



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 316 997**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04741160 .8**

96 Fecha de presentación : **20.07.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1649289**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Uso de la proteína proteinasa 3 (PRN3) y del inhibidor de la elastasa leucocitaria (ILEU) como un marcador para el cáncer colorrectal.**

30 Prioridad: **21.07.2003 EP 03015695**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

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

72 Inventor/es: **Tacke, Michael;**
Berndt, Peter;
Hagmann, Marie-Luise;
Karl, Johann;
Langen, Hanno;
Palme, Stefan;
Roessler, Markus;
Rollinger, Wolfgang y
Zolg, Werner

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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 proteína proteinasa 3 (PRN3) y del inhibidor de la elastasa leucocitaria (ILEU) como un marcador para el cáncer colorrectal.

La presente invención se refiere al diagnóstico del cáncer colorrectal. Revela el uso de la proteína PRN3 (proteína 3) ligada al inhibidor de la proteinasa tipo serpin ILEU (inhibidor de la elastasa leucocitaria) (=PRN3/ILEU) en el diagnóstico del cáncer colorrectal. Además, se refiere especialmente a un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal de una muestra líquida, procedente de un individuo al medir el PRN3/ILEU en dicha muestra. La medición del PRN3/ILEU se puede utilizar, por ejemplo, en la detección prematura o el diagnóstico del cáncer colorrectal.

El cáncer sigue siendo un reto importante para la salud pública a pesar de los avances realizados en su detección y terapia. Entre los diversos tipos de cáncer, el cáncer colorrectal (=CCR) es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo occidental.

El cáncer prematuro puede ser detectado/diagnosticado y lo mejor es la velocidad de supervivencia global. Esto es especialmente cierto para el CCR. El pronóstico en los estados avanzados del tumor es pobre. Más de una tercera parte de los pacientes morirá de la enfermedad a los cinco años de su diagnóstico, lo que corresponde a una velocidad de supervivencia de aproximadamente un 40% para cinco años. El tratamiento actual solamente está curando una fracción de los pacientes y tiene claramente su mejor efecto en aquellos pacientes diagnosticados en una etapa prematura de la enfermedad.

Con respecto al CCR como problema de salud pública, es esencial que se desarrolle un cribado más efectivo y unas medidas preventivas para el cáncer colorrectal.

Los procedimientos de detección más prematuros disponibles actualmente para el cáncer colorrectal implican el uso de ensayos para procedimientos endoscópicos o de sangre oculta en la materia fecal. Sin embargo, debe existir un tamaño de tumor significativo antes de que se detecte sangre en la materia fecal. La sensibilidad de los ensayos de sangre oculta en la materia fecal basados en el test de guaiac es de ~26%, lo que significa que un 74% de los pacientes con lesiones malignas no se detectarán (Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55). La visualización de lesiones precancerosas y cancerosas representa el mejor método de detección prematura, pero la colonoscopia es traumática con costes, riesgos y complicaciones significativas (Silvis, S.E., y cols., JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J.E., y cols., Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F., y cols., J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133).

Recientemente se ha informado sobre una cantidad tremenda de los así llamados genes específicos del colon o incluso denominados genes específicos del cáncer colorrectal. La gran mayoría de los correspondientes informes de investigación o de las solicitudes de patentes se basan en los datos obtenidos por el análisis de los modelos de expresión del ARN en un tejido del colon (cáncer) frente a un tejido diferente o bien un tejido normal adyacente, respectivamente. Dichos métodos pueden resumirse como técnicas de visualización del ARNm diferencial.

Como un ejemplo de los datos disponibles a partir de las técnicas de visualización del ARNm se mencionará y comentará la WO 01/96390. Esta solicitud describe y reivindica más de doscientos polinucleótidos aislados y los correspondientes polipéptidos como tal, así como su uso en la detección del CCR. Sin embargo, en general se sabe que las diferencias a nivel del ARNm no quedan reflejadas por el nivel de las proteínas correspondientes. Una proteína codificada por un ARNm raro se puede hallar en cantidades muy elevadas y una proteína codificada por un ARNm abundante puede ser difícil de detectar y de encontrar. Esta falta de correlación entre el nivel de ARNm y el nivel proteínico se debe a cuestiones como la estabilidad del ARNm, a la eficacia de la conversión, a la estabilidad de la proteína, etc.

También existen métodos recientes que investigan las diferencias en los modelos de proteínas entre distintos tejidos o entre un tejido sano y uno enfermo con el fin de identificar las moléculas marcador candidatas que se podrían utilizar en el diagnóstico del CCR. Brünagel, G., y cols., Cancer Research 62 (2002) 2437-2442 han identificado siete proteínas de matriz nuclear que parecen ser más abundantes en el tejido del CCR en comparación con el tejido normal adyacente. No existen datos de muestras líquidas obtenidas de un individuo.

La WO 02/078636 informa acerca de nueve manchas asociadas al cáncer colorrectal halladas por la desorción y la ionización mediante láser que aumenta la superficie (SELDI). Estas manchas se ven más frecuentemente en los sueros obtenidos de pacientes con CCR en comparación con sueros obtenidos de controles sanos. Sin embargo, la identidad de la(s) molécula(s) comprendida(s) en dicha mancha, por ejemplo, su secuencia, se desconoce.

A pesar de la gran y cada día mayor lista de marcadores proteínicos candidatos en el campo del CCR, hasta la fecha se desconoce la utilidad clínica/diagnóstica de estas moléculas. Para ser de utilidad clínica un marcador diagnóstico nuevo como marcador independiente debería ser al menos tan bueno como el mejor marcador individual conocido en la actualidad. O bien, un marcador nuevo debería conducir a un progreso en la sensibilidad y/o especificidad diagnóstica tanto si se utilizara solo como en combinación con uno o más marcadores, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnóstica de un ensayo es evaluada mejor por sus características actuando como receptor, que se describirán con detalle a continuación.

Actualmente, solamente los análisis de sangre diagnósticos basados en la detección del antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína asociada a un tumor, se encuentran disponibles para ayudar al diagnóstico en el campo del CCR. La CEA se incrementa en un 95% de las muestras tisulares obtenidas de los pacientes con cánceres pancreáticos, gástricos y colorrectales y en la mayoría de carcinomas de mama, pulmón y cabeza y cuello (Goldenberg, D.M., y cols., J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22. Los niveles elevados de CEA se han observado también en pacientes con una enfermedad no maligna, y muchos pacientes con cáncer colorrectal tienen niveles de CEA normales en el suero, especialmente durante la etapa prematura de la enfermedad (Carriquiry, L.A., y Pineyro, A., Dis. Colon Rectum 41 (1999) 921-929; Herrera, M.A., y cols., Ann. Surg. 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J., y cols., N. Engl. J. Med. 299 (1978) 448-451). La utilidad de la CEA medida a partir de suero o plasma en la detección de recurrencias es considerada controvertida y todavía tiene que ser aplicada ampliamente (Martell, R.E., y cols., Int. J. Bio. Markers 13 (1998) 145-149; Moertel, C.G., y cols., JAMA 270 (1993) 943-947).

A la luz de los datos disponibles, la determinación de CEA en suero no posee ni sensibilidad ni especificidad para permitir su uso como una prueba de cribado para el cáncer colorrectal en la población asintomática (Reynoso, G., y colaboradores., JAMA 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., Clinical Chemistry 48 (2002) 1151-1159).

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 tumoral de CCR prematuro que permitiera la detección fiable del cáncer o aportara información sobre un pronóstico prematuro podría conducir a una valoración diagnóstica que ayudaría enormemente al diagnóstico y al tratamiento de la enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejora del diagnóstico del CCR de la sangre. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico prematuro del CCR, ya que los pacientes diagnosticados prematuramente con posibilidades de supervivencia son mucho mayores en comparación con los diagnosticados en una etapa avanzada de la enfermedad.

La tarea de la presente invención consistía en investigar si se puede identificar un marcador nuevo que pueda ayudar en el diagnóstico del CCR.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de la PRN3 enlazada al inhibidor de la proteinasa tipo serpina ILEU (PRN3/ILEU) puede al menos parcialmente superar los problemas conocidos hasta el momento.

