

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 198**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 27/62 (2011.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.12.2018 PCT/JP2018/047882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.07.2019 WO19142636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.12.2018 E 18901702 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2024 EP 3742166**

54 Título: **Método de detección de cáncer renal y fármaco de prueba**

30 Prioridad:

16.01.2018 JP 2018004737

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

29.11.2024

73 Titular/es:

**PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION
YOKOHAMA CITYUNIVERSITY (50.0%)
22-2, Seto, Kanazawa-ku
Yokohama-shi, Kanagawa 236-0027, JP y
TOSOH CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARAKAWA, NORIAKI;
HIRANO, HISASHI;
NAKAIGAWA, NOBORU;
YAO, MASAHIRO y
OHTAKE, NORIHISA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 990 198 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

Método de detección de cáncer renal y fármaco de prueba

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método y a un reactivo para detectar el cáncer renal en los que se mide un inhibidor de la vía del factor tisular 2 (TFPI2).

10 **Antecedentes de la técnica**

La morbilidad estimada del cáncer renal y del tracto urinario, excluido el cáncer de vejiga, es de 19,5 por 100.000 habitantes (Centro Nacional de Investigación del Cáncer, Centro de Información sobre el Control del Cáncer, 2013), y ha aumentado en los últimos años. El cáncer renal tiene pocos síntomas subjetivos y, a menudo, se detecta accidentalmente durante los exámenes médicos y físicos, y se considera un cáncer difícil de detectar a tiempo.

Por regla general, el cáncer renal se trata mediante resección quirúrgica y, como tratamiento farmacológico, se usa un fármaco diana molecular, tal como un inhibidor de la tirosina cinasa (TKI) o un inhibidor de mTOR que inhibe la angiogénesis, un inhibidor del punto de control inmunitario y similares, según corresponda.

Los ejemplos de análisis de sangre para el cáncer renal incluyen la sedimentación de eritrocitos para cuantificar la velocidad de sedimentación de los eritrocitos, la PCR (proteína C reactiva) y la IAP (proteína ácida inmunosupresora). Sin embargo, todos estos factores se dirigen a factores que surgen de una respuesta inflamatoria inducida indirectamente por el cáncer, y su utilidad como marcadores tumorales no es definitiva. Por este motivo, la ecografía, la tomografía computarizada y la resonancia magnética son actualmente los métodos de prueba más eficaces. Sin embargo, la tomografía computarizada implica preocupaciones sobre la exposición a la radiación, y la carga que supone para los pacientes el diagnóstico por imágenes no es baja. Por tanto, se desea un método más simple y menos oneroso para detectar el cáncer renal mediante análisis de sangre.

El inhibidor 2 de la ruta del factor tisular (TFPI2) es la misma proteína que la proteína placentaria 5 (PP5) y es un inhibidor de la serina proteasa derivado de la placenta que tiene tres dominios inhibidores de la proteasa de tipo Kunitz. Con respecto a la asociación entre el TFPI2 y el cáncer, los presentes inventores, Arakawa et al., aclararon que el TFPI2 se produce específicamente a partir de la línea celular del carcinoma de células claras del cáncer de ovario, y que un aumento de la expresión génica del TFPI2 en el tejido de un paciente con cáncer de ovario se produce específicamente solo en pacientes con carcinoma de células claras (documento de patente 1). Los inventores también descubrieron que el TFPI2 en sangre aumenta significativamente en el carcinoma de células claras en comparación con los individuos sanos y los casos de endometriosis (documento de patente 2, documento no de patente 1). También se ha descrito un método para detectar el carcinoma de células claras de ovario midiendo el TFPI2 (documento de patente 3, documento no de patente 2).

Con respecto a la asociación entre el TFPI2 y el cáncer renal, se sugiere que la adición del galato de epigallocatequina (EGCG) contenido en el té verde aumenta el nivel de expresión del TFPI2 en las líneas celulares del cáncer renal humano, suprime la proliferación celular e induce la apoptosis (documento no de patente 3). The Human Protein Atlas: "Pathology atlas, Cancer, TFPI2" (26 de agosto de 2017) describe la presencia del TFPI2 en las células o tejidos del cáncer renal (documento no de patente 4). Sin embargo, hasta la fecha, no se han publicado informes sobre la cinética sanguínea del TFPI2 en el cáncer renal y no estaba claro si el TFPI2 puede aplicarse para la detección del cáncer renal.

50 **Documentos de la técnica anterior**

Documentos de patente

Documento de patente 1: Patente japonesa 5224309

Documento de patente 2: Patente japonesa 6074676

Documento de patente 3: WO2016/084912

Documentos de no patente

Documento no de patente 1: J. Proteome Res., 2013, 12 (10), págs. 4340-4350

Documento no de patente 2: PLoS one 11.10 (2016): e0165609.

Documento no de patente 3: Oncology reports 21.3 (2009): 635-640.

Documento no de patente 4: The Human Protein Atlas: "Pathology atlas, Cancer, TFPI2" (26 de agosto de 2017).

Resumen de la invención

5 Problemas a resolver mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar el cáncer renal y un reactivo que pueda usarse para el método.

10 Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores estudiaron intensamente y descubrieron que el TFPI2 se secreta en sobrenadantes de cultivo de una pluralidad de líneas celulares de cáncer renal, y que el TFPI2 en sangre aumenta significativamente en los pacientes con cáncer renal en comparación con los individuos sanos, y llegaron a la idea de que el TFPI2 puede detectar el cáncer renal, completando así la presente invención.

15

Es decir, la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

20 Efecto de la invención

La presente invención proporciona un método simple y altamente preciso para detectar el cáncer renal y un reactivo que se puede utilizar para el método.

Breve descripción de los dibujos

25 Figura 1: La figura es un diagrama que muestra la cantidad de TFPI2 en el sobrenadante del cultivo de líneas celulares. La primera ordenada representa un valor de medición de TFPI2 y la segunda ordenada representa el número de células.

30 Figura 2: La figura es un diagrama que muestra los valores de medición del TFPI2 en un grupo de individuos sanos y un grupo de pacientes con cáncer renal en un diagrama de recuadros. La ordenada representa la cantidad de TFPI2 en la sangre.

35 Figura 3: La figura es un diagrama que muestra una curva de características operativas del receptor (ROC) de un grupo de individuos sanos y un grupo de cáncer renal. La ordenada representa la sensibilidad y la abscisa representa la especificidad del 100 %.

Figura 4: La figura es un diagrama que muestra los valores de medición del TFPI2 en grupos de cáncer renal clasificados por grado histológico en un diagrama de recuadros. La ordenada representa el valor de medición del TFPI2.

40 Figura 5: La figura es un diagrama que muestra la correlación entre el diámetro del tumor del cáncer renal y el valor de medición del TFPI2. La ordenada representa el valor de medición del TFPI2 y la abscisa representa el diámetro del tumor.

45 Figura 6: La figura es un diagrama que muestra los valores de medición del TFPI2 en un grupo de cáncer renal clasificado por la presencia o ausencia de metástasis en un diagrama de recuadros. La ordenada representa el valor de medición del TFPI2.

Figura 7: La figura es un diagrama que muestra los valores de medición de TFPI2 en el ejemplo 7 en un diagrama de caja.

50 Figura 8: La figura es un diagrama que muestra los valores de medición de TFPI2 en el ejemplo 8 en un diagrama de caja.

