución específicos, éstas son eminentemente apropiadas para su uso como marcadores de diferenciación, en patología tumoral. Los polipéptidos de queratina intactos, son escasamente solubles, pero pueden detectarse fragmentos solubles en el suero. (Bodenmueller, H., *et al.*, mencionado anteriormente, arriba).

40 CYFRA 21-1, es un marcador bien establecido para el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC -del inglés, Non-Small-Cell Lung Carcinoma-). La indicación principal para CYFRA 21-1, es el control del curso de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). (Sturgeon, C., Clinical Chemistry 48, -Química clínica 48-, (2002) 1151-1159).

45 Unos altos niveles de CYFRA 21-1 en suero, indican una etapa tumoral avanzada, y una pobre prognosis, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas. (van der Gaast, A. *et al.*, Br. J. Cancer 69 (1994) 525-528). Un valor normal o únicamente ligeramente elevado, no excluye la presencia de un tumor.

50 Una terapia exitosa, se documenta mediante una rápida caída en el nivel de CYFRA 21-1 en suero, en el rango normal. Un valor constante de CYFRA 21-1, o un ligero o únicamente lento, en el valor de CYFRA 21-1, indica una eliminación incompleta de un tumor o la presencia de múltiples tumores, con las correspondientes consecuencias terapéuticas y de pronóstico. La progresión de la enfermedad, se muestra a menudo, de una forma más temprana, mediante el incremento de los valores de CYFRA 21-1, que mediante la sintomatología clínica y procedimientos de captación de imágenes.

55 Se acepta el hecho de que, la diagnosis primaria de carcinoma pulmonar, debería realizarse en base a la sintomatología clínica, procedimientos de captación de imágenes o procedimientos endoscópicos, y hallazgos o descubrimientos intraoperatorios. Un foco circular no claro, en el pulmón, conjuntamente con valores de CYFRA 21-1 > 30 ng/ml, indica, con una alta probabilidad, la existencia de un carcinoma bronquial primario.

60 CYFRA 21-1, es también apropiado para el control del curso en el cáncer mioinvasivo de la vesícula (vejiga). Se muestra una buena especificidad mediante CYFRA 21-1, con relación a la enfermedades benignas del pulmón (neumonía, sarcoidosis, tuberculosis, bronquitis crónica, asma bronquial, enfisema).

65 Raramente, se encuentran valores elevados (de hasta 10 ng/ml), en enfermedades benignas del hígado y fallo renal. No existe correlación alguna con el sexo, la edad, o el tabaquismo. Los valores para CYFRA 21-1, se encuentran también inafectados, en el caso del embarazo.

ES 2 323 429 T3

Recientemente, se ha encontrado el hecho de que, el CYFRA 21-1, se utiliza también en la detección de recidivas de la enfermedad y en la valoración de la eficacia del tratamiento, en el sector del cáncer de pecho (Nakata, B., *et al.*, British J. of Cancer (2004) 1-6).

5 El CYFRA 21-1, se midió con un analizador del tipo Elecsys[®], utilizando el producto número 11820966, en concordancia con las instrucciones de los fabricantes.

10 Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, el CYFRA 21-1, es un marcador establecido, en el sector del NSCLC. Cuando se desarrolla y se establece CYFRA 21-1, para el NSCLC, se han utilizado controles de enfermedades no malignas derivados de pacientes con ciertas enfermedades no malignas del pulmón. Esto se ha considerado como importante, para diferenciar enfermedades no malignas del pulmón, con respecto a las enfermedades malignas del pulmón (H. Bodenmüller, *et al.*, mencionado anteriormente, arriba).

15 Desde sólo muy recientemente, es posible detectar el marcador CYFRA 21-1, en un significativo porcentaje de muestras derivadas de pacientes con CRC. Adicionalmente, además, la presencia de CYFRA 21-1, en tal tipo de muestra líquida obtenida de un individuo, puede utilizarse en la valoración del cáncer colorrectal. Particularmente, en combinación con otros marcadores, el CYFRA 21-1, se considera como siendo un marcador de mucha utilidad, en el sector del CRC.

20 *NNMT*

La proteína nicotinamida-N-metiltransferasa (NNMT; Swiss-PROT: P40261), tiene un peso molecular aparente de 29,6 kDa y un punto isoeléctrico de 5,56.

25 La NNMT, cataliza la N-metilación de la nicotinamida y otras piridinas. Esta actividad, es importante para la biotransformación de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. La proteína, se ha reportado como expresándose predominantemente en el hígado, y se encuentra localizada en el citoplasma. La NNMT, se clonó a partir de cDNA procedente de un hígado humano, y contenía un marco de lectura abierto de 792 nucleótidos, que codificaba a una proteína de 264 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 29,6 kDa. (Aksoy, S., *et al.*, J. Biol. Chem. 269 (1994) 14835-14840. Se conoce muy poco, en la literatura, acerca del rol interpretativo potencial de la enzima, en el cáncer humano. En un documento, se reportó una actividad enzimática hepática de NNMT, como un marcador para la caquexia por cáncer, en ratones (Okamura, A., *et al.*, Jpn. J. Cancer Res. 89 (1998) 649-656). En un informe reciente, se demostró la regulación hacia abajo del gen de NNMT, como respuesta a la radiación, en líneas celulares sensibles a la radiación (Kassem, H., *et al.*, Int. J. Cancer 101 (2002) 454-460).

35 Recientemente, se ha encontrado el hecho (documento de patente internacional WO 2004/057 336) de que, la NNMT, será de interés, en la valoración del CRC. El inmunoensayo descrito en el documento de patente internacional WO 2004/057 336, se ha utilizado para medir las muestras (CRC, controles sanos y enfermedades no malignas del colon) del presente estudio.

40 Tal y como podrá apreciar el artesano experto en el arte especializado de la técnica, existen muchas formas de utilizar las mediciones de dos o más marcadores, con objeto de mejorar el diagnóstico en cuestión que se encuentre bajo investigación. En un procedimiento bastante simple, pero no obstante a menudo efectivo, se asume un resultado positivo, si una muestra es positiva, para por lo menos uno de los marcadores investigados. Este puede ser por ejemplo el caso, cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como el SIDA.

45 Frecuentemente, no obstante, se evalúa la combinación de marcadores. De una forma preferible, los valores medidos para los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo, para ASC, CYFRA 21-1 y NSE, se combinan matemáticamente y, el valor combinado, se correlaciona al diagnóstico subyacente en cuestión. Los valores de los marcadores, pueden combinarse mediante cualquier estado actual apropiado del procedimiento matemático correspondiente al arte especializado de la técnica. Los procedimientos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores a una enfermedad, emplean métodos como el análisis discriminario (DA), (es decir, DA lineal, cuadrático, regularizado), métodos de Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores k del vecino más cercano), PLS (Mínimos cuadrados parciales-PLS, del inglés Partial Least Squares) Métodos basados en árboles (es decir, Regresión logística), CART, Métodos forestales aleatorios, Métodos de estimulación/embolsado (Boosting/Bagging Methods), Modelos lineales generalizados (a saber, Regresión Logística), Métodos basados en componentes principales (a saber, SIMCA), Modelos aditivos generalizados, Métodos basados en lógica difusa, Métodos basados en redes naturales y algoritmos genéricos. El artesano experto en el arte especializado de la técnica, no tendrá problema alguno en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la invención. De una forma preferible, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, a por ejemplo la ausencia o la presencia de CRC, se selecciona de entre el DA (es decir, análisis discriminario lineal, cuadrático, regularizado), métodos de Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores k del vecino más cercano), PLS (Mínimos cuadrados parciales-PLS, del inglés Partial Least Squares) Métodos basados en árboles (es decir, Regresión logística, CART, Métodos forestales aleatorios, Métodos de estimulación/embolsado (Boosting/Bagging Methods)) o Modelos lineales generalizados (a saber, Regresión Logística). Los detalles correspondientes a estos métodos estadísticos, se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., *et al.*, J. of Computational and Graphical Statistics, 12, -Diario de estadísticas computarizadas y gráficas, 12, -(2003) 475-511; Friedmann, J. H., J. of the American Statistical Association 84, -Diario de la Asociación de estadísticas 84, (1989)

165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedmann, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, -Los elementos del aprendizaje estadístico, Series Springer de estadística-, 2001; Breiman, L., Friedmann, J. H., Olshen, R.A., Stone, C.J. (1984) Classification and regression trees, -Árboles de clasificación y regresión, California: Wadsworth; Breiman, L., Random Forests, Machine Learning 45-, Bosques aleatorios, aprendizaje mecánico 45 (2001) 5-32; Pepe, M.S. The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, -La evaluación estadística de tests de ensayo médicos para la clasificación y la predicción-, Oxford Statistical Science Series 28, Serie de ciencia estadística de Oxford, 28 (2003); y Duda, R.O., Hart, P.E., Stork, D.G., Pattern Classification, -Clasificación de modelos patrón, Wiley Interscience, 2ª Edición (2001).