Por lo tanto la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que comprende las etapas de a) aporte de una muestra líquida obtenida de un individuo, b) puesta en contacto de dicha muestra con un primer agente de enlace específico para la proteinasa 3 (PRN3) y un segundo agente de enlace específico para el inhibidor de la elastasa leucocitaria inhibidora de la proteinasa tipo serpina (ILEU) en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho primer agente de enlace y el segundo agente de enlace y la PRN3 ligada al ILEU (PRN3/ILEU), y c) la correlación de la cantidad de complejo formada en (b) para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Otra configuración preferida de la invención es un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que comprende las etapas de a) puesta en contacto de una muestra líquida obtenida de un individuo con un primer agente de enlace específico para la proteinasa 3 (PRN3) y un segundo agente específico para el inhibidor de la elastasa leucocitaria inhibidora de la proteinasa tipo serpina (ILEU) en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho primer y segundo agente de enlace y la PRN3 enlazada al ILEU (PRN3/ILEU), b) la correlación de la cantidad de complejo formado en a) para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Como apreciará el experto, cualquier diagnóstico se realiza *in vitro*. La muestra del paciente es descartada después. La muestra del paciente se utiliza exclusivamente para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se devuelve al cuerpo del paciente. Habitualmente, la muestra es una muestra líquida.

La proteína PRN3 (proteinasa 3, también conocida como precursor de mieloblastina o autoantígeno de Wegener; SwissProt:P24158) se caracteriza por la secuencia SEQ ID NO:1. La proteinasa 3 es una proteinasa de la serina que se encuentra en los gránulos azurofílicos de los neutrófilos polimorfonucleares (Baggiolini, M., y cols., Agents Actions 8 (1978) 3-10). La proteinasa 3 se ha caracterizado y se conoce independientemente como p29b (Campanelli, D., y cols., J. Clin. Invest. 85 (1990) 904-915) y la mieloblastina (Bories, D., y cols., Cell 59 (1989) 959-968), las cuales resultaron ser idénticas a la proteinasa 3. La PRN3 es una proteína de unos 29 kDa y existe como especie Mr múltiple, debido probablemente a las diferencias en glucosilación (Wilde, C.G., y cols., J. Bio. Chem. 265 (1990) 2038-2041).

La PRN3 se ha asociado a una serie de enfermedades del hombre. Se trata del antígeno de referencia del modelo citoplásmico de los autoanticuerpos citoplásmicos antineutrófilos (c-ANCA) detectados en la circulación de los pacientes con granulomatosis de Wegener (WG) (Ludemann, J., *et al.*, J. Exp. Med. 171 (1990) 357-362). La PRN3 también está involucrada en el crecimiento y la diferenciación de células de leucemia (Bories, D., y cols., Cell 59 (1989) 959-968) y los modelos animales han indicado un papel para el PRN3 en un enfisema (Kao, R.C., y cols., J. Clin. Invest. 82 (1988) 1963-1973).

La PRN3 puede ser detectada en la superficie celular tras la activación por el factor de necrosis tumoral (TNF α) *in vitro* (Charles, L.A., y cols., J. Leuk. Biol. 50 (1991) 539-546), y se ha informado de que el PRN3 libera la TNF α de las superficies celulares *in vitro* (Robache-Galilea y cols., 1995). Se ha averiguado que la PRN3 también hallada en la

superficie de las células en los pacientes con vasculitidas asociadas a ANCA (Csernok, E., y cols., *Advan. Exp. Med. Biol.* 336 (1993) 45-50).

La secuencia de ILEU (inhibidor de elastasa leucocitaria, conocido asimismo como inhibidor de elastasa de monocito/neutrófilo; Swiss-PROT P30740) se da en SEQ ID NO:2. Se trata de una proteína de 42 kDa de la superfamilia de la serpina (Remold-O'Donnell, E., *et al.*, *PNAS* 89 (1992) 5635-5639). Los inhibidores tipo serpina se han descrito formando un enlace covalente con sus proteinasas de referencia y formando complejos estables serpina-proteinasa, que no se disocian cuando se tratan con la SDS (Olson, S., y cols., *JBC* 270 (1995) 30007-30017).

En particular, se demostraba que el ILEU inhibía entre otros, la PRN3 (proteínasa-3) rápida y eficazmente (Cooley, J., y cols., *Biochem.* 40 (2001) 15672-15770). Esta inhibición se realiza a través de una unión covalente en una relación estequiométrica 1:1. La SDS-PAGE revelaba que el complejo ILEU-PRN3 formado era resistente al tratamiento SDS (Cooley, J., y cols., *Biochem.* 40 (2001) 15672-15770).

Obviamente, la presente invención no se ha creado para limitarse a la proteína de longitud completa PRN3 de SEQ ID NO: 1 enlazada a la proteína de longitud completa ILEU de SEQ ID NO ID: 2. Los complejos ILEU-PRN3 pueden comprender también fragmentos fisiológicos o artificiales de PRN3 o ILEU, modificaciones secundarias de PRN3 o ILEU, así como variantes alélicas de PRN3 o ILEU. Por lo tanto, la PRN3 así como sus fragmentos, modificaciones y variantes de PRN3 enlazados a ILEU o a sus fragmentos, modificaciones y variantes son también abarcados por la presente invención.

Los fragmentos artificiales de PRN3 incluyen preferiblemente un péptido producido de forma sintética o bien mediante técnicas recombinantes, que al menos comprende un epítipo de interés diagnóstico que consiste en al menos 6 aminoácidos contiguos como derivados de la secuencia revelada en SEQ ID NO:1. Dicho fragmento puede ser utilizado de forma ventajosa para la generación de anticuerpos o bien como un estándar en un inmunoanálisis. Más preferiblemente el fragmento artificial comprende al menos dos epítopos de interés apropiado para ajustar un inmunoanálisis según la técnica sándwich. Del mismo modo, la presente invención abarca anticuerpos generados usando un péptido como antes para la PRN3 pero derivado de la secuencia revelada en SEQ ID NO:2, donde el péptido representa al menos un epítipo ILEU.

Una configuración preferida de la presente invención es un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que comprende las etapas de a) aporte de una muestra líquida obtenida de un individuo, b) puesta en contacto de dicha muestra con un primer agente de enlace específico para la proteinasa 3 (PRN3) y un segundo agente de enlace específico para el inhibidor de la elastasa leucocitaria inhibidor de la proteinasa tipo serpina (ILEU) en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho primer y segundo agente de enlace y la PRN3 enlazada al ILEU (PRN3/ILEU), y c) correlación de la cantidad de complejo formado en (b) para el diagnóstico del cáncer colorrectal. Incluso preferible a este método es un inmunoanálisis tipo sándwich que utiliza un anticuerpo específico de la PRN3 para la captura y un anticuerpo específico del ILEU para detectar PRN3/ILEU, o bien un anticuerpo específico del ILEU para la captura y un anticuerpo específico del PRN3 para detectar PRN3/ILEU.

Se ha anticipado que no solamente la PRN3/ILEU puede servir como un marcador para el CCR sino que también sin PRN3, solo o en combinación con la PRN3/ILEU. Por este motivo, los hallazgos sobre los que se basa esta invención se refieren a tres objetivos específicos distintos: (i) PRN3/ILEU solo, (ii) PRN3/ILEU y sin PRN3, y (iii) PRN3 solo no enlazado. Los tres objetivos se pueden usar individualmente como marcadores o bien se puede determinar un porcentaje de las cantidades de al menos dos de los objetivos (i), (ii) y (iii). El porcentaje puede servir como un parámetro que caracteriza el CCR.

Más adelante se informa sobre un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que comprende las etapas de (a) aporte de una muestra líquida obtenida de un individuo, b) puesta en contacto de dicha muestra con un agente de enlace frente a un epítipo compartido por la PRN3 y la PRN3/ILEU en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de enlace y la PRN3 así como la PRN3/ILEU, y (c) correlación de la cantidad de complejo formada en (b) para el diagnóstico del cáncer colorrectal. De este modo se mide toda la PRN3 presente en la muestra líquida ("total PRN3").

Más adelante se informa sobre un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que comprende las etapas de (a) aporte de una muestra líquida obtenida de un individuo, b) puesta en contacto de dicha muestra con un agente de enlace frente a un epítipo presente en la PRN3 no enlazada pero no en la PRN3/ILEU en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de enlace y la PRN3 y (c) correlación de la cantidad de complejo formada en (b) para el diagnóstico del cáncer colorrectal. Como apreciará el experto se requiere al menos un reactivo de enlace que reconozca un epítipo en el PRN3 ausente, por ejemplo, enmascarado si el PRN3 está unido al ILEU. En un análisis mediante la técnica sándwich se utiliza al menos dicho reactivo como reactivo de captura o de detección.