Figura 9: La figura es un diagrama que muestra los resultados del análisis de la curva ROC para discriminar entre individuos sanos y pacientes con cáncer renal en el ejemplo 8.

Modo de llevar a cabo la invención

55 <1> Método para detectar cáncer renal de la presente invención

60 Un primer aspecto de la presente invención es un método para detectar el cáncer renal, que incluye medir la cantidad de TFPI2 en una muestra. Este es un método basado en el hecho de que el TFPI2 está presente de forma característica en una muestra biológica, tal como la sangre de un cáncer renal, en comparación con una muestra sana. La medición de la cantidad de TFPI2 en una muestra se realiza habitualmente in vitro. Mediante este método, el cáncer renal se puede detectar con alta sensibilidad y especificidad, como se muestra en los ejemplos que se describen a continuación.

65 El método de la presente invención incluye hasta una etapa de detección del cáncer renal y no incluye el acto final de determinar el diagnóstico del cáncer renal. Un médico diagnostica el cáncer renal o establece una política de tratamiento haciendo referencia a un resultado de detección y similares mediante el método de la presente invención.

El TFPI2 medido en la presente invención no está particularmente limitado y puede ser, por ejemplo, TFPI2 intacto (a continuación en el presente documento, también denominado "I-TFPI2") y/o polipéptido de procesamiento de TFPI2 (en adelante, también denominado "NT-TFPI2").

La SEQ ID NO: 1 muestra una secuencia de aminoácidos basada en el ADNc del TFPI2 humano. En la SEQ ID NO: 1, un péptido señal se extiende desde la metionina de iniciación hasta el vigésimo segundo residuo de glicina.

"TFPI2 intacto" significa el péptido representado por los residuos 23 a 235 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

"NT-TFPI2" significa un fragmento de péptido que contiene un dominio Kunitz 1 ubicado en el lado N-terminal de TFPI2 intacto, como se describe en el documento de patente 3. Más específicamente, el NT-TFPI2 es un péptido que contiene al menos una secuencia desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o el residuo 130 de cisteína de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un péptido que contiene una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más de identidad con la secuencia descrita anteriormente. La identidad es preferiblemente no inferior al 90 %, más preferiblemente no inferior al 95 %. El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido que tiene una secuencia que es la misma que la secuencia anterior, excepto que uno o varios aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden. El término "varios" significa preferiblemente de 2 a 20, más preferiblemente de 2 a 10, aún más preferiblemente de 2 a 5. Aunque el NT-TFPI2 también puede tener otros fragmentos peptídicos en ambos lados de la secuencia anterior, preferiblemente no tiene un determinante antigénico para un anticuerpo que reconoce el dominio 3 de Kunitz del TFPI2.

Los ejemplos de la muestra derivada del paciente (muestra de ensayo) en la presente invención incluyen componentes sanguíneos tales como sangre completa, células sanguíneas, suero y plasma. El uso de un fluido corporal como componente sanguíneo como muestra es ventajoso porque una prueba se puede realizar de forma fácil y no invasiva, y teniendo en cuenta la facilidad de recolectar una muestra y la versatilidad de otros elementos de prueba, es ventajoso usar un componente sanguíneo como muestra. La razón de dilución de la muestra puede seleccionarse adecuadamente entre sin diluir y 100 veces diluida según el tipo y el estado de la muestra que se va a usar.

El tiempo de muestreo de la muestra en la presente invención no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede recogerse una muestra en cualquier momento desde un periodo preoperatorio en el que se sospecha un cáncer renal debido a un diagnóstico por imágenes o similares y se realiza un examen detallado hasta un periodo de seguimiento después del diagnóstico definitivo del cáncer renal mediante un examen patológico posoperatorio, y cualquier muestra recolectada en cualquier etapa, tal como antes y después del diagnóstico definitivo y antes y después del inicio del tratamiento, puede usarse en el método de la presente invención.

En el método de detección de la presente invención, es preferible determinar que el cáncer renal se detecta cuando la cantidad de TFPI2 obtenida mediante la medición supera un valor estándar preestablecido (valor de corte). En este caso, la cantidad de TFPI2 puede ser una cantidad de TFPI2 intacta, una cantidad de NT-TFPI2 o un total de una cantidad de TFPI2 intacta y una cantidad de NT-TFPI2, y el total de la cantidad de TFPI2 intacto y la cantidad de NT-TFPI2 es más preferible desde el punto de vista de lograr una medición fácil y una sensibilidad y especificidad suficientes.

El valor estándar usado para la determinación puede ser el valor medido o el valor de concentración convertido. El valor de concentración convertido significa un valor convertido a partir del valor medido en función de una curva de calibración preparada usando TFPI2 como muestra estándar.

El valor estándar (valor límite) para determinar el cáncer renal se puede establecer adecuadamente en un valor medido que muestre una sensibilidad y especificidad óptimas midiendo a los individuos sanos y los cánceres renales y analizando la curva de características operativas del receptor (ROC). Por ejemplo, el valor estándar del TFPI2 puede establecerse en 219 pg/ml en el caso del plasma y 189 pg/ml o 200 pg/ml en el caso del suero, como se describe en los ejemplos siguientes, pero no se limita a los mismos.

A continuación en el presente documento, se describirá un método para medir el TFPI2.

En la presente invención, la cantidad de NT-TFPI2 o la cantidad de TFPI2 intacto en una muestra se puede medir individualmente, o los valores se pueden sumar para obtener la cantidad total. La cantidad total de NT-TFPI2 y TFPI2 intacto en una muestra se puede medir con un sistema de medición capaz de medir de una vez. Alternativamente, tal como se describe más adelante, la cantidad de NT-TFPI2 puede medirse indirectamente a partir de la cantidad total de ambas mediciones y de la cantidad medida de TFPI2 intacto solo.

En el método de la presente invención, el método para medir la cantidad de NT-TFPI2 y/o la cantidad de TFPI2 intacto no está limitado. Los ejemplos del método incluyen métodos que utilizan la reacción antígeno-anticuerpo en la que se usa un anticuerpo que reconoce el NT-TFPI2 y/o el TFPI2 intacto, y los métodos que utilizan la espectrometría de masas.

(a) Un método de competencia que utiliza un objeto de medición etiquetado y un anticuerpo que reconoce el objeto de medición, método que utiliza la unión competitiva del objeto de medición etiquetado y el objeto de medición contenido en la muestra al anticuerpo.

5 (b) Un método que utiliza la resonancia de plasmones superficiales, en el que la muestra se pone en contacto con un chip en el que se inmoviliza un anticuerpo que reconoce el objeto de medición, y se detecta una señal que depende de la unión del anticuerpo al objeto de medición.

10 (c) Un inmunoensayo de polarización por fluorescencia que utiliza un anticuerpo marcado con fluorescencia que reconoce un objeto de medición, cuyo inmunoensayo utiliza el fenómeno de que la unión del anticuerpo al objeto de medición provoca un aumento en el grado de polarización de la fluorescencia.

15 (d) Un método tipo sándwich que utiliza dos tipos de anticuerpos (uno de los cuales es un anticuerpo marcado) que reconocen el objeto de medición en diferentes epítomos, en el que se permite la formación de un complejo de las tres moléculas, es decir, los dos anticuerpos y el objeto de medición.

20 (e) Un método en el que el pretratamiento se lleva a cabo concentrando el objeto de medición en la muestra utilizando un anticuerpo que reconoce el objeto de medición, y el polipéptido de la proteína unida se detecta mediante un espectrómetro de masas o similar.