10 Es una forma preferida de presentación de la invención, el utilizar un corte multivariante optimizado de la combinación subyacente de marcadores biológicos y discriminar el estado A del estado B, por ejemplo, enfermo de sano. En este tipo de análisis, los marcadores, no son ya independientes, sino que forman un panel de marcadores. Podría establecerse el hecho de que, el combinar la mediciones de ASC, NSE y CYFRA 21-1, no mejora de una forma particular la precisión del diagnóstico para el CRC, al compararse con ya sea los controles sanos ó, tal y como también se valora, al compararse con controles sanos más controles de enfermedad no maligna. Especialmente, éste último descubrimiento, es de gran importancia, debido al hecho de que, un paciente con una enfermedad no maligna, puede requerir un tratamiento bastante diferente que un paciente con CRC.

20 La precisión de un test de ensayo, se describe, de la mejor forma, mediante sus características operativas del receptor (ROC, del inglés, receiver-operating characteristics) (véase, especialmente, Zweig, M. H., y Campbell, G. Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC, es un trazado gráfico de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión sobre la totalidad del rango de datos observados.

25 Las prestaciones técnicas clínicas de un test de ensayo de laboratorio, dependen de su precisión o exactitud de diagnóstico, o de la capacidad de clasificar correctamente sujetos, en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión o exactitud del diagnóstico, mide la capacidad del test de ensayo, para distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Tales tipos de condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad ó enfermedad benigna versus maligna.

30 En cada caso, el gráfico ROC, representa el solapado entre las dos distribuciones, procediendo a trazar un gráfico de la sensibilidad versus especificidad 1, para el rango completo de los umbrales de decisión. En el eje y, se encuentra la sensibilidad, o la fracción positiva verdadera [definida como (número de resultados de tests de ensayo positivos verdaderos)/(número de resultados de tests de ensayo positivos verdaderos + número de resultados de test de ensayo negativos falsos)]. A ésta, se le ha hecho también referencia como positividad en presencia de una enfermedad o condición. Esto se calcula únicamente a partir de subgrupo afectado. En el eje x, se encuentra la fracción positiva falsa, ó especificidad 1 [definida como (número de resultados de tests de ensayo positivos falsos)/(número de resultados de tests de ensayo negativos verdaderos + número de resultados de test de ensayo positivos falsos)]. Ésta, es un índice de especificidad, y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Debido al hecho de que, las fracciones positivas falsas y verdaderas, se calculan enteramente por separado, mediante la utilización de los resultados de los tests de ensayo procedentes de los dos diferentes subgrupos, el trazado gráfico ROC, es independiente del predominio de la enfermedad en la muestra. Cada punto, en el gráfico ROC, representa un par sensibilidad/especificidad 1, correspondiente a un umbral de decisión individual. Un test de ensayo con una discriminación perfecta (sin solapado en las dos distribuciones de resultados), tiene un trazado gráfico ROC, que pasa a través de la esquina izquierda superior, en donde, la fracción positiva verdadera, es de 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción positiva falsa, es 0 (especificidad perfecta). El trazado gráfico teórico para un test de ensayo sin discriminación (distribuciones de resultados idénticas para los dos grupos), es un línea en diagonal de 45°, desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayoría de los trazados gráficos, caen entre estos dos extremos. (Si el trazado gráfico ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se remedia fácilmente invirtiendo el criterio para “positividad” desde “mayor de” a “menos de” ó viceversa). Cualitativamente, cuanto más cercano se encuentra el trazado gráfico, con respecto a la esquina superior izquierda, mayor es la precisión o exactitud del test de ensayo.

55 Un objetivo conveniente para cuantificar la precisión o exactitud de diagnóstico de un test de ensayo de laboratorio, es el expresar sus prestaciones técnicas, mediante un número individual. La medición global más común, es el área bajo el trazado gráfico ROC. Por convención, esta área, es siempre $\geq 0,5$ (si no lo es, puede invertirse la norma de decisión para que sí lo sea). Los valores se encuentran dentro de un rango comprendido dentro de unos márgenes situados entre 1,0 (separación perfecta de los valores de test de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencial distribucional aparente entre los dos grupos de valores de test de ensayo). El área, no depende únicamente de una porción particular del trazado gráfico, tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad a un 90% de especificidad, sino del trazado gráfico en su totalidad. Esto es una expresión cuantitativa, descriptiva, de cuan cercano se encuentra el trazado gráfico ROC, con respecto a uno perfecto (área = 1,0).

65 La combinación de las mediciones de la ASC con otros marcadores recientemente descubiertos, como el CYFRA 21-1 ó NMMT, o con marcadores conocidos como el CEA y el NSE, o con otros marcadores de CRC, a ser todavía descubiertos, conduce y conducirá, respectivamente, a mejoras adicionales, en la valoración del CRC.

La combinación de los tres marcadores ASC, CYFRA 21-1 y NSE, mejora de una forma significativa la exactitud o precisión de diagnóstico para el CRC.

ES 2 323 429 T3

Los ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras que se facilitan a continuación, se proporcionan para ayudar en el entendimiento de la presente invención, cuyo ámbito cierto, se presenta en las reivindicaciones adjuntas.

Figura 1

5 La figura muestra un gel a 2D, cargado con una muestra de tumor de pecho (lado izquierdo), y un gel cargado con una muestra de control emparejada (lado derecho). El círculo, en la sección ampliada de estos geles, indica la posición para la proteína ASC. Utilizando el mismo procedimiento, esta proteína, no se ha detectado en tejido sano. La ASC, migra en el gel 2D, correspondiente a un punto isoeléctrico de aproximadamente un pH 6, y un peso molecular aparente de aproximadamente 22 kDa.

Figura 2

15 Distribución de la cuantificación de ASC en muestras de suero y de plasma (véase el ejemplo 4) de los pacientes de control en concordancia con la tabla 1. A: controles de la enfermedad, n 0 87; B: controles sanos, n = 317. La línea horizontal, en el diagrama, indica el valor de corte de 597 pg/ml.

Figura 3

20 Distribución de valores medidos para ASC. La línea de corte, corresponde a 597 pg/ml y una especificidad del 90%, con respecto al colectivo de pacientes de control (tabla 1). A: UICC I, n 0 33; B: UICC II, n = 23; C: UICC III, n = 21; D: UICC IV, N = 23; E: adenoma, n = 28.

Figura 4

25 Distribución de valores medidos para CEA. La línea de corte, corresponde a 4 ng/ml y una especificidad del 90%, con respecto al colectivo de pacientes de control (tabla 1). A: UICC I, n 0 33; B: UICC II, n = 23; C: UICC III, n = 21; D: UICC IV, N = 23; E: adenoma, n = 28.

Figura 5

30 La figura, muestra las curvas ROC para ASC: Cáncer colorrectal versus controles sanos (línea continua; ROC: 88%), cáncer colorrectal versus controles sanos y controles de enfermedad (línea discontinua; ROC: 83%) y cáncer colorrectal versus controles sanos, controles de enfermedad y otros cánceres. El eje x, indica el valor computado substrayendo 1 del valor de especificidad. El eje y, indica la sensibilidad. En ambos, el valor de 1, corresponde al 100%. Cáncer colorrectal: 109 muestras. Controles sanos: 317 pacientes. Controles de enfermedad: 87 muestras. Otros cánceres: 272 muestras.

Figura 6

40 La figura, muestra las curvas ROC para ASC, CYFRA 21-1 y NNMT: Cáncer colorrectal versus controles sanos y controles de enfermedad. La ASC, se indica mediante la línea continua, CYFRA 21-1, se indica mediante la línea de puntos, y el NNMT, se indica mediante la línea discontinua. El eje x, indica el valor computado substrayendo 1 del valor de especificidad. El eje y, indica la sensibilidad. En ambos, el valor de 1, corresponde al 100%. Cáncer colorrectal: 109 muestras. Controles sanos: 317 pacientes. Controles de enfermedad: 87 muestras. Otros cánceres: 272 muestras.

Figura 7

50 La figura, muestra las curvas ROC para ASC, CEA, CA 19-9 y NSE: cáncer colorrectal versus controles sanos y controles de enfermedad. La ASC, se indica mediante la línea continua, CEA, se indica mediante la línea de puntos, y el CA 19-9, se indica mediante la línea discontinua. El eje x, indica el valor computado substrayendo 1 del valor de especificidad. El eje y, indica la sensibilidad. En ambos, el valor de 1, corresponde al 100%. Cáncer colorrectal: 109 muestras. Controles sanos: 317 pacientes. Controles de enfermedad: 87 muestras. Otros cánceres: 272 muestras.