Cualquiera de los nuevos marcadores PRN3/ILEU, PRN3 total y/o PRN3 solo no enlazado o en combinación pueden ser utilizados para fines de control así como de cribado.

Cuando se utiliza en el control del paciente el método diagnóstico conforme a la presente invención puede ayudar a evaluar la carga tumoral, la eficacia del tratamiento y la recurrencia tumoral en el seguimiento de los pacientes. Niveles elevados de PRN3/ILEU se correlacionan directamente con la carga tumoral. Después de la quimioterapia

un incremento a corto plazo (pocas horas a 14 días) en PRN3/ILEU puede servir como indicador de la muerte de las células tumorales. En el seguimiento de los pacientes (de 3 meses a 10 años) se puede utilizar un aumento de la PRN3/ILEU como un indicador de la recurrencia tumoral.

En una configuración preferida, el método diagnóstico conforme a la presente invención se utilizará para fines de cribado, es decir, se utilizará para evaluar los individuos sin un diagnóstico previo del CCR midiendo el nivel de PRN3/ILEU y correlacionando el nivel medido con la presencia o ausencia de CCR.

El cáncer colorrectal frecuentemente pasa de un adenoma (pólipo) a un carcinoma maligno. Las diferentes etapas del CCR se solían clasificar conforme a las etapas A a D de Duke.

El estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de su extensión, avance y gravedad. Agrupa a pacientes con cáncer de forma que se pueden hacer generalizaciones acerca del pronóstico y de la elección de la terapia.

Hoy en día, el sistema TNM es la clasificación más ampliamente utilizada de la extensión anatómica del cáncer. Representa un sistema de estadificación uniforme, aceptado internacionalmente. Existen tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estado de los nódulos linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de las metástasis distantes). Los criterios TNM han sido publicados por el UICC (Internacional Union Against Cancer), Sobón, L.H., Wittekind, Ch.(eds): TNM Classification of Malignant Tumors, fifth edition, 1997.

Lo que es especialmente importante es que el diagnóstico prematuro del CCR proporciona un pronóstico mucho más bueno. Los tumores malignos del colo-recto surgen de los tumores benignos, es decir, del adenoma. Por lo tanto, aquellos pacientes diagnosticados en la etapa del adenoma tienen un mejor pronóstico. Los pacientes diagnosticados como prematuros como en la etapa T_{is}, NO, MO o bien T1-3; NO; MO, si son tratados de forma apropiada tienen una probabilidad superior al 90% de supervivencia 5 años después del diagnóstico en comparación con un índice de supervivencia de 5 años de solamente el 10% para los pacientes diagnosticados cuando las metástasis distantes ya se encuentran presentes.

En el sentido de la presente invención el diagnóstico prematuro del CCR se refiere a un diagnóstico en un etapa previa del cáncer (adenoma) o bien en una fase del tumor donde no existe metástasis (ni proximal ni distal), es decir, adenoma, T_{is}, NO MO o bien T1-4; MO están presentes. T_{is} indica carcinoma *in situ*.

En una configuración preferida, la detección del PRN3/ILEU se utiliza para diagnosticar el CCR como prematuro como en la etapa del adenoma.

Además es preferible que el CCR sea diagnosticado cuando no ha crecido completamente a través de la pared intestinal y por consiguiente ni el peritoneo visceral está perforado ni otros órganos o estructuras se encuentran invadidas, es decir, que el diagnóstico se realiza en la etapa T_{is}, NO, MO o T1-3; NO; MO(=T_{is}-3; NO; MO).

El método diagnóstico conforme a la presente invención se basa en una muestra líquida que procede de un individuo. A diferencia de los métodos conocidos actualmente, la PRN3/ILEU se mide específicamente a partir de esta muestra líquida usando un agente de enlace específico.

Un agente de enlace específico es, por ejemplo, un receptor para la PRN3, ILEU, o PRN3/ILEU, una lectina que se enlaza a la PRN3, ILEU o PRN3/ILEU o bien un anticuerpo frente a la PRN3, ILEU o PRN3/ILEU. Un agente de enlace específico tiene al menos una afinidad de 10⁷ l/mol por su molécula de referencia correspondiente. El agente de enlace específico tiene preferiblemente una afinidad de 10⁸ l/mol o incluso más preferiblemente de 10⁹ l/mol por su molécula de referencia. Como apreciará el experto el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se enlazan de forma significativa al agente de enlace específico para la PRN3, ILEU o PRN3/ILEU. Preferiblemente, el nivel de enlace a una biomolécula distinta de la molécula de referencia da lugar a una afinidad de enlace que es únicamente del 10%, más preferiblemente solo del 5% de la afinidad de la molécula de referencia o bien inferior. Un agente de enlace específico preferido cumplirá tanto el criterio mínimo anterior por la afinidad así como por la especificidad.

Un par de agentes de enlace específicos comprenden preferiblemente un primer anticuerpo reactivo con la PRN3 y un segundo anticuerpo reactivo con ILEU, de forma que el par de anticuerpos sea capaz de formar un complejo con el PRN3/ILEU. Además, un agente de enlace específico preferiblemente es aquel antibiótico específicamente reactivo con la PRN3/ILEU pero no con la PRN3 o la ILEU solas. También incluido en la presente invención se encuentra un agente de enlace específico dirigido contra una PRN3 no enlazada, donde el agente de enlace específico es preferiblemente un anticuerpo reactivo con un epítipo de la PRN3 que es enmascarado cuando la PRN3 se enlaza al ILEU.

El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como construcciones genéticas que comprenden el dominio de enlace de un anticuerpo. Se puede utilizar cualquier fragmento de anticuerpo que cumpla los criterios anteriores de agente de enlace específico. Los anticuerpos son generados por procedimientos novedosos, por ejemplo, tal como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11(1990) todo el libro, en especial las páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam). Ade-

más, el experto conoce bien los métodos basados en los inmunosorbentes que se pueden utilizar para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante estos métodos la calidad de los anticuerpos policlonales y su funcionamiento en los inmunoanálisis aumenta (Tijssen, P., *supra*, páginas 108-115).

5 Para lograr todo esto de acuerdo con la presente invención, se han utilizado anticuerpos policlonales en conejos. Sin embargo, también se pueden utilizar claramente anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, de ratas o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Puesto que los anticuerpos monoclonales se fabrican en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan las herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo de rutina clínica. La generación y el uso de anticuerpos monoclonales a la PRN3, ILEU y PRN3/ILEU en un método
10 conforme a la presente invención es asimismo otra de las configuraciones preferidas.

Como el experto apreciará ahora que la combinación PRN3/ILEU se ha identificado como un marcador útil en el diagnóstico del CCR, vías alternativas se podrán utilizar para llegar a un resultado comparable a los logros de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden entre otras cosas el uso de péptidos sintéticos, que representan un epítipo de la PRN3, ILEU o PRN3/ILEU para la inmunización. Alternativamente, se puede usar la inmunización del ADN conocida también como vacuna del ADN.

20 Para la medición la muestra líquida obtenida de un individuo se incuba con el agente de enlace específico o con un par de agentes de enlace para la PRN3/ILEU en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo del agente de enlace o de un par de agentes de enlace y de la PRN3/ILEU. No es preciso que dichas condiciones sean especificadas, puesto que el experto sin apenas esfuerzo inventivo alguno puede identificar fácilmente las condiciones apropiadas para la incubación.

25 Como etapa final conforme al método revelado en la presente invención se mide la cantidad de complejo y se correlaciona con el diagnóstico del CCR. Como apreciará el experto existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo formado que consiste en el agente de enlace específico o un par de agentes de enlace específicos y la PRN3/ILEU, todo descrito con detalle en los libros de texto pertinentes (cf., por ejemplo, Tijssen P., *supra*, o Diamandis, y cols., eds (1996) Immunoassay, Academia Press, Boston).

30 Preferiblemente la PRN3/ILEU se detecta en un formato de análisis tipo sándwich. En dicho análisis se utiliza un primer agente de enlace específico para capturar la PRN3/ILEU por un lado y por otro lado se utiliza un segundo agente específico de enlace, que se marca para ser detectado directa o indirectamente.

35 Tal como se ha mencionado antes, sorprendentemente se ha averiguado que la PRN3/ILEU se puede medir a partir de una muestra líquida obtenida de una muestra de un individuo. No se requiere ni tejido ni muestra de biopsia para aplicar el marcador PRN3/ILEU al diagnóstico del CCR.

40 En una configuración preferida, el método conforme a la presente invención se lleva a cabo con suero como material de muestra líquida.