Aunque los métodos (d) y (e) son simples y versátiles, el método (d) es preferible para procesar un gran número de muestras, ya que las tecnologías relacionadas con los reactivos y los dispositivos para este método están suficientemente establecidas.

25 Los ejemplos específicos de los métodos para medir la cantidad de NT-TFPI2 y/o la cantidad de TFPI2 intacto utilizando la reacción antígeno-anticuerpo incluyen los siguientes.

30 (A) Un método que utiliza un anticuerpo que reconoce tanto el NT-TFPI2 como el TFPI2 intacto, en donde se mide la cantidad total de NT-TFPI2 y del TFPI2 intacto (sistema de ensayo NT+I-TFPI2). El anticuerpo que reconoce tanto el NT-TFPI2 como el TFPI2 intacto es preferiblemente un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en la región desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o hasta el residuo 130 de cisteína en la secuencia de aminoácidos del TFPI2 representada por la SEQ ID NO: 1. El anticuerpo es más preferiblemente un anticuerpo que tiene un determinante antigénico en el dominio 1 de Kunitz del TFPI2. En los casos en los que se usa el método tipo sándwich mencionado anteriormente en este método, se usan dos tipos de anticuerpos para diferentes epítomos como anticuerpo.

40 (B) Un método que usa un anticuerpo que no reconoce el NT-TFPI2 pero reconoce el TFPI2 intacto, en el que se mide la cantidad de TFPI2 intacto solo (sistema de ensayo I-TFPI2). El anticuerpo que no reconoce el NT-TFPI2 pero reconoce el TFPI2 intacto es preferiblemente un anticuerpo que tiene un determinante antigénico en el dominio 3 de Kunitz del TFPI2. En los casos en los que se usa el método tipo sándwich mencionado anteriormente en este método, se usan dos tipos de anticuerpos para diferentes epítomos como anticuerpo. Al menos uno de estos es un anticuerpo que no reconoce el NT-TFPI2 pero reconoce el TFPI2 intacto, y el otro puede ser un anticuerpo que no reconoce el NT-TFPI2 pero reconoce el TFPI2 intacto, o un anticuerpo que reconoce tanto el NT-TFPI2 como el TFPI2 intacto.

45 (C) Un método en el que la cantidad de TFPI2 intacto solo medida en el sistema de ensayo I-TFPI2 de (B) se resta de la cantidad total de NT-TFPI2 y de TFPI2 intacto medida en el sistema de ensayo NT+I-TFPI2 de (A), para calcular la cantidad de NT-TFPI2 solo.

50 (D) Un método que usa un anticuerpo que no reconoce el TFPI2 intacto pero reconoce el NT-TFPI2, en el que se mide la cantidad de NT-TFPI2 solo. Los ejemplos del anticuerpo que no reconoce el TFPI2 intacto pero reconoce el NT-TFPI2 incluyen anticuerpos que reconocen específicamente una secuencia peptídica en la porción C-terminal del NT-TFPI2. Por ejemplo, en los casos en los que se usa el método tipo sándwich mencionado anteriormente, dicho anticuerpo se usa como anticuerpo en fase sólida, y un anticuerpo que tiene un sitio de reconocimiento en el dominio 1 de Kunitz se usa como anticuerpo de detección.

55 En el método para detectar el cáncer renal de la presente invención, se puede usar como criterio la cantidad de NT-TFPI2 sola medida mediante el método de (C) o (D). Sin embargo, también se puede obtener suficiente sensibilidad y especificidad usando la cantidad total de NT-TFPI2 y TFPI2 intacto medida mediante el método de (A) como criterio. Este último método es preferible desde el punto de vista del hecho de que el anticuerpo se puede obtener fácilmente y de que la medición se puede llevar a cabo simplemente en una sola etapa.

60 Un anticuerpo que reconoce el NT-TFPI2 y/o el TFPI2 intacto se puede obtener inmunizando a un animal usando como inmunógeno, por ejemplo, un polipéptido o proteína NT-TFPI2, un oligopéptido compuesto por una región parcial del polipéptido TFPI2 intacto o la proteína TFPI2, o un polinucleótido que codifica la región intacta o parcial del polipéptido NT-TFPI2 o de la proteína TFPI2. La proteína o el oligopéptido o polipéptido pueden no reflejar la estructura tridimensional del TFPI2 en un organismo vivo, o la estructura del mismo puede cambiar durante un proceso de

preparación. Por tanto, un anticuerpo obtenido puede no tener una alta especificidad o capacidad de unión al TFPI2 en un organismo vivo deseado, e incluso cuando se construye un sistema de medición usando el presente anticuerpo, la concentración de TFPI2 contenida en una muestra como resultado puede no cuantificarse con precisión.

5 Por otro lado, cuando un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica una región intacta o parcial de un polipéptido TFPI2 o una proteína TFPI2 intacta se expresa como inmunógeno, la región intacta o parcial del polipéptido TFPI2 o proteína TFPI2 intacta se expresa en un animal inmunizado, se provoca una respuesta inmunitaria y un anticuerpo que tiene una alta especificidad y capacidad de unión (es decir, alta afinidad) al TFPI2 en una muestra se obtiene, lo cual es preferible.

10 El animal que se va a usar para la inmunización no está limitado siempre que el animal tenga la capacidad de producir anticuerpos. El animal puede ser un mamífero usado normalmente para la inmunización, tal como un ratón, una rata o un conejo, o puede ser un ave, tal como un pollo.

15 En la sangre, también está el TPPI1, conocido como homólogo del TFPI2. Por tanto, es deseable usar un anticuerpo que no se cruce con el TFPI1 sino que reconozca específicamente sólo el TFPI2.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un reactivo para medir la cantidad de TFPI2 en la fabricación de un reactivo para detectar el cáncer renal. En este caso, el reactivo para medir la cantidad de TFPI2 es preferiblemente un reactivo para medir el total de la cantidad de polipéptido de procesamiento de TFPI2 y la cantidad de TFPI2 intacto. El reactivo para medir la cantidad de TFPI2 es preferiblemente un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en una región desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o el residuo 130 de cisteína de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y más preferiblemente un anticuerpo que reconoce el dominio 1 de Kunitz del TFPI2.

25 Por tanto, también se puede decir que la presente invención es el uso de un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en una región desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o el residuo 130 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en la fabricación de un reactivo para detectar el cáncer renal.

30 También se puede decir que la presente invención es el uso de un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en una región desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o el residuo 130 de cisteína de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 en la detección del cáncer renal.

35 El anticuerpo que reconoce el TFPI2 puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal.

40 El método de establecimiento de una célula de hibridoma que produce un anticuerpo que reconoce el TFPI2 puede seleccionarse adecuadamente de los métodos cuyas técnicas se han establecido. Por ejemplo, una célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que reconoce el TFPI2 se puede establecer recogiendo células B de un animal inmunizado mediante el método anterior, fusionando las células B con células de mieloma eléctricamente o en presencia de polietilenglicol, seleccionando una célula de hibridoma que produce un anticuerpo deseado usando el medio HAT y preparando la célula de hibridoma seleccionada en un monoclon mediante el método de dilución limitante.

45 La selección del anticuerpo monoclonal que reconoce el TFPI2 usado en la presente invención se puede llevar a cabo basándose en la afinidad por el TFPI2 del tipo de anclaje GPI (glicosilfosfatidilinositol) o por el TFPI2 secretor derivado de un sistema de expresión del huésped.