Abreviaciones

55	ABTS	Sal diamónica de 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolona sulfonato (6)]
60	BSA	Albúmina de suero bovino
	cDNA	DNA complementario
	CHAPS	(3-[(3-colamidopropil)-dimetilamino]-1-propano-sulfonato)
65	DMSO	Dimetilsulfóxido

ES 2 323 429 T3

	DTT	Ditiotritol
	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
5	ELISA	Ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas
	HRP	Peroxidasa del rábano salvaje
10	IAA	Yodoacetamida
	IgG	Inmunoglobulina G
	IEF	Focalización isoelectrica
15	IPG	Gradiente pH inmovilizado
	LDS	Dodecilsulfato de litio
20	MALDI-TOF	Tiempo desorción/ionización por láser asistido mediante matriz, de espectrometría de masas
	MES	Mesitol,2,4,6-trimetilfenilo
	OD	Densidad óptica
25	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
	PBS	Suero salino tamponado con fosfato
30	PI	Punto isoelectrico
	RTS	Sistema de traducción rápida
	SDS	Dodecilsulfato de sodio

35

Ejemplo 1

Identificación de la ASC, como marcador potencial de cáncer

40

A continuación de una validación inicial de la ASC utilizando muestras de tejido enfermo y de tejido normal procedente de pacientes con cáncer de pecho, el marcador, se somete a test de ensayo para otros cánceres y, particularmente, para el cáncer colorrectal (véase la tabla 6 facilitada más abajo, a continuación). Adicionalmente, además, se analizan muestras de suero y de plasma procedentes de pacientes con cáncer colorrectal. Como resultado, para este tipo de

45

cáncer, los datos indican la utilidad del ASC como marcador bioquímico.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos al marcador de la proteína ASC

50

Se genera un anticuerpo policlonal al marcador de cáncer de proteína de ASC, para su uso adicional como anticuerpo, en la medición de los niveles de ASC en suero y plasma y sangre, mediante ensayos de inmunodelección, como por ejemplo, Transferencia Western y ELISA.

55

Con objeto de generar anticuerpos a la ASC, se realiza una expresión recombinante de la proteína, para la obtención de inmunógenos. La expresión, se realiza aplicando un combinación de sistema de expresión RTS 100 y *E. coli*. En una primera etapa, la secuencia de DNA, se analiza, y se obtienen recomendaciones para variantes mutacionales silenciosas de cDNA de alto rendimiento, y las respectivas secuencias de cebadores de PCR, utilizando el sistema "ProteoExpert RTS *E. coli* HY". Éste es su servicio comercial basado en una dirección electrónica en Internet (www.proteoexpert.com). Usando los pares de cebadores recomendados, se utiliza el sistema de generación moldes lineales de *E. coli* "RTS 100 *E. coli* Lineal Template Generation Set, His-tag" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº cat. 3186237), para generar moldes lineales a partir de cDNA, para la transcripción y expresión *in vitro* de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína ASC. Para la detección mediante transferencia Western y la purificación posterior, la proteína expresada, contiene un a His-tag. Se identifica la mejor variante de expresión.

60

Todas las etapas desde la PCR hasta la expresión y detección, se llevan a cabo en concordancia con las instrucciones del fabricante. El producto respectivo de PCR, que contiene todas regiones reguladoras necesarias de T7 (promotor, sitio de enlace ribosómico, y terminador T7), se clona en el vector pBAD TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, nº

65

ES 2 323 429 T3

de cat. K 4300/01), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la expresión, utilizando las secuencias reguladoras de T7, la construcción, se transforma en *E. coli* BL 21 (DE 3)(Studier, F.W., *et al.*, Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89) y las bacterias transformadas, se cultivan en un lote 11, para la expresión de proteínas.

5 La purificación de la proteína de fusión His-ASC, se realiza siguiendo los procedimientos standard en una columna de quelato de níquel. En resumen, se procede a granular el lote 11 de cultivo de bacterias que contiene el vector de expresión para la proteína de fusión His-ASC, mediante centrifugación a alta velocidad y, el sobrenadante, se aplica a una columna cromatográfica de quelato de níquel. La columna, se lava con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis, seguido por lavados con tampón que contiene fosfato, pH 8,0 y urea. Finalmente, el antígeno enlazado, se eluye
10 utilizando un tampón de fosfato que contiene SDS, bajo condiciones ácidas.

Síntesis de conjugados de hemocianina-péptidos, para la generación de anticuerpos

15 La síntesis, se realiza utilizando química heterobifuncional (química de maleimida/SH). Se acoplan péptidos seleccionados de ASC que contienen cisteína, a hemocianina activada con 3-maleiminoil-N-hidroxi-succinimidéster (MHS, procedentes de Concholepas concholepas (Sigma, B-8556).

20 La hemocianina, se lleva a 10 mg/ml en 100 mM NaH₂PO₄, pH 7,2). Por ml de hemocianina, se añaden 100 μ l de MHS (12, mg en DMSO) y se procede a incubar durante un transcurso de tiempo de 1 hora. La muestra, se dializa durante el transcurso de toda la noche, contra 10 mM NaH₂PO₄/NOH, pH 6,5 y se ajusta a 6 mg/ml, con tampón de diálisis. Se procedió a disolver una cisteína seleccionada que contenía péptido de ASC, en DMSO (5 mg/ml, para un péptido de 1500 Dalton). Por ml de hemocianina activada con MHS (6 mg/ml), se añadieron 20 μ l de 100 mM EDTA, pH 7,0 y 100 μ l del péptido de ASC seleccionado que contiene cisteína. Después de un transcurso de tiempo de 1 hora,
25 se procede a bloquear los grupos restantes de maleimina, mediante la adición de 10 μ l de 0,5 M cisteína/HCl, por ml de mezcla de reacción. La preparación, se utiliza para la inmunización, sin purificación adicional.

Expresión y purificación de la proteína de fusión recombinante

30 Con objeto de generar anticuerpos a la ASC, se procede a llevar a cabo una expresión recombinante de una proteína de fusión SlyD-ASC, para obtener inmunogenes, de una forma análoga al procedimiento descrito por Scholtz, C., *et al.* J. Mol. Biol. 345 (2005) 1229-1241. Así, por lo tanto, se construye un vector de expresión, que contienen un gen que codifica a la SlyD-(GGGS)₅-GGG-IEGR, ASC-GGGs-HHHHHH. Para la purificación y la detección mediante
35 transferencia Western, la construcción, contiene un carboxiterminal His-Tag(HHHHHH). Se inserta un Engarce de GS ((GGGS)₅-GGG) y un sitio de segmentación para el Factor Xa(IEGR), entre la SlyD y la ASC. Se lleva a cabo al expresión en *E. coli*, bajo control del promotor T5.

40 En una primar etapa, se procede a llevar a cabo una PCR, utilizando el vector pSO60 (pET24 que porta una casete de expresión que codifica a la SlyD-(GGGS)₅-GGG-SlyD), como un molde. Mediante la utilización del cebador 1 (SEQ ID NO: 2) y del cebador 2 (SEQ ID NO: 3), se obtiene monoSlyD, que porta un sitio de ECO-RI y un sito de enlace ribosómico en el extremo 5' y un sitio de BamHI, la secuencia de codificación de IEGR y un sitio de SacI en el extremo 3', respectivamente. El producto de PCR generado, se clona como un fragmento de EcoRI/SacI, en pQE80L (Quiagen, Hilden), proporcionando pQE80-SlyD.

45 En segundo lugar, se procede a amplificar ASC, a partir de pBC14 (pET24 que porta ASC), como un molde. Mediante la utilización del cebador 3 (SEQ ID NO: 4) y el cebador 4 (SEQ ID NO: 5), se insertan un sitio de BAMHI, una secuencia de codificación de IEGR en el extremo 5', así como una secuencia de codificación de GGGs-HHHHHH, y un sitio de HindIII adicional en el extremo 3'.

50 Este producto de PCR, se clona, como un fragmento de BamHI/HindIII, en pQE80-SlyD, dando como resultado la construcción de expresión final (pQE80-SlyD-ASC). Todas las etapas de PCR y de clonación, se realizan en concordancia con las instrucciones del fabricante.

55 Para la expresión bajo control del promotor T5, las células *E. coli* C600, (Stratagene, Heidelberg), se transforman con el constructor final. La células de expresión, se cultivan en un lote 11, para la producción de proteínas.

60 La purificación de la proteína de fusión HIS-SlyD-ASC, se realiza mediante la utilización de procedimientos standard sobre una columna de quelato de Ni. En resumen, se procede a granular, mediante centrifugación, 1 litro de cultivo de bacteria que contiene el vector de expresión para la proteína de fusión SlyD-ASC-His. El gránulo de células, se resuspende en tampón de lisis, que contiene Tris/HCl, pH 8, CHAPS, EDTA y lisozima, seguido de homogeneización, utilizando Ultra-Turrax®. El DNA, se degrada enzimáticamente, mediante la adición de cloruro magnésico y DNasa. Los cuerpos de inclusión, se granulan mediante centrifugación. El gránulo, se disuelve en un tampón de fosfato, pH 0,7, 7 M cloruro de guanidinio, y se carga sobre una columna de quelato de níquel. La columna, se lava con varios
65 volúmenes de lecho de tampón fosfato, pH 8,0, 7M cloruro de guanidinio. A continuación, se reemplaza el tampón de fosfato, pH 8,0, 7M cloruro de guanidinio, por tampón de fosfato, pH 8,0, NaCl, con objeto de inducir el replegado de la proteína de enlace matriz. La proteína de fusión replegada, se eluye mediante tampón de fosfato, pH 8,0, NaCl, imidazol.