En otra configuración preferida, el método conforme a la presente invención se lleva a cabo con plasma como material de muestra líquida.

45 En otra configuración preferida, el método conforme a la presente invención se lleva a cabo con sangre entera como material de muestra líquida.

Además las heces se pueden preparar de diversas formas según el experto para obtener una muestra líquida. Dicha muestra líquida procedente de las heces representa una configuración preferida conforme a la presente invención.

50 Mientras que la aplicación de los métodos de proteinómica rutinarios a las muestras de tejido, conduce a la identificación de muchos candidatos marcadores potenciales para el tejido seleccionado, los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar la PRN3/ILEU en una muestra de fluido corporal. Y todavía más sorprendentemente, han sido capaces de demostrar que la presencia de la PRN3/ILEU en dicha muestra líquida obtenida de un individuo se puede correlacionar con el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Los anticuerpos a la PRN3/ILEU con gran ventaja se pueden utilizar en los métodos establecidos, con el fin de detectar células cancerosas colorrectales *in situ*, en biopsias o en procedimientos inmunohistológicos.

60 Preferiblemente, se utiliza un anticuerpo a la PRN3/ILEU en un inmunoanálisis cualitativo (PRN3/ILEU presente o ausente) o bien cuantitativo (se determina la cantidad de PRN3/ILEU).

En base a la determinación cuantitativa del PRN3/ILEU y del PRN3 total o PRN3 no enlazado el porcentaje entre estos marcadores puede estar correlacionado con el diagnóstico del cáncer colorrectal.

65 La medición del nivel de PRN3/ILEU proteínico ha demostrado ser muy favorable en el campo del CCR. Por lo tanto, en otra configuración preferida, la presente invención se refiere al uso del PRN3/ILEU como una molécula marcador en el diagnóstico del cáncer colorrectal de una muestra líquida obtenida de un individuo.

ES 2 316 997 T3

El término molécula marcador se utiliza para indicar que un nivel elevado del analito PRN3/ILEU medido en un fluido corporal de un individuo marca la presencia de CCR.

Se prefiere especialmente utilizar el marcador PRN3/ILEU en el diagnóstico prematuro del cáncer colorrectal.

El uso del PRN3/ILEU propiamente, representa un avance significativo hacia el campo desafiante del diagnóstico del CCR. Combinando las mediciones del PRN2/ILEU con otros marcadores conocidos, como el CEA, o con otros marcadores del CCR todavía por descubrir, se han alcanzado grandes mejorías. Por lo tanto, en otra configuración preferida la presente invención se refiere al uso de la PRN3/ILEU como molécula marcador del cáncer colorrectal en combinación con una o más moléculas marcadores para el cáncer colorrectal en el diagnóstico del cáncer colorrectal de una muestra líquida obtenida de un individuo. A este respecto, la expresión “una o más” se refiere a 1 a 10, preferiblemente 1 a 5, más preferiblemente 3. Otros marcadores del CCR seleccionados preferiblemente con los que se puede combinar la medición del PRN3/ILEU son el CEA, CA 19-9, y/o CA 242. Por consiguiente, una configuración muy preferida de la presente invención es el uso de la PRN3 proteínica o PRN3/ILEU como molécula marcador del cáncer colorrectal en combinación con una o más moléculas marcadores del cáncer colorrectal en el diagnóstico del CCR de una muestra líquida obtenida de un individuo, de forma que al menos se elige una molécula marcador del grupo formado por CEA, CA 19-9, y/o CA 242.

Los diagnósticos reactivos en el campo de los análisis específicos, como los inmunoanálisis, se encuentran preferiblemente recogidos en un estuche que comprende el agente de enlace específico y los reactivos auxiliares requeridos para realizar el análisis.

La exactitud de una prueba ha sido descrita por sus características como receptor (ROC) (ver especialmente Zweig, M.H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es un diseño de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de modificar de forma continuada el umbral de decisión en todo el intervalo de datos observado.

El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, de la habilidad para clasificar correctamente los individuos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de la prueba para distinguir correctamente dos situaciones distintas de los individuos analizados. Dichas situaciones son, por ejemplo, la salud y la enfermedad o la enfermedad benigna frente a la maligna.

En cada caso, el diagrama ROC refleja el solapamiento entre las dos distribuciones plasmando la sensibilidad frente a la 1-especificidad en el umbral completo de decisión. El eje y representa la sensibilidad o la fracción de verdaderos positivos (definida como (número de resultados verdaderos positivos)/(número de verdaderos positivos + número de falsos negativos)). Esto se conoce también como la positividad en presencia de una enfermedad o estado. Se calcula a partir del subgrupo afectado. En el eje x se representa la fracción positiva falsa o 1-especificidad (definida como ((número de resultados falsos positivos)/número de verdaderos negativos + número de falsos positivos)). En un índice de la especificidad y se calcula totalmente a partir del subgrupo no afectado. Puesto que las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calculan por separado, usando los resultados del ensayo de dos diferentes subgrupos, el diagrama ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del diagrama representa un par sensibilidad/especificidad que corresponde a un umbral de decisión en particular. Un ensayo con una discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene un diagrama ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción de verdaderos positivos es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados de los dos grupos) es una línea en diagonal de 45° desde el extremo izquierdo inferior hasta el extremo derecho superior. La mayoría de líneas caen entre estos dos extremos. (Si la línea ROC se encuentra completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de “positividad” de “mayor a” a “menor que” o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próxima la línea al extremo superior izquierdo, mayor exactitud global del ensayo.

Un objetivo conveniente para cuantificar la exactitud diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su funcionamiento mediante un único número. La medida global más frecuente es el área bajo la línea ROC. Por convención, esta área es siempre >0,5 (si no lo es, se puede invertir la orden de decisión de hacerlo). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (diferencia de distribución no aparente entre los dos grupos de valores de prueba). El área no depende únicamente de una parte en particular de la línea como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad para una especificidad del 90%, sino que de toda la línea. Esta es una expresión cuantitativa, descriptiva de la proximidad de la línea ROC a la perfección (área=1,0).

La utilidad clínica del nuevo marcador PRN3/ILEU se ha evaluado en comparación y en combinación con el marcador establecido CEA usando un análisis de la curva del operador receptor (ROC; Zweig, M.H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). Este análisis se ha basado en unos grupos de pacientes bien definidos que constan de 50 muestras cada uno de pacientes en T1-3; NO; MO, tumor más avanzado, por ejemplo, T4 y/o diversa gravedad de metástasis (N+ y/o M+), y controles de salud, respectivamente.

El método diagnóstico basado en la medición de PRN3/ILEU solo, en comparación con el marcador establecido CEA solo, ha resultado que tiene una exactitud diagnóstica al menos tan buena como la demostrada por el área bajo la curva (perfil de sensibilidad/especificidad).

Descripción de las figuras

Figura 1 Identificación del PRN3/ILEU intacto con un PM aparente de 54 kDa en el tejido con cáncer de colon. La figura 1 muestra un ejemplo típico de un gel 2D cargado con una muestra del tumor (lado izquierdo), y un gel, cargado con una muestra de control (lado derecho) obtenido de la mucosa sana adyacente. El complejo PRN3/ILEU no se detectaba por el mismo método en la mucosa sana.

Figura 2 La figura 2 muestra un ejemplo típico de un análisis de inmunotransferencia. El gel se cargaba con los lisados tisulares del tejido de cáncer colorrectal y del tejido adyacente de control sano de 5 pacientes (individuo 22: colon ca, Dukes B; individuo 23: colon ca, Dukes B; individuo 27: rectum ca, Dukes B; individuo 29: rectum ca, Dukes A, e individuo 34: colon ca, Dukes B). La presencia del complejo PRN3-ILEU (recorte superior) o de PRN3 (recorte inferior) en las muestras se comprobaba usando un suero anti-ILEU de conejo policlonal (recorte superior) o un suero anti-PRN3 policlonal (recorte inferior). Las líneas o tiras que contienen lisados tumorales se indican con una "T", y las que contienen un tejido de control normal con una "N". Las flechas indican la posición en los geles del PRN3-ILEU (PM aparente de ~70kDa) y del PRN3 sin formar complejo (PM aparente de ~28 kDa). Todas las muestras del tumor daban una señal fuerte en las posiciones de PRN3-ILEU y PRN3, mientras que solamente se podía detectar una señal débil o nula en los lisados del tejido de control normal adyacente.