50 El hospedador no está limitado, y puede seleccionarse adecuadamente entre microorganismos tales como E. coli o levaduras, células de insectos y células animales que los expertos en la técnica usan habitualmente para la expresión de proteínas. El huésped es preferentemente una célula de mamífero, ya que permite la expresión de una proteína que tiene una estructura similar a la del TFPI2 natural mediante una modificación postraduccional, tal como la unión disulfuro o la glicosilación. Los ejemplos de células de mamífero incluyen la línea celular 293T derivada del riñón embrionario humano (HEK), la línea celular COS7 de riñón de mono, las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células cancerosas aisladas de seres humanos.

55 El método de purificación del anticuerpo que se va a usar en la presente invención puede seleccionarse adecuadamente entre métodos cuyas técnicas se han establecido. Por ejemplo, después de cultivar células de hibridoma que se establecen mediante el método anterior y que producen un anticuerpo, puede recogerse el sobrenadante del cultivo y el anticuerpo puede concentrarse, si es necesario, mediante precipitación con sulfato de amonio. Posteriormente, mediante cromatografía de afinidad usando un portador en el que se inmoviliza la proteína A, la proteína G, la proteína L o similares, y/o mediante cromatografía de intercambio iónico, es posible la purificación del anticuerpo.

60 El anticuerpo marcado usado para la reacción antígeno-anticuerpo en el método tipo sándwich descrito anteriormente puede prepararse marcando un anticuerpo purificado mediante el método anterior con una enzima tal como la

65

peroxidasa o la fosfatasa alcalina. El marcaje también puede llevarse a cabo usando un método cuya técnica se haya establecido suficientemente.

5 El método para medir la cantidad de TFPI2 utilizando espectrometría de masas en el método de la presente invención se describe a continuación de forma concreta.

10 En el caso de una muestra de sangre, una etapa de pretratamiento se lleva a cabo preferiblemente eliminando las principales proteínas contenidas en grandes cantidades en la sangre, como la albúmina, la inmunoglobulina y la transferrina, utilizando Agilent Human 14 o similares, y realizando un fraccionamiento adicional mediante intercambio iónico, filtración en gel, HPLC de fase inversa y/o similares. Alternativamente, sólo el TFPI2 puede recuperarse específicamente mediante un método inmunológico usando un anticuerpo anti-TFPI2.

15 La medición se puede llevar a cabo mediante espectrometría de masas en tándem (EM/EM), cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM), espectrometría de masas de tiempo de vuelo por ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF/EM), espectrometría de masas por ionización por desorción láser mejorada en superficie (SELDI-EM) o similares.

<2> Reactivo para la detección del cáncer renal de la presente invención

20 En los casos en los que el reactivo de la presente invención se usa en el método tipo sándwich descrito anteriormente, el reactivo contiene preferiblemente, como anticuerpo, dos tipos de anticuerpos para diferentes epítomos.

25 El anticuerpo contenido en el reactivo de la presente invención puede ser un anticuerpo en sí mismo, un anticuerpo marcado o un anticuerpo inmovilizado en una fase sólida.

30 El reactivo de la presente invención se describe a continuación de manera concreta para los casos en los que se usa para un método tipo sándwich en dos etapas, que es un modo del método tipo sándwich. Sin embargo, la presente invención no está limitada a los mismos.

30 El reactivo de la presente invención puede prepararse mediante el método descrito en los siguientes puntos (I) a (III).

35 (I) En primer lugar, el anticuerpo 1, uno de los dos tipos de anticuerpos para diferentes epítomos que reconocen el TFPI2 (en lo sucesivo denominado "anticuerpo 1" y "anticuerpo 2"), se une a un portador capaz de separarse B/F (unido/libre), como una inmunoplaqueta o partículas magnéticas. El método de unión puede ser una unión física utilizando un enlace hidrófobo o un enlace químico utilizando un reactivo conector capaz de reticular dos sustancias entre sí.

40 (II) Después de la unión del anticuerpo 1 al portador, la superficie del portador se somete a un tratamiento de bloqueo con seroalbúmina bovina, leche desnatada, un agente bloqueante del inmunoensayo disponible en el mercado o similares para prevenir la unión no específica, para proporcionar un reactivo primario.

45 (III) Después de marcar el otro anticuerpo, el anticuerpo 2, se proporciona una solución que contiene el anticuerpo marcado obtenido como reactivo secundario. Los ejemplos preferidos de la sustancia con la que se marca el anticuerpo 2 incluyen enzimas tales como la peroxidasa y la fosfatasa alcalina; sustancias detectables con dispositivos de detección, como sustancias fluorescentes, sustancias quimioluminiscentes y radioisótopos; y sustancias a las que se une específicamente otra molécula, como la biotina, a la que se une específicamente la avidina. Los ejemplos preferidos de la solución para el reactivo secundario incluyen tampones con los que se puede llevar a cabo favorablemente la reacción antígeno-anticuerpo, tales como el tampón fosfato y el tampón Tris-HCl. El reactivo así preparado de la presente invención se puede liofilizar, si es necesario.

50 En los casos de un método tipo sándwich de una sola etapa, la unión del anticuerpo 1 al portador y el posterior tratamiento de bloqueo se pueden llevar a cabo de la misma manera que en (I) y (II) para preparar un portador inmovilizado por anticuerpos, y se puede añadir además un tampón que contenga un anticuerpo 2 marcado al portador inmovilizado por anticuerpos, para proporcionar un reactivo.

55 Para la medición del TFPI2 mediante un método tipo sándwich de dos etapas usando reactivos obtenidos mediante el método descrito anteriormente, se puede llevar a cabo el método descrito en los siguientes puntos (IV) a (VI).

60 (IV) El reactivo primario preparado en (II) se pone en contacto con una muestra durante un periodo de tiempo predeterminado a una temperatura constante. En cuanto a las condiciones de reacción, la reacción se puede llevar a cabo a una temperatura dentro del intervalo de 4 °C a 40 °C durante 5 minutos a 180 minutos.

65 (V) Las sustancias que no han reaccionado se eliminan mediante separación B/F y, a continuación, el reactivo secundario preparado en (III) se pone en contacto con el producto de reacción resultante durante un periodo de tiempo predeterminado a una temperatura constante para permitir la formación de un complejo tipo sándwich. En cuanto a las condiciones de reacción, la reacción se puede llevar a cabo a una temperatura dentro del intervalo de 4 °C a 40 °C durante 5 minutos a 180 minutos.

(VI) Las sustancias que no han reaccionado se eliminan mediante separación B/F y se cuantifica la sustancia marcadora del anticuerpo marcado. Basándose en una curva de calibración preparada usando una solución de TFPI2 que tiene una concentración conocida como muestra estándar, se cuantifica el TFPI2 humano en la muestra.

La cantidad de cada componente reactivo, tal como el anticuerpo, contenido en el agente, puede establecerse adecuadamente dependiendo de condiciones tales como la cantidad de la muestra, el tipo de muestra, el tipo de reactivo y el método de medición. Más específicamente, por ejemplo, en los casos en los que la cantidad de TFPI2 se mide como se describe a continuación mediante un método tipo sándwich usando 20 µl de suero o plasma como muestra, la cantidad del anticuerpo que se va a unir al portador puede ser de 100 ng a 1000 µg, y la cantidad del anticuerpo marcado puede ser de 2 ng a 20 µg por sistema de reacción en el que 20 µl de la muestra reaccionan con los anticuerpos.