ES 2 323 429 T3

Producción de anticuerpos monoclonales contra la ASC

a) *Inmunización de ratones*

5 Se procede inicialmente a inmunizar ratones A/J de 12 semanas de edad, con 100 μg de ASC, proteína de fusión o conjugado de hemocianina-péptido (véase anteriormente, arriba). A esta acción, le siguen, después de un transcurso de tiempo de 6 semanas, dos inmunizaciones intraperitoneales adicionales, a intervalos de un mes. En este proceso, a cada ratón, se le administran 100 μg de ASC ó conjugado de hemocianina-péptido, adsorbido a hidróxido de aluminio y 10⁹ gérmenes de Bordetella pertussis. Subsiguientemente, las dos últimas inmunizaciones, se llevan a cabo por vía
10 intravenosa, en el 3^{er} y 2^o día antes de la fusión, utilizando 100 μg de ASC ó conjugado de hemocianina-péptido en tampón de PBS, para cada uno de ellos.

b) *Fusión y clonación*

15 Se procede a fusionar células esplénicas, de los ratones inmunizados en concordancia con a), con células de mieloma, en concordancia con Galfre, G y Milstein, C., Methods in Enzymology-Procedimientos en Enzimología 73 (1981) 3-46. En este procedimiento, se procede a mezclar aproximadamente 1×10^8 células esplénicas de los ratones inmunizados, con 2×10^7 células de mieloma (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL 1580) y se centrifugan (durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a 300 x g, y a una temperatura de 4°C). Se procede, a continuación, a lavar las células, una vez, con medio RPMI 1640, sin suero de ternero fetal (FCS) y se centrifugan de nuevo, a 400 x g, en un tubo cónico de 50 ml. Se separa el sobrenadante y, el sedimento de células, se afloja cuidadosamente, mediante golpecitos o palmaditas, se añade 1 ml de PEG (peso molecular, 4000, Merck, Darmstad), y se mezcla, mediante pipeteado. Después de un transcurso de tiempo de 1 minuto en un baño de agua caliente, a una temperatura de 37°C, se procede a añadir, por procedimiento de goteo, 5 ml de RPMI 1640 sin FCS, a la temperatura ambiente, en un transcurso de tiempo de 4-5 minutos. A continuación, se procede a añadir 5 ml de RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS, por procedimiento de goteo, en un transcurso de tiempo de aproximadamente 1 minuto, se mezcla cuidadosamente, a fondo, se llena hasta 50 ml con medio (RPMI 1640 + 10% FCS) y, subsiguientemente, se centrifuga durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a 400 x g, y a una temperatura de 4°C. Las células sedimentadas, se recogen en medio RPMI 1640 que contienen un 10%
30 de FCS, y se siembran en medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmol/l hipoxantina, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ azaserina en RPPMI 1640 + 10% FCS). Se procede a añadir interleuquina 6 al medio, a 100 U/ml, como un factor de crecimiento.

Después de un transcurso de tiempo de aproximadamente 10 días, los cultivos primarios, se someten a test de ensayo, para un anticuerpo específico. Los cultivos primarios ASC-positivos, se clonan en placas de cultivo de 96 hoyos, por mediación de un clasificador de células, activado mediante fluorescencia. En este procedimiento, se procede a añadir, otra vez, interleuquina 6, al medio, a razón de 100 U/ml, como un aditivo de crecimiento.

c) *Aislamiento de inmunoglobulina a partir de sobrenadantes de cultivos de células*

40 Se procede a sembrar las células de hibridoma obtenidas, a una densidad de 1×10^5 células, en medio RPMI 1640 con un contenido de un 10% de FCS, y éstas proliferaron durante un transcurso de tiempo de 7 días, en un fermentador (Thermodux Co., Werheim/Main, Modelo MCS-104XL, n° de pedido 144-050). Se obtienen, como media, unas concentraciones de 100 μg de anticuerpo monoclonal por ml, en el sobrenadante de cultivo. Se procede a llevar a cabo la purificación de este anticuerpo, a partir del sobrenadante de cultivo, mediante procedimientos convencionales en la química de las proteínas (por ejemplo, en concordancia con Bruck, C., *et al.*, Methodes in Enzymology 121, -Procedimientos en Enzimología, 121-, (1986) 587-695).

50 *Generación de anticuerpos monoclonales*

a) *Inmunización*

55 Para la inmunización, se procede a preparar una emulsión fresca de la solución de proteínas (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ASC, proteína de fusión de conjugado de hemocianina-péptido), y un adyuvante completo de Freund, a un valor de relación 1:1. Cada conejo, se inmuniza con 1 ml de la emulsión, en los días 1, 7, 14, 30, 60 y 90. Se extrae sangre y, el suero anti-ASC resultante, se utiliza para experimentos adicionales, tal y como se describen en los ejemplos 3 y 4.

b) *Purificación de IgG (inmunoglobulina G) a partir de suero de conejo, mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico*

60 Se procede a diluir un volumen de suero del conejo con 4 volúmenes de tampón de acetato (60 mM, pH 4,0). El pH, se ajusta a un valor de 4,5, con 2 M base Tris. Se añade ácido caprílico (25 $\mu\text{l}/\text{ml}$ de la muestra diluida), por procedimiento de goteo, bajo la acción de agitación vigorosa. Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, la muestra, se centrifuga (13.000 x g, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, a una temperatura de 4°C), se desecha el gránulo y se recoge el sobrenadante. El pH del sobrenadante, se ajusta a un valor pH de 7,5, mediante la adición de 2 M base Tris, y se filtra (0,2 μm).

ES 2 323 429 T3

Se procede a precipitar la inmunoglobulina en el sobrenadante, bajo la acción de una agitación vigorosa, mediante la adición, por procedimiento de goteo, de una solución 4 M de sulfato amónico, a la concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas, se recogen mediante centrifugación (8.000 x g, 15 minutos, 4°C).

- 5 Se desecha el sobrenadante. El gránulo, se disuelve en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl, y se dializa exhaustivamente. El dializado, se centrifuga (13.000 x g, 15 minutos, 4°C) y se filtra (0,2 μm).

Biotinilación de IgG de conejo, policlonal

- 10 Se procede a llevar la IgG de conejo, policlonal, a 10 mg/ml, en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl. Por ml de solución de IgG, se añaden 50 μl de Biotin-N-hidroxisuccinamida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos a la temperatura ambiente, la muestra, se cromatografía sobre Superdex[®] 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl). Se recolecta la fracción que contiene IgG bitotinilada. Los anticuerpos
15 monoclonales, se biotinilan en concordancia con el mismo procedimiento.

Digoxigenilación de IgG de conejo, policlonal

- 20 La IgG de conejo, policlonal, se lleva a 10 mg/ml, en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl. Por ml de solución de IgG, se añaden 50 μl de éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaprónico, (Roche Diagnóstics, Mannheim, Alemania, N° de Cat. 1 333 054)(3,8 mg/ml en DMSO). Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos a la temperatura ambiente, la muestra, se cromatografía sobre Superdex[®] 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl). Se recolectan las fracciones que contienen IgG digoxigenilada.
25 Los anticuerpos monoclonales, se marcan con digoxigenina, en concordancia con el mismo procedimiento.

Ejemplo 3

- 30 *Transferencia Western para la detección de ASC en muestras de suero y de plasma humanos*

- Se procede a llevar a cabo SDS-PAGE y transferencia de Western, utilizando los reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Muestras de plasma humano, se diluyen, a un valor de relación 1:20, en un tampón de muestra de LDSA, de reducción, NuPAGE[®] (Invitrogen), y se procede a calentar durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, a una temperatura de 95°C. Se procesan 10 μl de alícuotos en un 4-12% de geles de (Bis-Tris), en el sistema tampón de procesado de MES. La mezcla de proteínas separadas en gel, se somete a transferencia, en membranas de microcelulosa, utilizando el Módulo de transferencia del tipo XCELL II[®] Blot Module (Invitrogen) y el sistema de tampón de transferencia NuPAGE[®]. Las membranas, se lavan 3 veces, en PBS/0,05% Tween-20, y se bloquen con tampón de bloqueo del tipo SuperBlock Blocking Buffer (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). El anticuerpo primario biotinilado, se diluye en el tampón de bloqueo del tipo SuperBlock Blocking Buffer (0,01-0,2 μg/ml) y se incuba con la membrana, durante un transcurso de tiempo de 1 hora. La membranas, se lavan 3 veces en PBS/0,05% Tween-20. El anticuerpo primario biotinilado específicamente enlazado, se marca con un conjugado de de Espstreptavidina-HRP (20 μ_{ABTS}/ml en tampón de bloqueo del tipo SuperBlock Blocking Buffer). Después de incubación, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, la membrana, se lava 3 veces en PBS/0,05% Tween-20. El conjugado de estreptavidina-HRP, se detecta utilizando un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Femto Substrate, Pierce Biotechnology, Inc. Rockford, IL, USA) y película auto-radiográfica. Los tiempos de exposición, varían desde los 10 minutos hasta toda la noche.