El peso molecular aparente del complejo de PRN3-ILEU en este experimento era de aproximadamente 70 kDa y por lo tanto distinto del peso molecular aparente del complejo de PRN3-ILEU según se determina en los geles 2D donde se medía un peso molecular aparente de aproximadamente 54 kDa (ver figura 1). La determinación del peso molecular aparente en el experimento de inmunotransferencia se considera como más precisa puesto que en este experimento se incluye un marcador del peso molecular. Los geles 2D, en contraste, no contienen un peso molecular estándar y por lo tanto las estimaciones del peso molecular de una mancha determinada son claramente menos precisas. El peso molecular del complejo PRN3-ILEU tal como se determina en el experimento de inmunotransferencia está bien de acuerdo con el peso molecular teórico.

Abreviaciones

ABTS	sal de diamonio 2,2'-azino-di-(sulfonato de 3-etilbenzotiazolina (6)
BSA	albúmina de suero bovino
ADNc	ADN complementario
CHAPS	3-((3-colamidopropil)-dimetilamonio)-1-propano-sulfonato)
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
ELISA	enzimoinmunoanálisis de absorción
HRP	peroxidasa de rábano picante
IAA	acetamida de yodo
IgG	inmunoglobulina G
IEF	enfoque isoeléctrico
IPG	gradiente de pH inmovilizado
LDS	dodecilsulfato de litio
MALDI-TOF	Tiempo de desorción/ionización mediante láser de la espectrometría de masas
MES	mesitol, 2, 4,6-trimetilfenilo
OD	densidad óptica
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	solución salina tamponada de fosfato

ES 2 316 997 T3

PI	punto isoeléctrico
RTS	sistema rápido de traslación
5 SDS	dodecilsulfato sódico

Ejemplo 1

10 *Identificación de PRN3/ILEU como un marcador potencial del cáncer colorrectal*

Fuentes del tejido

15 Para identificar las proteínas específicas del tumor como marcadores potenciales de diagnóstico para el cáncer colorrectal, se realiza un análisis de tres clases distintas de tejido usando métodos sobre proteinómica.

En total, se analizan muestras de tejido de 10 pacientes que padecen cáncer colorrectal. De cada paciente se recogen tres tipos de tejidos diferentes a partir de resecciones terapéuticas: tejido tumoral (>80% tumor) (T), tejido sano colindante (N) y tiras de mucosa de mucosa sana colindante (M). Los dos últimos tipos de tejido sirven de
20 muestras de control sanas. Los tejidos se cortan y congelan inmediatamente después de la resección y se almacenan a -80°C antes de su tratamiento. Los tumores se diagnostican siguiendo criterios histopatológicos.

Preparación del tejido

25 0,8-1,2 g de tejido congelado se colocan en un mortero y completamente congelados por el nitrógeno líquido. El tejido se pulveriza en el mortero, se disuelve en un volumen 10 veces mayor (w/v) de tampón de lisis (nitrato sódico 40 mM, MgCl₂ 5 mM, 1% de genapol X-080, 0,02% de azida sódica, Complete® EDTA-free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Nr. cat. 1873 580) y posteriormente se homogenizan en un homogenizador de vidrio
30 Wheaton® (20x ajuste flojo, 20 x ajuste hermético). 3 ml del homogenizado se someten a una centrifugación por densidad de sacarosa (10-60% de sacarosa) durante 1h a 4500 x g. Después de esta etapa de centrifugación se obtienen tres fracciones. La fracción en la parte superior del gradiente contiene las proteínas solubles y se utiliza para un análisis posterior.

35 *Enfoque isoeléctrico (IEF) y SDS_PAGE*

Para el IEF, se mezclan 3 ml de suspensión con 12 ml de tampón de muestra (urea 7M, tiourea 2M, 2% CHAPS, 0,4% tampón IPG pH 6-9, 0:5% DTT) y se incuban durante 1 hora. Las muestras se concentran en un dispositivo
40 Amicon®Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y la concentración de proteínas se determina usando el análisis proteínico Bio-Rad® (Nr. cat. 500-006; Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich Alemania) siguiendo las instrucciones del manual del proveedor. A un volumen correspondiente a 1,5 mg de muestra proteínica se añade tampón hasta un volumen final de 350 µl. Esta solución se utiliza para rehidratar las tiras de IPG pH 6-9 (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) durante la noche. El IEF se realiza usando el siguiente protocolo del gradiente: 1.) 1
45 minuto a 500 V; 2.) 2 h a 3500 V; 3.) 22 h a 3500 V constantes lo que da lugar a 82 kVh. Después del IEF, las tiras se almacenan a -80°C o se utilizan directamente para el SDS-PAGE.

Previamente al SDS-PAGE las tiras se incuban en el tampón de equilibrio (urea 6M, Tris/HCl 50 mM, pH 8,8, 30% de glicerina, 2% de SDS) para la reducción se añade DTT (15 min. + 50 mg de DTT/10 ml), y para la alquilación IAA
50 (15 min. + 235 mg de acetamida de yodo/10 ml). Las tiras se ponen en geles de poliacrilamida del 12,5% y se someten a una electroforesis a 1W/gel durante 1 hora y después a 17W/gel. Posteriormente, los geles se fijan (50% metanol, 10% acetato) y se colorean durante la noche con Novex Colloidal Blue Staining kit (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, Cat. nr LC6025, 45-7101).

55 *Detección del PRN3/ILEU como un marcador potencial para el cáncer colorrectal*

Cada paciente se analiza por separado mediante un análisis de la imagen con el software ProteomeWeaver® (Definiens AG, Alemania, Munich). Adicionalmente, todas las manchas del gel se recortan mediante un robot y las proteínas
60 presentes en las manchas son identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex™ Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente, se comparan 4 geles de la muestra tumoral con 4 geles de tejido normal adyacente y de mucosa y se analizan las manchas claras que corresponden a proteínas expresadas de forma diferente. De este modo, se puede expresar la proteína PRN3/ILEU de forma específica o bien se sobreexpresa fuertemente en el tejido tumoral y no se detecta o bien se expresa menos fuertemente en el tejido de control sano.
65 Por lo tanto, entre muchas otras proteínas, se destaca como candidato marcador a utilizar en el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos a la PRN3 y al ILEU

- 5 El anticuerpo policlonal a la proteína marcador del cáncer colorrectal PRN3/ILEU es generado para el uso adicional del anticuerpo en la medición del suero y del plasma y de los niveles en sangre y heces de PRN3/ILEU, PRN3 total y/o PRN3 no enlazado mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo la inmunotransferencia y ELISA.

Expresión de la proteína recombinante en E. coli

- 10 Para generar anticuerpos al PRN3/ILEU, se realiza una expresión recombinante de cada proteína para obtener inmunógenos. La expresión se realiza aplicando una combinación del sistema de expresión RTS 100 y la *E. coli*. En una primera etapa, las secuencias ADN que codifican la PRN3 y el ILEU son analizadas y se obtienen recomendaciones para las variantes mutacionales silenciosas del ADNc de alto rendimiento y de las respectivas secuencias del cebador PCR, usando el sistema "ProteoExpert RTS *E. coli* HY". Se trata de un servicio basado en una web comercial (www.proteoexpert.com). Usando los pares del cebador recomendados, se emplea el sistema "RTS 100 *E. coli* Linear Teplate Generation Set, His-tag" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Cat. No. 3186237) para generar templados de PCR lineales a partir del ADNc y para la transcripción *in vitro* y expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica las proteínas PRN3 y ILEU. Para la detección por inmunotransferencia y posterior purificación, la proteína expresada contiene un His-tag. Se identifican las mejores variantes de expresión. Todas las etapas desde la PCR a la expresión y detección se llevan a cabo conforme a las instrucciones del fabricante. Los productos PCR respectivos, que contienen todas las regiones reguladoras T7 necesarias (promotor, lugar de enlace ribosómico y T7 finalizador) son clonados en el vector pBAD TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Germany, Cat. No K 4300/01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la expresión que utiliza las secuencias reguladoras T7, la construcción se transforma en *E. coli* BL 21 (DE 3) (Studier, F.W., y cols., Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89) y las bacterias transformadas son cultivadas en un lote para la expresión proteínica. La PRN3 y ILEU se expresarán por separado.

- 30 La purificación de las proteínas de fusión His-PRN3 y His-ILEU se realiza siguiendo los procedimientos estándar en una columna de quelato de níquel. Se realiza la centrifugación y el gránulo celular se suspende en tampón de lisis que contiene fosfato, pH 8,0, cloruro de guanidio 7 M, imidazol y tioglicerol, y se homogeniza usando un Ultra-Turrax®. El material insoluble se granula mediante centrifugación a elevada velocidad y el sobrenadante se aplica a una columna cromatográfica de quelato de níquel. La columna se lava con varios volúmenes de tampón de lisis seguidos de lavados con tampón, que contiene fosfato, pH 8,0 y urea.