El reactivo de la presente invención es aplicable tanto a la medición manual como a la medición usando un dispositivo de inmunodiagnóstico automático. La medición utilizando un dispositivo de inmunodiagnóstico automático es especialmente preferible, ya que permite la medición sin verse influenciada por factores inhibidores de la medición endógenos y enzimas competidoras contenidas en la muestra, y también permite la cuantificación rápida de la concentración de TFPI2.

El método para detectar el cáncer renal de la presente invención se puede aplicar al método para tratar el cáncer renal.

Es decir, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para tratar el cáncer renal en un sujeto de prueba, que incluye:

(i) una etapa en la que se identifica a un sujeto de prueba como aquella en la que un valor medido del importe del TFPI2 supera un valor estándar preestablecido;

(ii) una etapa en la que se proporciona un tratamiento al sujeto de prueba identificado por tener una cantidad medida de TFPI2 por encima de un valor estándar preestablecido.

En un aspecto preferido del método para tratar el cáncer renal, la cantidad de TFPI2 es la suma de la cantidad de polipéptido de procesamiento de TFPI2 y la cantidad de TFPI2 intacto.

En la identificación de la etapa (i), la cantidad de TFPI2 se mide preferiblemente mediante una reacción antígeno-anticuerpo usando un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en la región desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o el residuo 130 de cisteína de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. Más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce el dominio 1 de Kunitz del TFPI2.

En la identificación de la etapa (i), la medición de la cantidad de TFPI2 puede realizarse mediante espectrometría de masas.

Los ejemplos del tratamiento de la etapa (ii) incluyen la resección quirúrgica, la farmacoterapia y la radioterapia, y los ejemplos del fármaco incluyen inhibidores de la tirosina cinasa, inhibidores de mTOR e inhibidores de puntos de control inmunitario, pero no están particularmente limitados.

Ejemplos

A continuación se muestran ejemplos para una descripción concreta de la presente invención. Sin embargo, estos ejemplos simplemente muestran ejemplos de la presente invención, y la presente invención no está limitada por los ejemplos.

<Ejemplo 1> Preparación del reactivo para la medición de TFPI2

Según el método del documento de patente 3, se preparó un reactivo para la medición del TFPI2 usando un anticuerpo del TFPI2 obtenido mediante el método de inmunización con ADN de la siguiente manera.

(1) Se permitió la adsorción física de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI2 (TS-TF04) a portadores de ferrita insolubles en agua a temperatura ambiente durante un día y una noche, de modo que la adsorción se produjo a 100 ng/portador, y luego se bloqueó con tampón Tris 100 mM (pH 8,0) complementado con BSA al 1 % a 53 °C durante 4 horas, para preparar portadores inmovilizados por el anticuerpo anti-TFPI2.

(2) Se preparó un anticuerpo anti-TFPI2 marcado con fosfatasa alcalina con anticuerpos monoclonales anti-TFPI2 (TS-TF01) utilizando un kit de etiquetado de fosfatasa alcalina (fabricado por Dojindo Laboratories).

(3) En cada uno de los recipientes permeables a la fuerza magnética (volumen, 1,2 ml), se colocaron 12 portadores inmovilizados por anticuerpos preparados en (1) y se añadieron 100 µl de un tampón (tampón Tris complementado con BSA al 3 %, pH 8,0) complementado con 1 µg/ml de un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina

preparado en (2), y luego se liofilizó para preparar un reactivo de ensayo TFPI2. Los reactivos de ensayo TFPI2 preparados se cerraron herméticamente y se sellaron bajo gas nitrógeno, y se almacenaron a 4 °C hasta el ensayo.

<Ejemplo 2> Evaluación de sobrenadantes de cultivos celulares, incluido el cáncer renal

Se cultivaron 293 células T de riñón fetal humano como células normales y células CAKI1, ACHN y 786-O como células de cáncer renal a 37 °C durante 3 días según un método convencional, y el número de células se midió después de recolectar varios sobrenadantes del cultivo. El medio de cultivo solo y 20 µl de sobrenadantes de cultivo se evaluaron con el reactivo para medir el TFPI2 preparado en el ejemplo 1. Como dispositivo de evaluación, se usó un dispositivo de inmunoensayo enzimático totalmente automático AIA-2000 (fabricado por Tosoh Corporation; número de notificación de fabricación/comercialización, 13B3X90002000009). La medición del TFPI2 mediante el dispositivo de inmunoensayo enzimático completamente automático AIA-2000 se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento.

(1) Dispensando automáticamente 20 µl de una muestra y 80 µl de un diluyente que contenga un surfactante en un recipiente que almacena un reactivo de ensayo TFPI2 preparado en el ejemplo 1;

(2) llevar a cabo la reacción antígeno-anticuerpo a una temperatura constante de 37 °C durante 10 minutos;

(3) realizar ocho lavados con un tampón que contenga un surfactante después de la separación B/F; y

(4) añadir fosfato de 4-metilumbeliferilo al recipiente,

la concentración de 4-metilumbeliferona producida por la fosfatasa alcalina por unidad de tiempo se proporcionó como valor medido (intensidad de TFPI2, nmol/ (l·s)).

El resultado de evaluación se muestra en la figura 1. El TFPI2 mostró claramente un alto valor en los sobrenadantes de cultivo de los tres tipos de células de cáncer renal en comparación con las células 293T, y se reveló que las células de cáncer renal secretaban TFPI2 en los sobrenadantes de cultivo.

<Ejemplo 3> Evaluación de muestras clínicas

Las muestras clínicas utilizadas en los siguientes ejemplos se muestran en la tabla 1. El Departamento de Urología de la Universidad de la Ciudad de Yokohama recolectó 21 casos de plasma de cáncer renal con el mismo protocolo, los cuales se proporcionaron con el consentimiento informado y la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la Ciudad de Yokohama. Se adquirieron cuarenta y nueve cajas de plasma de individuos sanos de BizcomJapan, Inc.

Las muestras clínicas se midieron mediante el método descrito en el ejemplo 2, se preparó una curva de calibración usando una proteína recombinante TFPI2 disponible comercialmente (TechnoPro, Inc. TechnoPro R&D, Company) como estándar, y se calculó la concentración de TFPI2 en la muestra.

[Tabla 1]

	Número de casos	Edad mediana (desviación estándar)
Saludable	49	58 (±3)
Cáncer renal	21	65 (±11)
	70	

El diagrama de caja del resultado de la medición del TFPI2 se muestra en la figura 2. Se reveló que TFPI2 mostró un valor alto con una diferencia estadísticamente significativa en el cáncer renal en comparación con individuos sanos (prueba U de Mann-Whitney, $p < 0,0001$).

El resultado del análisis ROC se muestra en la figura 3. El área bajo la curva (AUC) fue de 0,8552, lo que indica que el TFPI2 tuvo un rendimiento favorable en la detección del cáncer renal. El valor máximo del índice de Youden se estableció como el valor límite del TFPI2 basado en el índice de Youden (sensibilidad + especificidad) - 100). Cuando el valor límite del TFPI2 se estableció en 219 pg/ml, la sensibilidad fue del 85,7 % y la especificidad del 75,5 %, lo que demuestra que el rendimiento de la detección del cáncer renal fue favorable.