- 50 Ejemplo 4

ELISA para la medición de ASC en muestras de suero y de plasma humano

- 55 Para la detección de ASC en suero o plasma humanos, se desarrolla un sándwich ELISA. Para la captura de detección del antígeno, se procede a conjugar alícuotos de anticuerpo policlonal anti-ASC (véase el ejemplo 2) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

- Se procede a incubar placas de microhoyos provistas de 96 hoyos, con 100 μl anticuerpo policlonal anti-ASC biotinilado, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a 10 μg/ml, en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Después de la incubación, las placas, se lavan tres veces con 0,9% NaCl, 0,1 Tween 20. Se procede, a continuación, a incubar los hoyos, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, bien ya sea con una dilución de serie de la proteína recombinante (véase el ejemplo 2), como antígeno standard, o bien ya sea con muestras líquidas diluidas, obtenidas de pacientes. Después del enlace de la ASC, las placas, se lavan tres veces con 0,9% NaCl, 0,1% Tween 20. Para la detección específica de ASC enlazada, los pozos, se incuban con 100 μl de anticuerpo policlonal anti-ASC digoxigenilado, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a 10 μg/ml, en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. A continuación, las placas, se lavan tres veces, con objeto de retirar anticuerpo no enlazado. En una etapa siguiente, los hoyos, se incuban con 20 mU/ml de conjugados de anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 1633716), durante un transcurso de tiempo de 60

ES 2 323 429 T3

minutos, en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. A continuación, las placas, se lavan tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, los hoyos, se incuban con 10 μ de solución de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo 11685767), y la OD, se mide después de un transcurso de tiempo de 30-60 minutos, a 405 nm, con lector de ELISA.

5

Ejemplo 5

Evaluación, sensibilidad y especificidad del marcador

10

Análisis de ROC para valorar la utilidad clínica, en términos de exactitud del diagnóstico

La exactitud o precisión, se valora procediendo a analizar muestras líquidas obtenidas de cohortes de pacientes bien caracterizados. El colectivo de control A (véase la Tabla 1), contiene 317 individuos que comprenden 271 donantes de sangre y 46 pacientes que han experimentado colonoscopia. El colectivo de control B, comprende 87 pacientes con enfermedades no cancerosas.

15

Los 109 pacientes con cáncer colorrectal (colectivo C), comprenden tumores de diferentes etapas (Tabla 2, Tabla 4). Adicionalmente, además, en el análisis, se incluyen 27 muestras en una etapa precancerosa (colectivo D). Con objeto de analizar la especificidad con respecto a otros cánceres, en el cohorte de muestras, se incluyen 272 pacientes con otros tumores (colectivo E). El cohorte, se resume en la Tabla 2; La tabla 3, proporciona detalles para los pacientes con cánceres gastrointestinales.

20

Los CA 19-9, CYFRA 21-1 y CEA, se miden mediante ensayos comercialmente obtenibles en el mercado (Roche Diagnostics, ensayo de CA 19-9: n° de cat. 11776193, ensayo de CYFRA 21-1, n° de cat. 11820966, ensayo de CEA n° de cat. 1731629) para el analizador de inmunoensayos de Elecsys®Systems). La NNMT, se mide utilizando el procedimiento del ejemplo 4 y anticuerpos, según se describe en la publicación de patente internacional WO 2004/057 336. Se ha desarrollado un inmunoensayo realizado en casa, para la medición de la ASC. Este ensayo, se realiza en un formato de placa de microtitulación. Se utilizan placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Se utiliza un anticuerpo policlonal biotinilado a la ASC, como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal digoxigenilado a la ASC, como segundo compañero, en este ensayo sándwich. El complejo sándwich formado, se visualiza finalmente mediante un conjugado antidigoxigenina-peroxidasa del rábano salvaje y sustrato apropiado de peroxidasa.

30

35

TABLA 1

Colectivo de pacientes, controles

40

A) Pacientes sanos Σ		317
45	Donantes de sangre, de 30 - 40 años de edad	150
50	Donantes de sangre, emparejados por edad	121
55	Controles de colonoscopia negativos	46
60	B) Controles de enfermedad Σ	87
65	Diverticulosis	50
	Diverticulitis	7
	Colitis	12

ES 2 323 429 T3

5	Enfermedad inflamatoria del intestino (Morbus Crhon, collitis ulcerativa, diarrea recidivante inflamatoria	10
10	Úlcera	19
	Otras enfermedades del intestino	1

TABLA 2

Colectivo de pacientes, pacientes con cáncer

25	C) Total de pacien- tes con cáncer colorrectal	109	
30		Colectivo (a)	69
		Colectivo (b)	40
35	D) Estado precanc- eroso	Colectivo (c), adenoma < 1 cm; pre-canceroso	27
40	E) Total de pacien- tes con otros cánceres		272
45		Cánceres gastrointestinales no CRC	21]
50		Cánceres ginecológicos	71
55		Cánceres de pecho	90
		Cáncer de pulmón	20
60		Cáncer de próstata	51
		Cáncer de vejiga	19
65		Otros cánceres	1

ES 2 323 429 T3

TABLA 3

Colectivo de pacientes, pacientes con otros cánceres GI

Total		21
	Cáncer de estómago	20
	Cáncer de páncreas	1

TABLA 4

Cáncer colorrectal-etapas de la enfermedad

Total		109
	UICC 0	3 (3%)
	UICC I	33 (30%)
	UICC II	23 (21%)
	UICC III	21 (19%)
	UICC IV	23 (21%)
	Etapas desconocidas	6 (6%)

La figura 2, recopila los datos obtenidos con las muestras de control (Tabla 1) de suero y plasma. La figura, muestra el hecho de que, más muestras de los controles de enfermedad que los controles sanos, exhiben altos valores de ASC. Teniendo en cuenta este descubrimiento, el valor de corte, se define como definiendo al porcentaje del 90% de todos los controles.

Específicamente con respecto a los controles de enfermedad, la Tabla 5, comparte la especificidad del marcador ASC con las especificidades de NMMT, CA 19-9, CEA y CYFRA 21-1. De la misma forma que para la ASC, el valor de corte de cada otro marcador, define el porcentaje del 90% de todos los controles.

ES 2 323 429 T3

TABLA 5

Especificidad de la ASC y de otros marcadores de tumores en controles de la enfermedad (Colectivo de pacientes B)

Número de pacientes	ASC	NNMT	CA 19-9	CEA	CYFRA 21-1
87	67,8%	75,9%	85,1%	83,9%	85,5%
50	76%	76%	82%	80%	52%
7	43%	57%	100%	86%	100%
12	58%	67%	92%	83%	75%
10	70%	90%	80%	100%	70%

Se evalúa la especificidad de la ASC, procediendo a someter a test de ensayo las muestras de suero y de plasma procedentes de pacientes diagnosticados con otros cánceres. La especificidad, se compara con respecto a otros marcadores utilizados. En la Tabla 6, se recopilan los resultados.

TABLA 6

Especificidad de la ASC y de otros marcadores de cáncer, con respecto a otros cánceres (Colectivo de pacientes E)

Número de pacientes	ASC	NNMT	CA 19-9	CEA	CYFRA 21-1
272	57,7%	76,1%	81,6%	82,4%	62,9%
90	58%	89%	87%	83%	71%
20	35%	45%	60%	75%	15%
28	46%	50%	68%	82%	18%
27	67%	74%	81%	93%	89%
12	67%	67%	75%	83%	75%
20	10%	40%	95%	60%	25%
19	68%	89%	95%	95%	89%
51	80%	96%	82%	84%	82%

ES 2 323 429 T3

Con objeto de evaluar la sensibilidad con respecto a la ASC, se procede a analizar muestras de suero y de plasma procedentes de pacientes diagnosticados con CRC en diferentes etapas. En las tablas 7 a/b y 8, se recopilan los resultados. Las distribuciones, de los valores medidos para la ASC y el CEA, se muestran en la Figura 3 y en la Figura 4, respectivamente.

5

TABLA 7a

Sensibilidad con respecto al cáncer colorrectal

10

	Número de pacientes	ASC	NNMT	CA 19-9	CEA	CYFRA 21-1
UICC 0	3	100%	67%	33%	67%	33%
UICC I	33	67%	52%	18%	39%	55%
UICC II	23	35%	26%	30%	22%	43%
UICC III	21	43%	67%	38%	48%	71%
UICC IV	23	74%	74%	57%	83%	74%
Sin etapas	6	0%	67%	0%	33%	33%
Pacientes con CRC sometidos a ensayo	109	54,1%	55%	32,1%	46,8%	57,8%

15

20

25

30

35

TABLA 7b

Sensibilidad con respecto a una etapa precancerosa

40

	Número de pacientes	ASC	NNMT	CA 19-9	CEA	CYFRA 21-1
Adenoma > 1 cm	27	18,5%	22,2%	11,1%	25,9%	25,9%

45

50

55

60

Se procede a realizar un análisis de ROC, en concordancia con Zweig, M. H., y Campbell, mencionado anteriormente, arriba. Se encuentra que, el potencial discriminatorio para pacientes de diferenciación en el grupo de cáncer colorrectal, procedentes del grupo de control sano, tal y como se mide mediante el área que se encuentra bajo la curva/(AUC), es por lo menos tan bueno, o incluso mejor, para la ASC (88%), al compararse con los otros marcadores sometidos a tests de ensayo. Cuando el colectivo de cáncer colorrectal se compara con todos los controles, incluyendo los controles de enfermedad, el poder discriminatorio de la ASC, es todavía por lo menos igual, si no mejor, que el del marcador CYFRA 21-1. Adicionalmente, además, el poder discriminatorio de la ASC, es notablemente mejor que el de la NNMT. Los resultados, se proporcionan en la Tabla 8 y en las figuras 5 y 6.