- 35 Finalmente, el antígeno enlazado es eluido usando un tampón de fosfato que contiene SDS en condiciones ácidas.

*Producción de anticuerpos monoclonales frente a PRN3 e ILEU**a) Inmunización de ratones*

- 40 Dos grupos de ratones A/J de 12 semanas son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal, un grupo con 100 µg de PRN3 y el otro con 100 µg de ILEU. Al cabo de 6 semanas se producen otras dos inmunizaciones intraperitoneales a intervalos mensuales. En este proceso cada ratón recibe 100 µg de PRN3 o ILEU adsorbidos en hidróxido de aluminio y 10⁹ gérmenes de *Bordetella pertussis*. Posteriormente, se llevan a cabo las dos últimas inmunizaciones por vía intravenosa en el tercer y el segundo día previos a la fusión usando 100 µg de PRN3 o ILEU, respectivamente, en el tampón de PBS para cada uno.

b) Fusión y clonación

- 50 Las células del bazo de los ratones inmunizados conforme a a) se funden con células de mieloma conforme a Galfre, G., y Milstein, C., Methods in Enzymology 73 (1981)3-46. En este proceso, aproximadamente 1.10⁸ células del bazo del ratón inmunizado se mezclan con 2x10⁷ células de mieloma (P3x63-Ag8-653, ATCC CRL 1580) y se centrifugan (10 min a 300xg y 4°C). Luego las células se lavan una vez con medio RPMI 1640 sin suero fetal bovino (FCS) y se centrifugan de nuevo a 400 g en un tubo cónico de 50 ml. El sobrenadante se descarta, el sedimento celular se suelta suavemente dando ligeros toques, se añade 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcla pipeteando. Después de 1 minuto en un baño de agua a 37°C, se añaden 5 ml de RPMI 1640 sin FCS gota a gota a temperatura ambiente en un periodo de 4-5 minutos. Después se añaden 5 ml de RPMI 1640 que contienen un 10% de FCS gota a gota en aproximadamente 1 minuto y se mezclan intensamente y se enrasa con medio hasta 50 ml (RPMI 1640 + 10% FCS) y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 400 g y 4°C. Las células sedimentadas son absorbidas en el medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y cultivadas en el medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmol/l de hipoxantina, 1 µg/ml de azaserina en RPMI 1640 + 10% FCS). Se añade interleucina 6 a 100 U/ml al medio como un factor de crecimiento.

- 65 Después de aproximadamente 10 días se verifican los cultivos primarios en busca de anticuerpos específicos. El anticuerpo monoclonal específico del PRN3 no enlazado es identificado como reactivo con el PRN3 pero no reactivo con el PRN3/ILEU. Los cultivos primarios positivos de PRN3 e ILEU son clonados en placas de cultivo celular de 96 pocillos por medio de un selector celular activado por fluorescencia. En este proceso se añade interleucina de nuevo al medio en una proporción de 6 a 100 U/ml como un aditivo de crecimiento.

ES 2 316 997 T3

c) Aislamiento de la inmunoglobulina de los sobrenadantes del cultivo celular

Las células del hibridoma obtenidas son cultivadas en una densidad de 1×10^5 células por ml en un medio de RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y proliferan durante 7 días en un fermentador (Thermodux Co., Wertheim/Main, modelo MCS-104XL, pedido nr. 144-050). En promedio se obtienen concentraciones de $100 \mu\text{g}$ de anticuerpo monoclonal por ml. La purificación de este anticuerpo del sobrenadante del cultivo se realiza mediante métodos convencionales en la química de las proteínas (por ejemplo, conforme a Bruck, C., y cols., *Methods in Enzymology* 121 (1986) 587-695).

Generación de anticuerpos policlonales

a) Inmunización

Dos grupos de conejos son inmunizados, uno con PRN3 y otro con ILEU. Para la inmunización, se prepara una emulsión reciente de la solución proteínica ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$ de PRN3 o ILEU, respectivamente) y adyuvante de Freund completo en el porcentaje de 1:1. Cada conejo es inmunizado con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrae la sangre y el suero anti-PRN3 y anti-ILEU se utiliza para otros experimentos tal como se describe en los ejemplos 3 a 7.

b) Purificación de IgG (inmunoglobulina G) de suero de conejo por precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio

Un volumen de suero de conejo se diluye con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). El pH se ajusta a 4,5 con Tris-base 2M. El ácido caprílico ($25 \mu\text{l}/\text{ml}$ de muestra diluida) se añadirá gota a gota agitando vigorosamente. Al cabo de 30 minutos, la muestra se centrifuga ($13.000 \times g$, 30 min, 4°C), se descartan los gránulos y se recoge el sobrenadante. El pH del sobrenadante se ajusta a 7,5 por la adición de tris-base 2M y se filtra ($0,2 \mu\text{m}$).

La inmunoglobulina en el sobrenadante se precipita agitando vigorosamente por la adición gota a gota de una solución de sulfato de amonio 4M hasta una concentración final de 2M. Las inmunoglobulinas precipitadas son recogidas por centrifugación ($8.000 \times g$, 15 min, 4°C).

Se descarta el sobrenadante. Los gránulos se disuelven en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializan de forma exhaustiva. El dializado se centrifuga ($13.000 \times g$, 15 min, 4°C) y se filtra ($0,2 \mu\text{m}$).

Biotinilación de la IgG de conejo policlonal

La IgG de conejo policlonal se lleva a $10 \text{ mg}/\text{ml}$ en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. Se añaden $50 \mu\text{l}$ de Biotina-N-hidroxisuccinimida por ml de IgG ($3,6 \text{ mg}/\text{ml}$ en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex 200 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recoge la fracción que contiene IgG biotinilado. Los anticuerpos monoclonales son biotinilados conforme al mismo procedimiento.

Digoxigenilación de la IgG de conejo policlonal

La IgG de conejo policlonal se lleva a $10 \text{ mg}/\text{ml}$ en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. Se añaden $50 \mu\text{l}$ de éster de digoxigenina-3-O-metilcarbonil- ϵ -aminocaproico-N-hidroxisuccinimida (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany, Cat. No. 1 333 054) ($3,8 \text{ mg}/\text{ml}$ en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex 200 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recoge la fracción que contiene IgG biotinilado. Los anticuerpos monoclonales son marcados con digoxigenina conforme al mismo procedimiento.

Ejemplo 3

Ensayo de inmunotransferencia para la detección de PRN3/ILEU y PRN3 en tejido de cáncer colorrectal humano usando anticuerpos policlonales tal como se menciona en el ejemplo 2

Los lisados tisulares de muestras de tumor y las muestras de control sanas se preparaban tal como se ha descrito en el ejemplo 1, "Preparación tisular".

SDS-PAGE y el ensayo de inmunotransferencia se llevaban a cabo usando reactivos y equipo de Invitrogen, Karlsruhe, Germany. Para cada muestra tisular analizada, se diluían $10 \mu\text{g}$ de lisado tisular en tampón de muestra SDS NuPAGE® reductor (Invitrogen) y se calentaban durante 10 minutos a 95°C . Las muestras se colocaban en los gels de NuPAGE 4-12% (tris-glicina) en el sistema tampón circulante MES. La mezcla proteínica separada del gel se transfería a las membranas de nitrocelulosa usando el módulo XCell II™ (Invitrogen) y el sistema tampón de transferencia NuPAGE. Las membranas se lavaban 3 veces en PBS/0,05% Tween 20 y se bloqueaban con tampón de bloqueo

Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) durante 2h. El suero anti-PRN3 de conejo policlonal o bien anti-ILEU de conejo policlonal, anticuerpo primario (generación descrita en el ejemplo 2) se diluía 1:10.000 en tampón de bloqueo Roti®-Block y se incubaba con la membrana durante 1 hora. Las membranas se lavaban 6 veces en PBS/0,05% Tween 20. El anticuerpo de conejo primario enlazado de forma específica se marcaba con un anticuerpo de IgG anti-conejo de oveja policlonal POD-conjugado, y se diluía a 10 mU/ml en tampón de bloqueo 0,5xRoti®-Block. Tras una incubación de 1 hora, las membranas se lavaban 6 veces en PBS/0,5% Tween 20. Para la detección del anticuerpo anti-conejo POD-conjugado enlazado, la membrana se incubaba con el sustrato de transferencia Lumi-Light^{PLUS} (Pedido nr. 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) y se exponía a una película autoradiográfica.