<Ejemplo 4> Asociación entre el grado histológico y el TFPI2

Los grupos de muestras de cáncer renal se clasificaron por grado histológico (grado: G), y el diagrama de caja del valor de medición de TFPI2 de cada grupo se muestra en la figura 4. El TFPI2 no fue significativamente diferente entre el grado 2 bajo y los grados 3 y 4 altos. Estos resultados sugieren que el TFPI2 no se asoció con el grado histológico y que la expresión del TFPI2 mejoró incluso en la etapa temprana del cáncer renal.

<Ejemplo 5> Análisis de correlación del diámetro del tumor y TFPI2

El resultado del análisis de la correlación entre el diámetro del tumor de cáncer renal y el TFPI2 se muestra en la figura 5. Hubo una baja correlación positiva entre el TFPI2 y el diámetro del tumor, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas (coeficiente de correlación de rangos de Spearman, $r = 0,27$, $p = 0,2365$).

<Ejemplo 6> Asociación entre la metástasis del cáncer y el TFPI2

El grupo de muestra de cáncer renal se clasificó en dos grupos dependiendo de la presencia o ausencia de metástasis, y en la figura 6 se muestra un diagrama de caja de los valores de medición del TFPI2 de cada grupo. No se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en los valores de medición del TFPI2 entre los dos grupos (prueba U de Mann-Whitney, $p = 0,5906$) y no hubo una relación clara entre el TFPI2 y la metástasis.

<Ejemplo 7> Cálculo del valor estándar del TFPI2 y del intervalo de referencia en sujetos japoneses sanos

102 sueros de sujetos varones sanos fueron muestras voluntarias recolectadas internamente con consentimiento informado, y 120 sueros de mujeres sanas se proporcionaron en la Universidad de la Ciudad de Yokohama con el consentimiento informado y la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la Ciudad de Yokohama. El TFPI2 se midió mediante el método descrito en el ejemplo 3, y se calculó un intervalo de valores estándar para individuos sanos de acuerdo con el valor estándar del TFPI2 en individuos sanos (por ejemplo, valor mediano + 2DE) y la guía EP28-A3 del CLSI.

El diagrama de caja del resultado de la medición del TFPI2 se muestra en la figura 7, y el valor estándar y el intervalo de referencia calculados a partir de individuos sanos se muestran en la tabla 2. Como resultado de este estudio, no hubo diferencias de género en los valores de medición del TFPI2 en individuos sanos japoneses, y el valor estándar del TFPI2 calculado a partir de la mediana + 2DE de los individuos sanos fue de 200 pg/ml.

[Tabla 2]

	TFPI2 (pg/ml)		
	Masculino	Mujer	Hombre + mujer
Valor mínimo	43	55	43
Percentil del 25 %	104	107	109
Mediana	125	132	131
Percentil del 75 %	148	156	151
Valor máximo	246	223	246
Intervalos de confianza del 95 %	127-139	126-123	126-136
Valor estándar (mediana + 2DE)	197	198	200
Intervalo de referencia	63 - 212	56 - 211	61 - 210

<Ejemplo 8> Evaluación de muestras clínicas

52 casos de cáncer renal sérico (carcinoma de células claras): 40 casos, carcinoma papilar: 4 casos, otro cáncer renal: 8 casos) fueron muestras recolectadas según el mismo protocolo en el Departamento de Urología de la Universidad de la Ciudad de Yokohama, y se proporcionaron con el consentimiento informado y la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de la Ciudad de Yokohama.

El TFPI2 se midió mediante el método descrito en el ejemplo 3, y el rendimiento de detección del cáncer renal se evaluó utilizando el valor de medición del TFPI2 de un individuo sano descrito en el ejemplo 7.

La figura 8 muestra el valor de medición de TFPI2 en el diagrama de cajas. El TFPI2 tendió a tener un valor alto en el carcinoma de células claras y el carcinoma papilar en el tipo histológico del cáncer renal, y también mostró un valor alto en algunos de los tipos histológicos clasificados en otros tipos.

La figura 9 es un resultado del análisis de la curva ROC cuando se compararon individuos sanos y pacientes con cáncer renal. El área bajo la curva (AUC) fue de 0,79, lo que indica que el TFPI2 tuvo un rendimiento favorable en la detección del cáncer renal. Cuando se utilizó un valor máximo del índice de Youden de 189 pg/ml como valor estándar basado en el índice de Youden (sensibilidad + especificidad) - 100), el rendimiento discriminatorio entre pacientes con cáncer renal y personas sanas fue de una sensibilidad del 59,6 % y una especificidad del 94,6 %.

A partir de los resultados anteriores, se demostró que el TFPI2 tenía un rendimiento favorable en la detección del cáncer renal al establecer un valor estándar adecuado en el suero, como en el plasma descrito en el ejemplo 3.

Aplicabilidad industrial

5 La presente invención proporciona un método para detectar a un paciente con cáncer renal mediante un análisis de sangre que es sencillo y supone una carga relativamente baja para el paciente. Se espera que esto contribuya al tratamiento médico del cáncer renal, que no tiene un marcador tumoral eficaz y depende del diagnóstico por imágenes, y es considerablemente útil desde el punto de vista industrial.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar cáncer renal, comprendiendo dicho método medir la cantidad de TFPI2 (inhibidor 2 de la ruta del factor tisular) en una muestra in vitro,
5 en donde la muestra se selecciona de componentes sanguíneos.
 2. El método según la reivindicación 1, en donde el cáncer renal se detecta cuando dicha cantidad medida de TFPI2 supera un valor estándar predeterminado.
10
 3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha cantidad de TFPI2 es la suma de la cantidad de polipéptido de procesamiento de TFPI2 y la cantidad de TFPI2 intacto.
 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha cantidad de TFPI2 se mide mediante una reacción antígeno-anticuerpo usando un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en la región desde el residuo 23 de ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o el residuo 130 de cisteína de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
15
 5. El método según la reivindicación 4, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo que reconoce el dominio 1 de Kunitz de TFPI2.
20
 6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la medición se lleva a cabo usando espectrometría de masas.
 7. Uso de un reactivo que comprende un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en la región desde el residuo 23 del ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o hasta el residuo 130 de la cisteína en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para medir la cantidad de TFPI2 en una muestra para detectar el cáncer renal in vitro, en donde la muestra se selecciona de componentes sanguíneos.
25
 8. Uso de un anticuerpo que se une a un determinante antigénico en la región desde el residuo 23 del ácido aspártico hasta el residuo 131 de histidina o hasta el residuo 130 de la cisteína en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 para medir la cantidad de TFPI2 en una muestra para detectar el cáncer renal in vitro,
30 en donde la muestra se selecciona de componentes sanguíneos.
35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Cantidad de TFPI2 en los sobrenadantes de cultivos celulares