65

ES 2 323 429 T3

TABLA 8
Análisis ROC

		ASC	NNMT	CA 19-9	CEA	CYFRA 221-1
5						
10	Cáncer de colon	88%	84%	72%	77%	84%
15	Cáncer de colon / controles sanos + controles de enfermedad	83%	80%	70%	75%	82%
20	Cáncer de colon / controles sanos + controles de enfermedad + otros cánceres	72%	75%	66%	73%	75%
25						

25 Tal y como resulta claro a raíz de los datos mostrados, aparte de indicar tumores, la ASC, es también elevada, en controles de enfermedades del intestino. A pesar de la más baja especificidad a los controles de enfermedades del intestino, los controles de diferenciación entre las muestras de cáncer de colon y controles (sanos + enfermedad), es mejor que los para los otros marcadores de rutina CEA y CA 19-9.

30 Ejemplo 6

35 *Panel de marcadores*

35 Tal y como se muestra en el Ejemplo 5, la ASC, es un prometedor candidato para la evaluación, como un miembro, en el panel de marcadores para el colon.

40 Los algoritmos de clasificación, se generan con el análisis discriminario regularizado (RDA-del inglés Regularized Discriminant Analysis, el cual es una generalización de análisis discriminario común, es decir, Análisis Discriminatorio Cuadrático y Lineal (McLachlan, G. J., Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Series in probability and mathematical statistics, 1992, -Análisis discriminatoiro y reconocimiento estadístico de modelos patrón-, Series Wiley en probabilidades y estadísticas matemáticas, 1992)-.

45 En el RDA, se utilizan alternativas a las estimaciones de probabilidades máximas usuales (complemento o “plug-in”), para las matrices de covarianza. Estas alternativas, se caracterizan por dos parámetros (λ, γ), cuyos valores, se particularizan a situaciones individuales, procediendo a minimizar conjuntamente una estimación basada en muestra del riesgo futuro de clasificación fallida (Friedman, J. H., Regularized Discriminatory Analysis, -Análisis dicriminatorio regularizado-, J. of the American Statistical Assotiation 84 (1989) 165-175). Como un procedimiento alternativo, puede adoptarse el Support Vector Machines algoritms, -Algoritmos mecánicos de vectores de soporte (Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001-, Los elementos del aprendizaje estadístico, Series Springer sobre estadística, 2001), con unos resultados de clasificación comparables. El análisis mediante RDA, se basa en 106 muestras de CRC, y 404 controles sanos/enfermedad.

55 Los paneles de marcadores, se construyen por etapas, partiendo del mejor marcador individual para el problema de de clasificación, y finalizando cuando el incremento en sensibilidad, a un nivel de especificidad del 90%, no cambia ya más, de una forma remarcable. Con objeto de ganar distribuciones centralizadas, cada marcador individual, se transforma con la función logarítmica (log) natural.

60 La Tabla 9, presenta los datos de RDA, obtenidos utilizando un comparación de muestras de CRC versus muestras de control sanos/enfermedad, ajustándose, la especificidad, a un 90%. Se tomará debida nota en cuanto al hecho de que, la ASC, tiene la mejor área ROC bajo la curva de todos los marcadores de tumores sometidos a tests de ensayo.

65

ES 2 323 429 T3

TABLA 9

Análisis univariado

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Marcador	ROC-AUC	Sensibilidad
CEA	0,75	42,7
CA 15-3	0,53	15,1
CA 125	0,63	26,4
CA 19-9	0,70	31,1
CA 72-4	0,64	26,4
CYFRA 21-1	0,82	60,4
NSE	0,54	31,1
AFP	0,50	11,3
NNMT	0,80	52,8
ASC	0,83	54,7

Las tablas 10 y 11, muestran los resultados del análisis univariado. De una forma sorprendente, la búsqueda para la mejor combinación de 2, 3, 4 y 5 marcadores diferentes, conduce a la observación de que, las combinaciones que incluyen al CEA (y también al CA 19-9), parecen ser inferiores. La mejor combinación encontrada en base al presente juego o conjunto de muestras, incluye a los CYFRA 21-1, NSE y ASC. Este resultado, se muestra, de una forma ejemplificada, mediante la Tabla 11, la cual refleja los resultados con diferentes combinaciones que incluyen al CEA.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 323 429 T3

TABLA 10
Análisis multivariado (1)

Número de marcadores	Panel de marcadores	Procedimiento (RDA)	Validación cruzada (por cinco veces)		
			Error total	Sensibilidad	Especificidad
1	log_CYFRA 21-1	$\lambda=0,25; \gamma=0$	0,16322	59,7%	90,3%
2	log_CYFRA 21-1, log_NSE	$\lambda=0; \gamma=0,75$	0,14052	69,6%	90,5%
3	log_CYFRA 21-1, log_NSE, log_ASC	$\lambda=0,5; \gamma=0$	0,12260	78,7%	90,2%
4	log_CYFRA 21-1, log_NSE, log_ASC, log_NNMT	$\lambda=0,5; \gamma=0$	0,12807	76,4%	90%
5	log_CYFRA 21-1, log_NSE, log_ASC, log_NNMT, log_AFP	$\lambda=0,75; \gamma=0$	0,13192	74,7%	90%

TABLA 11

Análisis multivariado (2); marcadores preseleccionados ASC, NNMT, CEA

Número de marcadores	Panel de marcadores	Procedimiento (RDA)	Validación cruzada (por cinco veces)		
			Error total	Sensibilidad	Especificidad
2	log_ASC, log_CEA	$\lambda=0,25; \gamma=0,25$	0,16287	58%	90,6%
2	log_NNMT, log_CEA	$\lambda=0,5; \gamma=0$	0,16175	59,3%	90,3%
3	log_NNMT, log_CEA, log_ASC	$\lambda=1; \gamma=0,25+$	0,15828	61,8%	90,1%

Lista de referencias

- Ahlquist**, D.A., *Gastroenterol. Clin. North Am.* 26 (1997) 41-55
- 5 **Aksoy**, S., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14835-14840
- Anderson**, W.F., *et al.*, *J. Natl. Cancer Institute* 94 (2002) 1126-1133
- Anonymous**, *J. Clin. Oncol.* 14 (1996) 2843-287
- 10 **Berman**, J.M., *et al.*, *Lancet* 355 (2000) 395-399
- Bodenmueller**, H., *et al.*, *Int. J. Biol. Markers* 9 (1994) 75-81
- 15 **Borner**, O.P., *Tumor Biol.* 12 (1991) 9-15
- Breiman**, L., Random Forests, *Machine Learning* 45 (2001) 5-32
- Bruck**, C., *et al.*, *Methods Enzymol.* 121 (1986) 587-695
- 20 **Carriquiry**, L.A., and **Pineyro**, A., *Dis. Colon Rectum* 42 (1999) 921-929
- Compton**, C., *et al.*, *Cancer* 88 (2000) 1739-1757
- 25 **Conway**, K.E., *et al.*, *Cancer Research* 60 (2000) 6236-6242
- Diamandis** *et al.* (eds.) *Immunoassay*, Academic Press, Boston (1996)
- Duda**, R.O., **Hart**, P.E., **Stork**, D.G., Pattern Classification, *Wiley Interscience*, 2nd Edition (2001)
- 30 **Duffy**, M.J., *et al.*, *Eur. J. Cancer* 39 (2003) 718-727
- Duffy**, M.J., *Clin. Chem.* 47 (2001) 625-630
- 35 **Ebert** W., *et al.*, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem* 32 (1994) 189-199
- Fletcher**, R.H., *Ann. Int. Med.* 104 (1986) 66-73
- Friedman**, J. H., *J. of the American Statistical Association* 84 (1989) 165-175
- 40 van der **Gaast**, A., *et al.*, *Br. J. Cancer* 69 (1994) 525-528
- Galfre**, G., and **Milstein**, C., *Methods Enzymol.* 73 (1981) 3-46
- 45 **Geenen**, J.E., *et al.*, *Am. J. Dig. Dis.* 20 (1975) 231-235
- Gold**, P. and **Freedman**, S.O., *J. Exp Med* 121 (1965) 439-462
- Goldenberg**, D.M., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda) 57 (1976) 11-22
- 50 **Graham**, R.A., *et al.*, *Ann. Surg.* 228 (1998) 59-63
- Hammarstrom**, S., *et al. Cancer Res.* 49 (1989) 4852-4858
- 55 **Hastie**, Trevor, **Tibshirani**, Robert, **Friedman**, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001
- Herlyn**, M., *et al.*, *J. Clin. Immunol* 2 (1982) 135-140
- 60 **Herrera**, M.A., *et al.*, *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9
- Kassem**, H., *et al.*, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 454-460
- Koprowski**, H., *et al.*, *Somatic Cell Genet* 5 (1979) 957-971
- 65 **Lamerz**, R., NSE (Neuronen-spezifische Enolase), g-Enolase; In: Thomas, L. (ed.), Clinical Laboratory Diagnosis, TH-Books, Frankfurt, 1st English Edition 1998:979-981, 5. deutsche Auflage 1998:1000-1003