Ejemplo 4

ELISA para la medición de PRN3 total en muestras de plasma y suero humano

Para la detección de la PRN3 total en suero humano o plasma, se desarrolla un ELISA con técnica sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugan partes alícuotas de anticuerpo policlonal anti-PRN3 (ver ejemplo 2) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Las placas de microvaloración de 96 pocillos revestidas de estreptavidina se incuban con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-PRN3 biotinilado durante 60 minutos a 10 µg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Tras la incubación, las placas se lavan tres veces con NaCl al 0,9%, NaCl 0,1% Tween 20. Los pocillos se incuban luego durante 2 horas con una dilución en serie de la proteína recombinante (ver ejemplo 2) como antígeno estándar o con muestras de plasma diluidas de los pacientes. Tras el enlace de PRN3, las placas se lavan tres veces con NaCl 0,9%, Tween 20 0,1%. Para la detección específica de la PRN3 total enlazada, los pocillos se incuban con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-PRN3 digoxigenilado durante 60 minutos a 10 µg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Posteriormente, las placas se lavarán tres veces para eliminar el anticuerpo no ligado. En una siguiente etapa, los pocillos se incuban con 20 mU/ml de conjugados anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog No. 1633716) durante 60 minutos en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Las placas se lavan seguidamente tres veces con el mismo tampón. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incuban con 100 µl de solución de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog No. 11685767) y el DO se mide después de 30-60 minutos a 405 nm con un lector de ELISA.

Ejemplo 5

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

La exactitud se evalúa analizando las muestras líquidas individuales obtenidas de caracterizar correctamente los grupos de pacientes, es decir, 50 pacientes a los que se ha realizado una colonoscopia y en los que se ha observado que no presentan adenoma de CRC, 50 pacientes diagnosticados y clasificados como T1-3, N0, M0 de CRC y 50 pacientes diagnosticados con CRC avanzado, que presentan al menos infiltración tumoral en al menos un nódulo linfático proximal o formas más graves de metástasis, respectivamente. La CEA medida como un ensayo disponible en el comercio (Roche Diagnostics, CEA-assay (Cat No. 1 173 1629 for Elecsys® Systems Immunoassay analyzer) y la PRN3 total medida tal como se ha descrito antes son cuantificadas en un suero obtenido de cada uno de estos individuos. El análisis ROC se realiza conforme a Zweig, M.H., y Campbell, *supra*. La fuerza discriminatoria para diferenciar pacientes en el grupo T_{is}-3, N0, M0 de individuos sanos medidos en función del área bajo la curva resulta ser tan buena para la PRN3 total en comparación con el CEA marcador establecido.

Datos preliminares indican que la PRN3 total puede ser muy útil en el seguimiento de pacientes después de la cirugía.

Ejemplo 6

ELISA para la medición de PRN3/ILEU en muestras de plasma y suero humano

Para la detección de la PRN3/ILEU en suero humano o plasma, se desarrolla un ELISA con técnica sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se utilizan anticuerpos policlonales anti-PRN3 y anti-ILEU, respectivamente, o viceversa. Para la captura del antígeno, se conjugan partes alícuotas de anticuerpo policlonal anti-PRN3 o anticuerpo policlonal anti-ILEU (ver ejemplo 2) con biotina. Para la detección del antígeno, se conjugan partes alícuotas de anticuerpo policlonal anti-PRN3 o anticuerpo policlonal anti-ILEU (ver ejemplo 2) con digoxigenina.

Las placas de microvaloración de 96 pocillos revestidas de estreptavidina se incuban con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-PRN3 o anti-ILEU biotinilado durante 60 minutos a 10 µg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Tras la incubación, las placas se lavan tres veces con NaCl al 0,9%, NaCl 0,1% Tween 20. Los pocillos se incuban luego durante 2 horas con una dilución en serie de la proteína recombinante (ver ejemplo 2) como

ES 2 316 997 T3

antígeno estándar o con muestras de plasma diluidas de los pacientes. Tras el enlace del antígeno de referencia PRN3 ó ILEU, las placas se lavan tres veces con NaCl 0,9%, Tween 20 0,1%. Para la detección específica de la PRN3/ILEU enlazada, los pocillos se incuban con 100 μ l de anticuerpo policlonal anti-PRN3 o anti-ILEU digoxigenilado durante 60 minutos a 10 μ g/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Posteriormente, las placas se lavarán tres veces para eliminar el anticuerpo no ligado. En una siguiente etapa, los pocillos se incuban con 20 mU/ml de conjugados anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog No. 1633716) durante 60 minutos en fosfato 10 mM, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Las placas se lavan seguidamente tres veces con el mismo tampón. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incuban con 100 μ l de solución de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, Catalog No. 11685767) y el DO se mide después de 30-60 minutos a 405 nm con un lector de ELISA.

Ejemplo 7

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

La exactitud se evalúa analizando las muestras líquidas individuales obtenidas de caracterizar correctamente los grupos de pacientes, es decir, 50 pacientes a los que se ha realizado una colonoscopia y en los que se ha observado que no presentan adenoma de CRC, 50 pacientes diagnosticados y clasificados como T1-3, N0, M0 de CRC y 50 pacientes diagnosticados con CRC avanzado, que presentan al menos infiltración tumoral en al menos un nódulo linfático proximal o formas más graves de metástasis, respectivamente. La CEA medida como un ensayo disponible en el comercio (Roche Diagnostics, CEA-assay (Cat No. 1 173 1629 for Elecsys® Systems Immunoassay analyzer) y la PRN3 total medida tal como se ha descrito antes son cuantificadas en un suero obtenido de cada uno de estos individuos. El análisis ROC se realiza conforme a Zweig, M.H., y Campbell, *supra*. La fuerza discriminatoria para diferenciar pacientes en el grupo T_{is}-3, N0, M0 de individuos sanos medidos en función del área bajo la curva resulta ser tan buena para la PRN3 total en comparación con el CEA marcador establecido.

Datos preliminares indican que la PRN3/ILEU puede ser muy útil en el seguimiento de pacientes después de la cirugía.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal (=CRC=) que comprende las etapas de

a) aporte de una muestra líquida obtenida de un individuo

b) puesta en contacto de dicha muestra con un aglutinante específico para la proteinasa 3 (PRN3) y un segundo aglutinante específico para el inhibidor de elastasa leucocitaria inhibidora de la proteinasa tipo serina (ILEU) en unas condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho primer aglutinante y el segundo aglutinante y PRN3 enlazada a ILEU (PRN3/ILEU), y

c) correlación de la cantidad de complejo formado en b) para el diagnóstico del cáncer colorrectal.

2. El método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** además porque dicha muestra es suero.

3. El método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** además porque dicha muestra es plasma.

4. El método conforme a la reivindicación 1, que se **caracteriza** además porque dicha muestra es sangre entera.

5. Uso de PRN3/ILEU como una molécula marcador en el diagnóstico del cáncer colorrectal de una muestra líquida obtenida de un individuo.

6. Uso de PRN3/ILEU como una molécula marcador en el diagnóstico del cáncer colorrectal de una muestra líquida obtenida de un individuo.

7. Uso conforme a la reivindicación 6, donde el diagnóstico prematuro se realiza con muestras procedentes de pacientes con CRC en la fase del adenoma.

8. Uso conforme a la reivindicación 6, donde el diagnóstico prematuro se realiza con muestras procedentes de pacientes con CRC en la etapa T_{is}-3; N0; M0.

9. Uso de PRN3/ILEU como una molécula marcador para el cáncer colorrectal en combinación con otra molécula marcador para el cáncer colorrectal en el diagnóstico del cáncer colorrectal de una muestra líquida obtenida de un individuo.