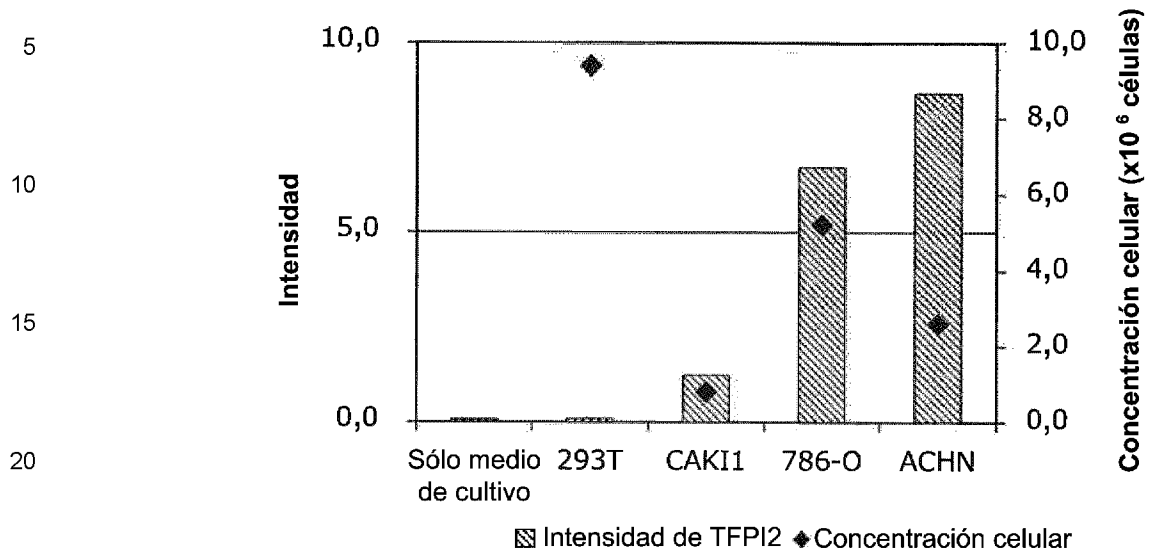


Figura 1

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

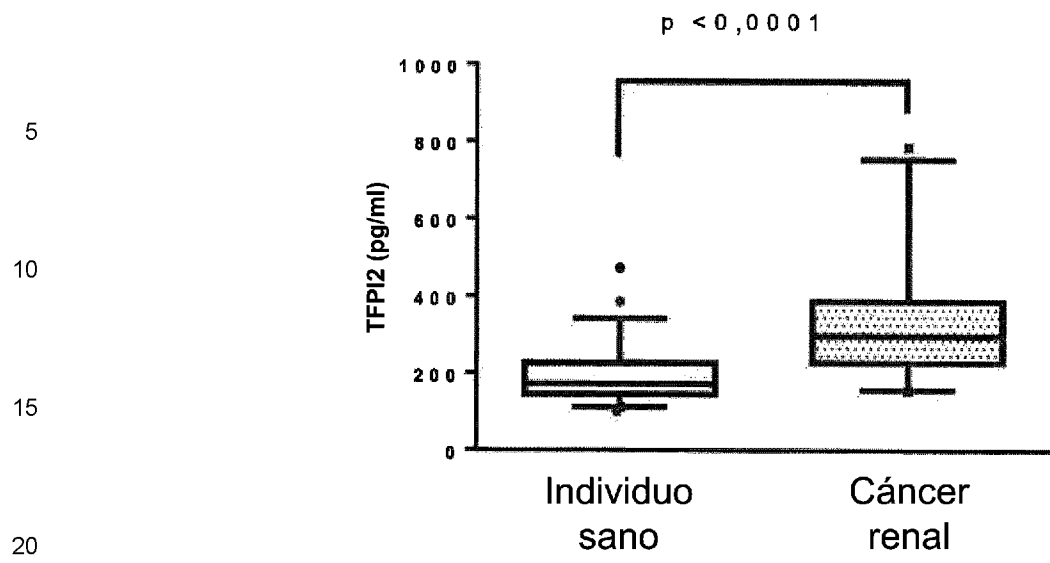


Figura 2

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

Curva ROC (normal frente a ccRCC)