ES 2 323 429 T3

- Levine, J.J., *et al.*, *Oncogene* 22 (2003) 3475-3488
- Martell, R.E., *et al.*, *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149
- 5 Masumoto, J., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33835-33838
- Masumoto, J., *et al.*, *J. Histochem. Cytochem.* 49 (2001) 1269-1275
- 10 McConnell, B.B., and Vertino, P.M., *Cancer Research* 60 (2000) 6243-6247
- Moertel, C.G., *et al.*, *JAMA* 270 (1993) 943-947
- Moriani, R., *et al.*, *Anticancer Research* 22 (2002) 4163-4168
- 15 Nakata, B., *et al.*, *British J. of Cancer* (2004) 1-6
- Okamura, A., *et al.*, *Jpn. J. Cancer Res.* 89 (1998) 649-656
- 20 Pepe, M.S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series*, 28 (2003)
- Pietra, N., *et al.*, *Dis. Colon Rectum* 41 (1998) 1127-1133
- 25 Reynoso, G., *et al.*, *JAMA* 220 (1972) 361-365
- Ritts, R.E., Jr., *et al.*, *Int. J. Cancer* 33 (1984) 339-345
- Ruczinski, I., *et al.*, *J. of Computational and Graphical Statistics* 12 (2003) 475-511
- 30 Scholz, C., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 345 (2005) 1229-1241
- Shiohara, M., *et al.*, *Blood* 98 (2001) 229a
- Silvis, S.E., *et al.*, *JAMA* 235 (1976) 928-930
- 35 Sobin, L.H., and Fleming, I.D., *TNM* 80 (1997) 1803-1804
- Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), *TNM Classification of Malignant Tumours*, fifth edition, 1997
- 40 Steinberg, W.M., *et al.*, *Gastroenterology* 90 (1986) 343-349
- Stieber, P. and Fateh-Moghadam, A., Boeringer Mannheim, Cat. No. 1536869 (engl), 1320947 (dtsh). ISBN3-926725-07-9 dtsh/engl., Juergen Hartmann Verlag, Marloffstein-Rathsberg (1993)
- 45 Studier, F.W., *et al.*, *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89
- Sturgeon, C., *Clinical Chemistry* 48 (2002) 1151-1159
- 50 Tijssen, P., *Practice and theory of enzyme immunoassays* 11 (1990) the whole book, especially pages 43-78; Elsevier, Amsterdam
- UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), *TNM Classification of Malignant-Tumours*, fifth edition, 1997
- 55 van der Gaast, A., *et al.*, *Br. J. Cancer* 69 (1994) 525-528
- Virmani, A., *et al.*, *Int. J. Cancer* 106 (2003) 198-204
- Wanebo, H.J., *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 299 (1978) 448-451 WO 2004/057336
- 60 Zweig, M. H., and Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577

65

ES 2 323 429 T3

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para valorar el cáncer colorrectal (CRC), *in vitro*, que comprende las etapas de

5 a) la medición, en una muestra, de la concentración de proteína semejante al moteado asociado a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a la caspasa (ASC),

10 b) opcionalmente, la medición, en una muestra, de la concentración determinada de uno o más marcadores adicionales distintos del cáncer colorrectal, y

c) correlacionar la concentración determinada en la etapa (a), y opcionalmente, las concentraciones determinadas en la etapa b), a la diagnosis de cáncer colorrectal, en donde, un elevado nivel de ASC, es indicativo para CRC.

15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** adicionalmente por el hecho de que, la citada muestra, se selecciona de entre el grupo consistente en suero, plasma, y sangre entera.

20 3. El procedimiento según una de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** adicionalmente por el hecho de que, el citado un marcador o más marcadores adicionales distintos, se selecciona(n) de entre el grupo consistente en NSE, CYFRA 21-1, NNMT, CA 19-9, CA 72-4, y CEA.

4. El procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** adicionalmente por el hecho de que, el citado un marcador o más marcadores adicionales distintos, es CYFRA 21-1.

25 5. El procedimiento según la reivindicación 3, **caracterizado** adicionalmente por el hecho de que, el citado un marcador o más marcadores adicionales distintos, es NSE.

6. Uso de proteína ASC, como una molécula marcadora en la valoración *in vitro* de cáncer colorrectal.

30 7. Uso un panel de marcadores, que comprende ASC y uno o más marcadores adicionales distintos para cáncer colorrectal, en la valoración *in vitro* de cáncer colorrectal.

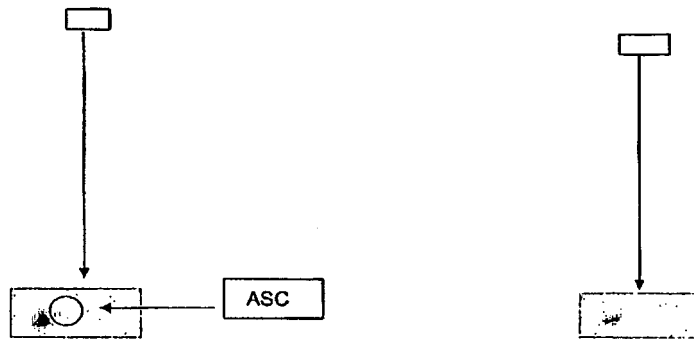
8. Uso del marcador según la reivindicación 7, en donde, el citado un marcador o más marcadores adicionales distintos, se selecciona(n) de entre el grupo consistente en NSE, CYFRA 21-1, NNMT, CA 19-9, CA 72-4, y CEA.

35 9. Uso de un panel de marcadores, según la reivindicación 8, que comprende por lo menos ASC, CYFRA 21-1 y NSE.