Fig. 1

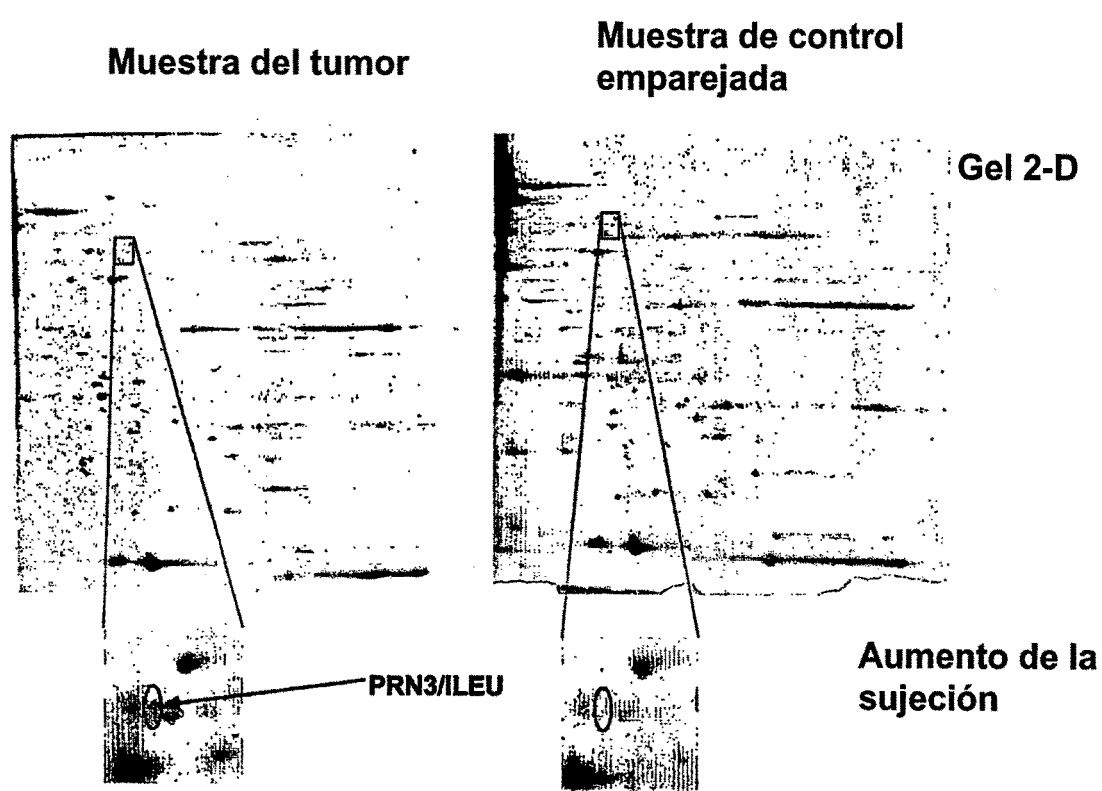
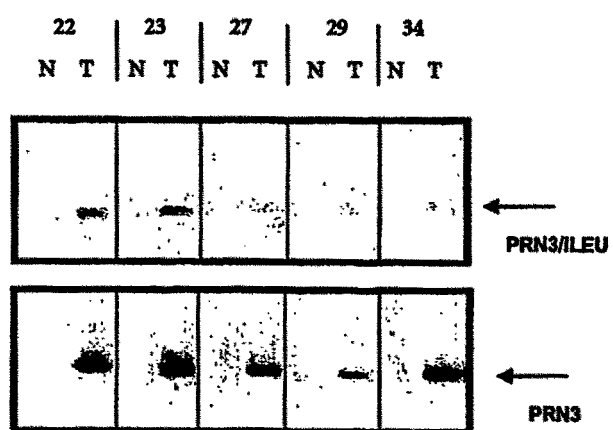


Fig. 2



ES 2 316 997 T3

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> Uso de PRN3/ILEU como marcador del cáncer colorrectal

<130> 21821

<150> EP 0301 15695.4

<151> 2003-07-21

<160> 2

<170> Versión paciente 3.2

<210> 1

<211> 256

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Proteinasa leucocitaria 3, sinónimo a mieloblastina (precursor)

<400> 1

Met Ala His Arg Pro Pro Ser Pro Ala Leu Ala Ser Val Leu Leu Ala
1 5 10 15

Leu Leu Leu Ser Gly Ala Ala Arg Ala Ala Glu Ile Val Gly Gly His
20 25 30

Glu Ala Gln Pro His Ser Arg Pro Tyr Met Ala Ser Leu Gln Met Arg
35 40 45

Gly Asn Pro Gly Ser His Phe Cys Gly Gly Thr Leu Ile His Pro Ser
50 55 60

Phe Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Arg Asp Ile Pro Gln Arg Leu
65 70 75 80

Val Asn Val Val Leu Gly Ala His Asn Val Arg Thr Gln Glu Pro Thr
85 90 95

ES 2 316 997 T3

Gln Gln His Phe Ser Val Ala Gln Val Phe Leu Asn Asn Tyr Asp Ala
 100 105 110
 5
 Glu Asn Lys Leu Asn Asp Val Leu Leu Ile Gln Leu Ser Ser Pro Ala
 115 120 125
 10
 Asn Leu Ser Ala Ser Val Ala Thr Val Gln Leu Pro Gln Gln Asp Gln
 130 135 140
 15
 Pro Val Pro His Gly Thr Gln Cys Leu Ala Met Gly Trp Gly Arg Val
 145 150 155 160
 20
 Gly Ala His Asp Pro Pro Ala Gln Val Leu Gln Glu Leu Asn Val Thr
 165 170 175
 25
 Val Val Thr Phe Phe Cys Arg Pro His Asn Ile Cys Thr Phe Val Pro
 180 185 190
 30
 Arg Arg Lys Ala Gly Ile Cys Phe Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile
 195 200 205
 35
 Cys Asp Gly Ile Ile Gln Gly Ile Asp Ser Phe Val Ile Trp Gly Cys
 210 215 220
 40
 Ala Thr Arg Leu Phe Pro Asp Phe Phe Thr Arg Val Ala Leu Tyr Val
 225 230 235 240
 45
 Asp Trp Ile Arg Ser Thr Leu Arg Arg Val Glu Ala Lys Gly Arg Pro
 245 250 255

<210> 2

<211> 379

50 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

55 <221> MISC_FEATURE

<223> Inhibidor de la elastasa leucocitaria

60

65

ES 2 316 997 T3

<400> 2

5	Met Glu Gln Leu Ser Ser Ala Asn Thr Arg Phe Ala Leu Asp Leu Phe	1 5 10 15
10	Leu Ala Leu Ser Glu Asn Asn Pro Ala Gly Asn Ile Phe Ile Ser Pro	20 25 30
15	Phe Ser Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Val Phe Leu Gly Thr Arg Gly	35 40 45
20	Asn Thr Ala Ala Gln Leu Ser Lys Thr Phe His Phe Asn Thr Val Glu	50 55 60
25	Glu Val His Ser Arg Phe Gln Ser Leu Asn Ala Asp Ile Asn Lys Arg	65 70 75 80
30	Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Lys Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Lys	85 90 95
35	Thr Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Phe Leu Val Ser Thr Gln Lys Thr Tyr	100 105 110
40	Gly Ala Asp Leu Ala Ser Val Asp Phe Gln His Ala Ser Glu Asp Ala	115 120 125
45	Arg Lys Thr Ile Asn Gln Trp Val Lys Gly Gln Thr Glu Gly Lys Ile	130 135 140
50	Pro Glu Leu Leu Ala Ser Gly Met Val Asp Asn Met Thr Lys Leu Val	145 150 155 160
55	Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met	165 170 175
60	Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg	180 185 190
65	Lys Thr Val Lys Met Met Tyr Gln Lys Lys Lys Phe Ala Tyr Gly Tyr	195 200 205
	Ile Glu Asp Leu Lys Cys Arg Val Leu Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Glu	210 215 220
	Glu Leu Ser Met Val Ile Leu Leu Pro Asp Asp Ile Glu Asp Glu Ser	225 230 235 240

ES 2 316 997 T3

Thr Gly Leu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Leu His
 245 250 255
 5
 Glu Trp Thr Lys Pro Glu Asn Leu Asp Phe Ile Glu Val Asn Val Ser
 260 265 270
 10
 Leu Pro Arg Phe Lys Leu Glu Glu Ser Tyr Thr Leu Asn Ser Asp Leu
 275 280 285
 15
 Ala Arg Leu Gly Val Gln Asp Leu Phe Asn Ser Ser Lys Ala Asp Leu
 290 295 300
 20
 Ser Gly Met Ser Gly Ala Arg Asp Ile Phe Ile Ser Lys Ile Val His
 305 310 315 320
 25
 Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
 325 330 335
 30
 Thr Ala Gly Ile Ala Thr Phe Cys Met Leu Met Pro Glu Glu Asn Phe
 340 345 350
 35
 Thr Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Ser Ser Gly
 355 360 365
 40
 Ser Ile Leu Phe Leu Gly Arg Phe Ser Ser Pro
 370 375
 45
 50
 55
 60
 65