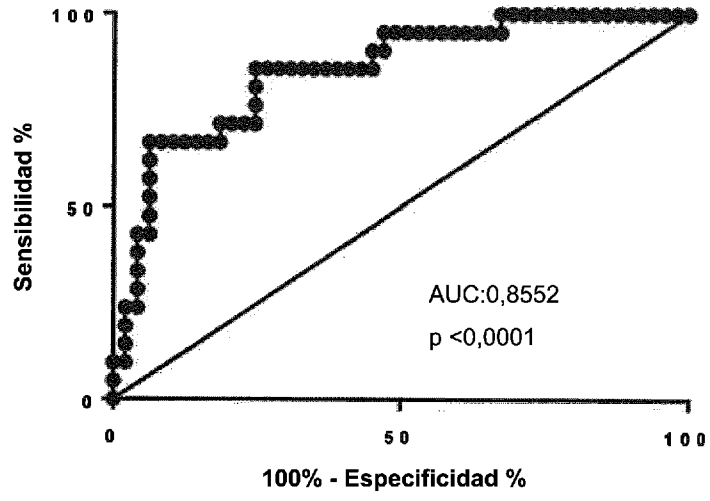


Figura 3

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

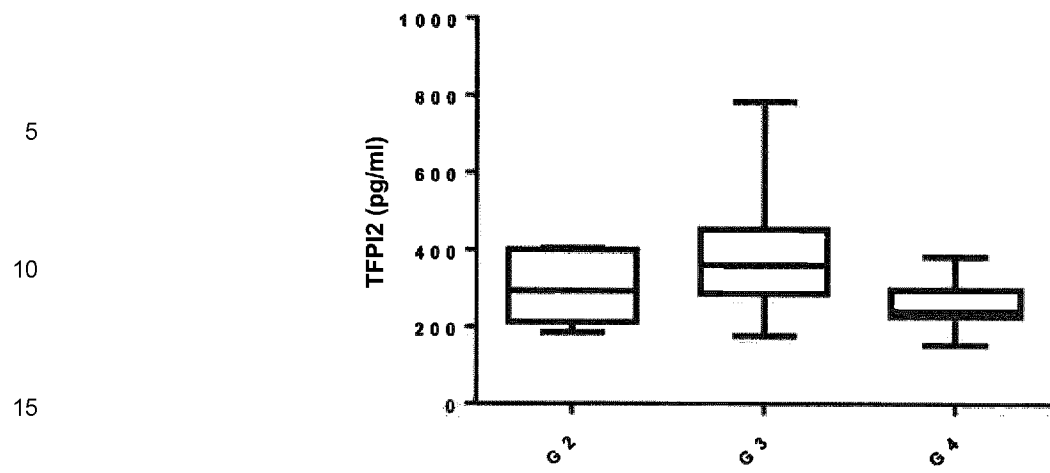


Figura 4

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

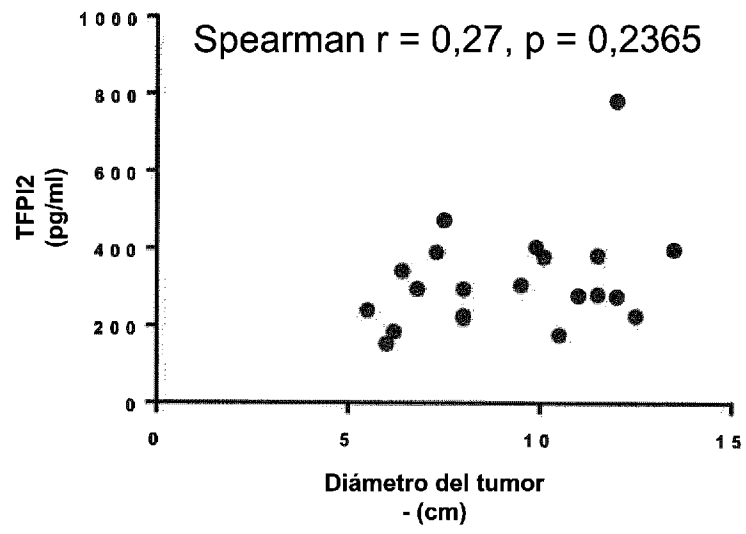


Figura 5

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

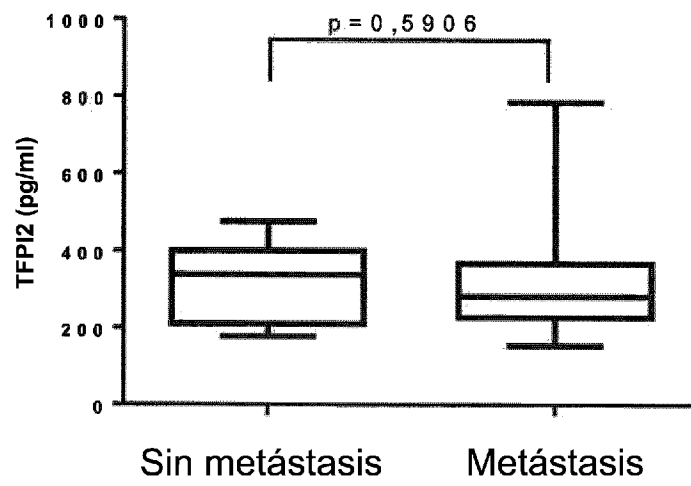


Figura 6

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

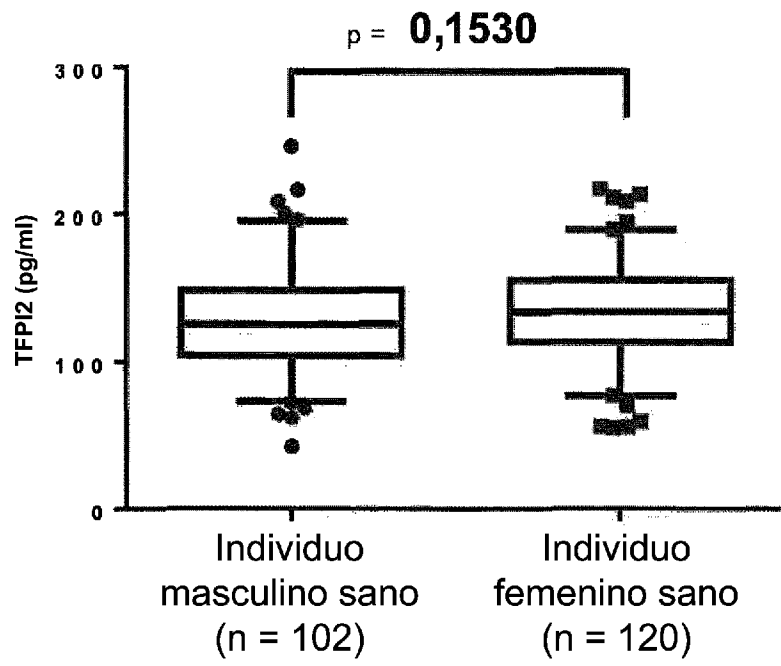


Figura 7

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

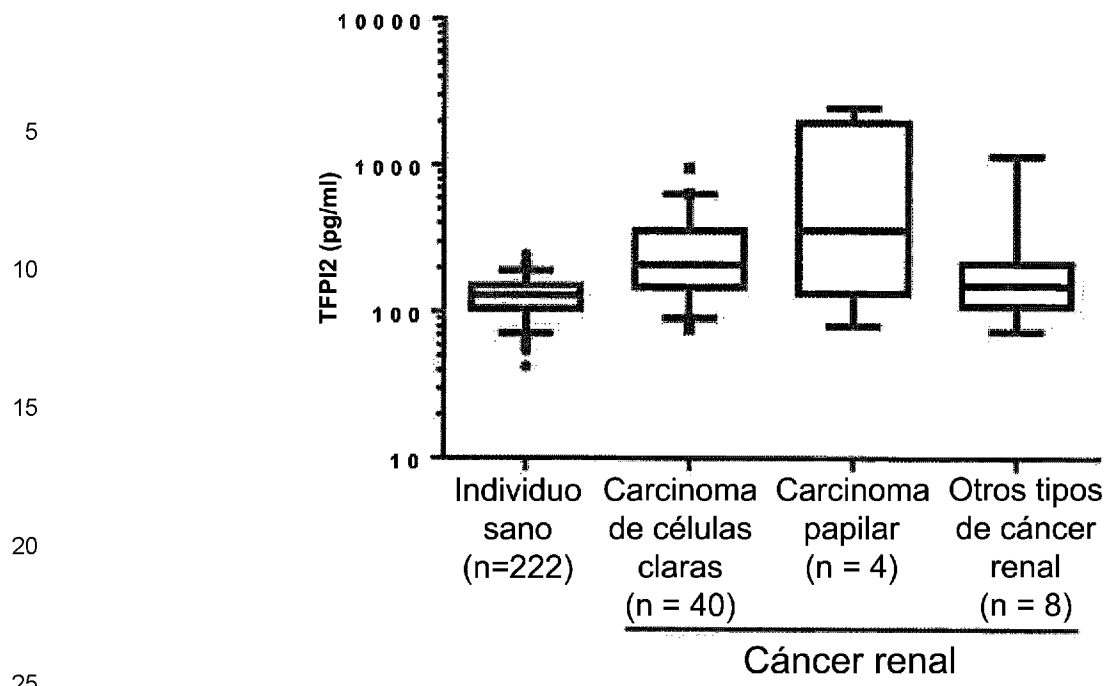


Figura 8

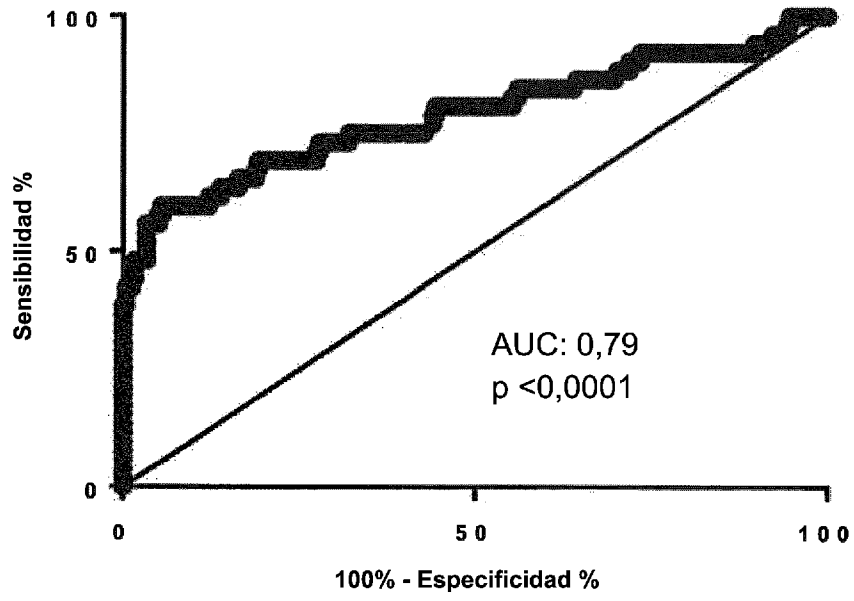


Figura 9

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