Figura 1

Muestra
de tumor

Muestra de control
emparejada



Magnificación del compendio

Figura 2

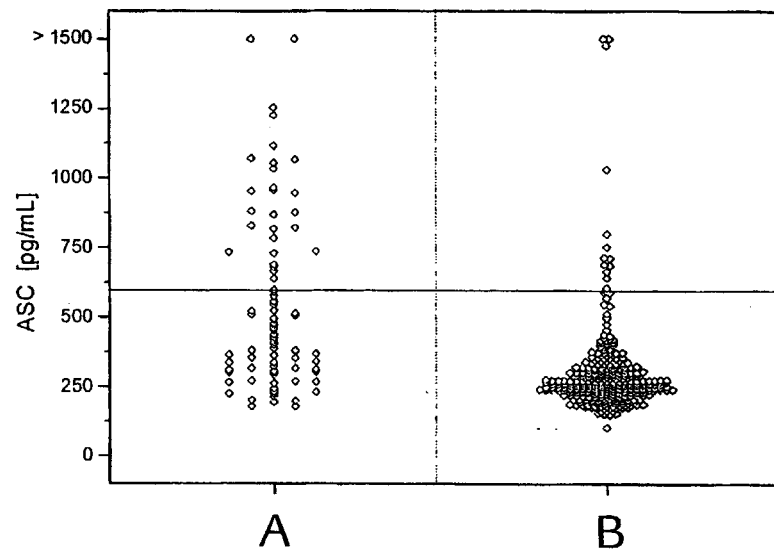


Figura 3

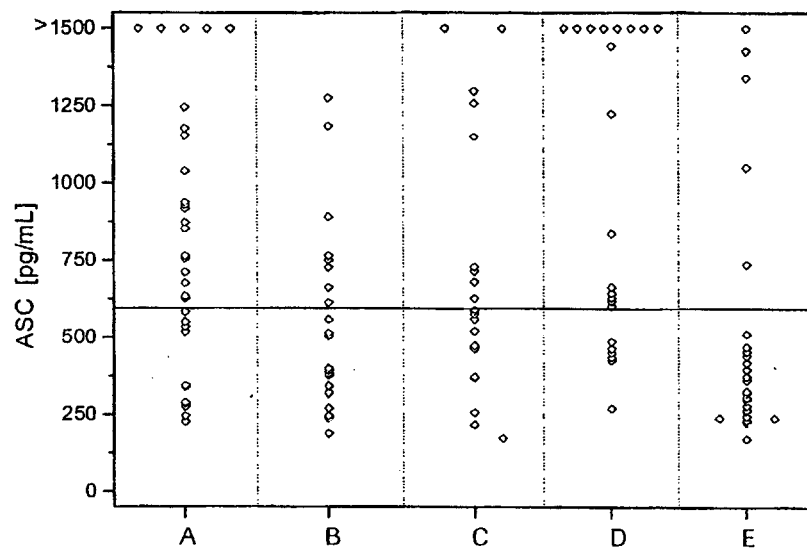


Figura 4

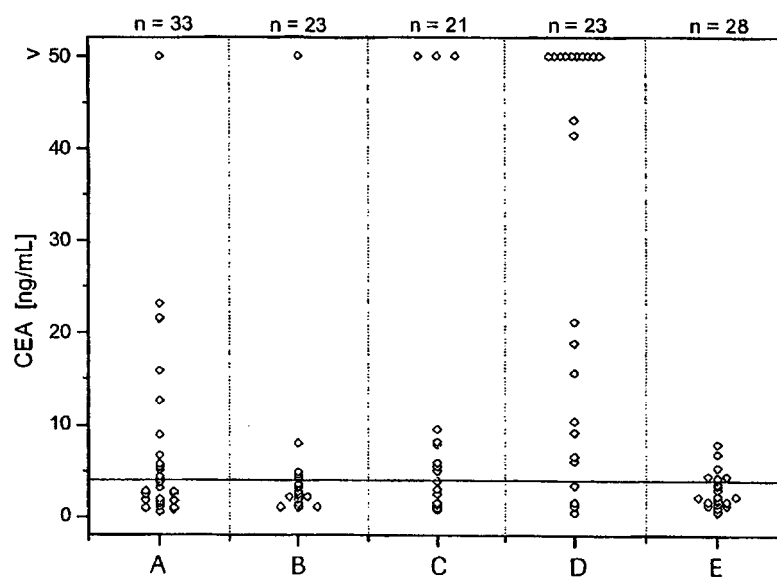


Figura 5

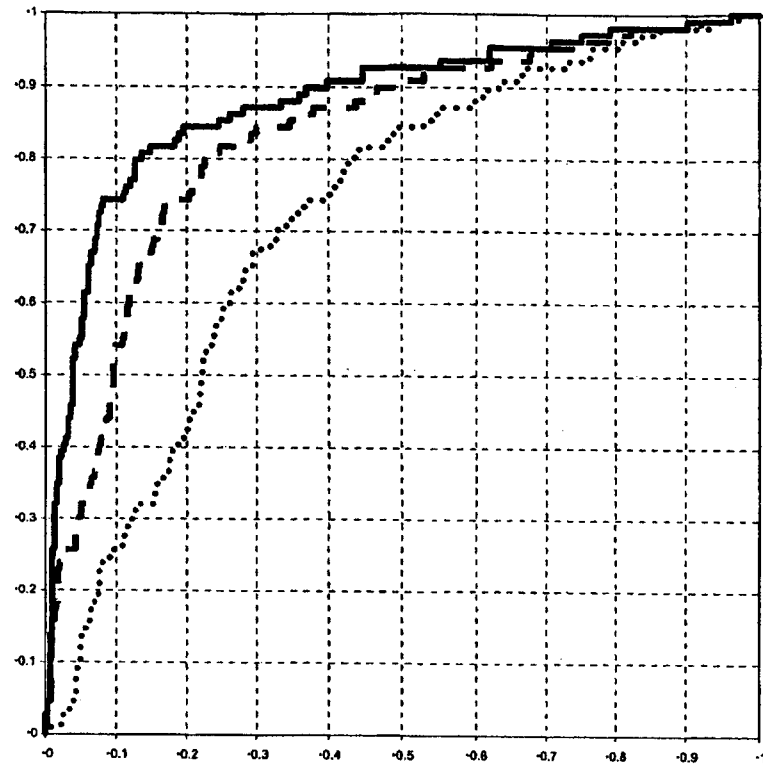


Figura 6

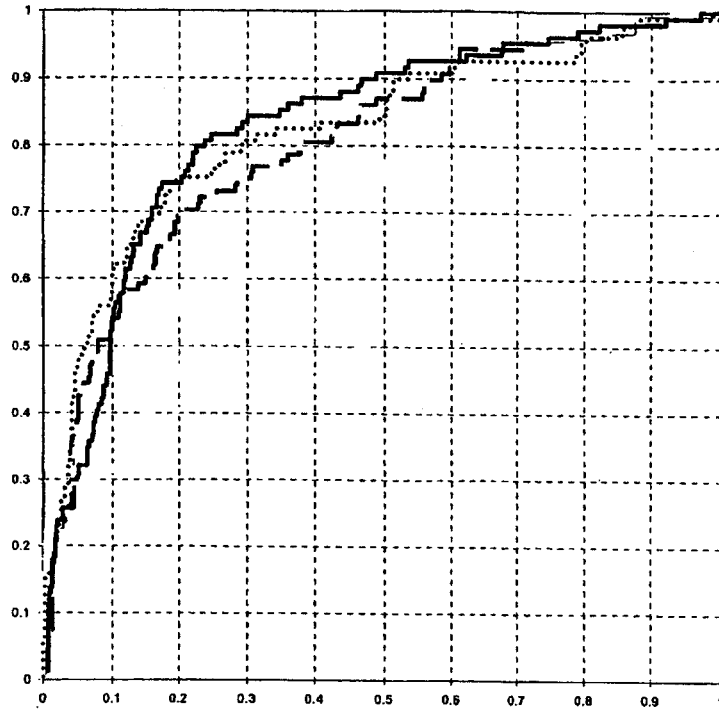
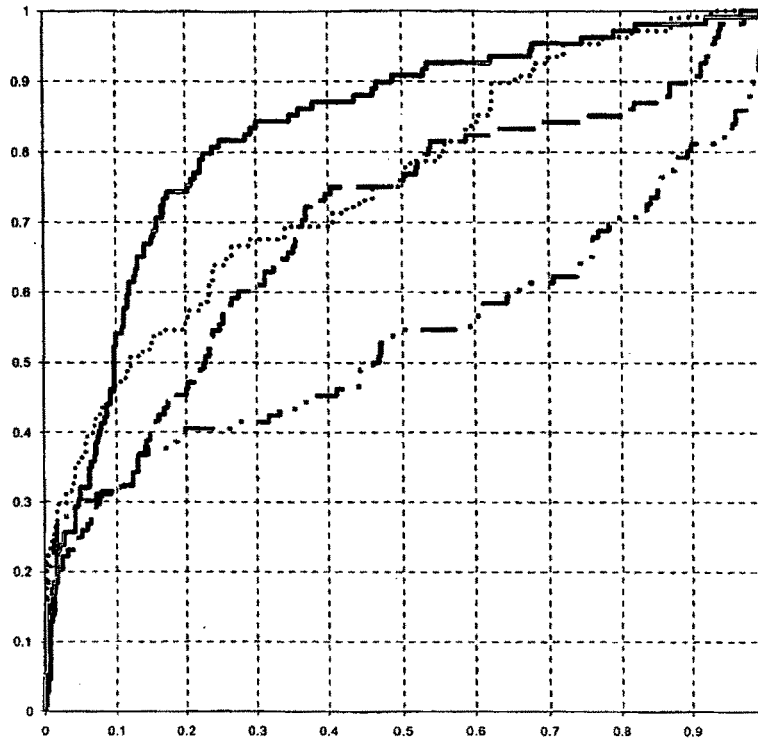


Figura 7



ES 2 323 429 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Uso de la ASC como marcador para cáncer colorrectal

<130> 23111

<150> EP 05008660.2

10 <151> 2005-04-20

<150> EP 04030619.3

<151> 2004-12-23

<160> 1

15 <170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 195

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> INICIO DE TRANSCRIPCIÓN (CARACTERÍSTICAS MISCELANIAS)

25 <223> Proteína semejante al moteado asociado a la apoptosis que contiene un dominio CARD (ASC)

<400> 1

30	Met	Gly	Arg	Ala	Arg	Asp	Ala	Ile	Leu	Asp	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr
	1				5					10					15	
	Ala	Glu	Glu	Leu	Lys	Lys	Phe	Lys	Leu	Lys	Leu	Leu	Ser	Val	Pro	Leu
				20					25					30		
35	Arg	Glu	Gly	Tyr	Gly	Arg	Ile	Pro	Arg	Gly	Ala	Leu	Leu	Ser	Met	Asp
			35					40						45		
	Ala	Leu	Asp	Leu	Thr	Asp	Lys	Leu	Val	Ser	Phe	Tyr	Leu	Glu	Thr	Tyr
40		50					55					60				
	Gly	Ala	Glu	Leu	Thr	Ala	Asn	Val	Leu	Arg	Asp	Met	Gly	Leu	Gln	Glu
	65					70					75					80
45	Met	Ala	Gly	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Thr	His	Gln	Gly	Ser	Gly	Ala	Ala
				85						90					95	
	Pro	Ala	Gly	Ile	Gln	Ala	Pro	Pro	Gln	Ser	Ala	Ala	Lys	Pro	Gly	Leu
				100					105					110		
50	His	Phe	Ile	Asp	Gln	His	Arg	Ala	Ala	Leu	Ile	Ala	Arg	Val	Thr	Asn
			115				120						125			
	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Asp	Ala	Leu	Tyr	Gly	Lys	Val	Leu	Thr	Asp	Glu
55			130				135					140				
	Gln	Tyr	Gln	Ala	Val	Arg	Ala	Glu	Pro	Thr	Asn	Pro	Ser	Lys	Met	Arg
	145					150					155					160
60	Lys	Leu	Phe	Ser	Phe	Thr	Pro	Ala	Trp	Asn	Trp	Thr	Cys	Lys	Asp	Leu
					165					170					175	
	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Arg	Glu	Ser	Gln	Ser	Tyr	Leu	Val	Glu	Asp	Leu
65				180					185					190		
	Glu	Arg	Ser													
			195													