



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 469**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04739585 .0**

86 Fecha de presentación : **04.06.2004**

87 Número de publicación de la solicitud: **1636584**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **22.03.2006**

54 Título: **Utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II (CRABP II) como marcador del cáncer de mama.**

30 Prioridad: **06.06.2003 EP 03012942**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

73 Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es: **Pestlin, Gabriele;**
Andres, Herbert;
Berndt, Peter;
Hagmann, Marie-Luise;
Karl, Johann;
Langen, Hanno y
Zolg, Werner

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 285 469 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

Utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II (CRABP II) como marcador del cáncer de mama.

La presente invención está relacionada con el diagnóstico del cáncer de mama. Describe la utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II en el diagnóstico del cáncer de mama. Asimismo, está especialmente relacionada con un método para el diagnóstico del cáncer de mama a partir de una muestra líquida procedente de un individuo mediante la medición de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II en dicha muestra. La medición de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II puede emplearse, p. ej., en la detección precoz o en el diagnóstico del cáncer de mama.

El cáncer sigue constituyendo uno de los principales retos de la salud pública a pesar del progreso realizado en la detección y el tratamiento. Entre los diversos tipos de cáncer existentes, el cáncer de mama (CM) es uno de los más frecuentes en las mujeres del mundo occidental.

Cuanto antes se pueda detectar/diagnosticar el cáncer, mejor será la tasa general de supervivencia. Este hecho es especialmente válido en el caso del CM. Los estadios avanzados del tumor presentan un mal pronóstico. Más de un tercio de los pacientes morirá por el progreso de la enfermedad en un plazo de cinco años a partir del diagnóstico, lo que corresponde a una tasa de supervivencia a cinco años aproximada del 40%. El tratamiento actual solamente está curando una fracción de los pacientes y se observa claramente un mayor efecto en los pacientes a los que se ha realizado el diagnóstico en un estadio inicial de la enfermedad.

Con respecto al CM como problema de salud pública, es esencial que se desarrollen medidas preventivas y de cribado más efectivas para el cáncer de mama.

Los procedimientos de detección más temprana del cáncer de mama que están disponibles en la actualidad consisten en la exploración clínica mamaria y la mamografía. Sin embargo, antes de que un tumor sea palpable o pueda detectarse en un mamograma, habitualmente su tamaño ya es significativo. La densidad del tejido mamario y la edad del paciente son factores importantes de predicción de la exactitud de la mamografía exploratoria. La sensibilidad oscila del 63% en mujeres con mamas con una densidad extrema al 87% en mujeres con mamas con una proporción de tejido adiposo extremadamente elevada. La sensibilidad aumenta con la edad del 69% en mujeres de unos 40 años al 83% en mujeres a partir de 80 años (Carney, P.A., *et al.*, Ann. Intern. Med. 138 (3) (2003) 168-175). Solamente el 20-25% de las anomalías detectadas por mamografía que se biopsian resultan ser malignas. La visualización de lesiones precancerosas o cancerosas es la mejor estrategia para la detección precoz, pero la mamografía es una prueba costosa que requiere una actuación y una interpretación de los resultados realizadas con un alto grado de habilidad y de cuidado (WHO, Screening for Breast Cancer, 10 de mayo, 2002; Esserman, L., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 94 (2002) 369-375).

En los últimos años se ha descrito una enorme cantidad de genes denominados específicos de la mama, o incluso denominados específicos del cáncer de mama. La gran mayoría de los artículos de investigación o solicitudes de patentes correspondientes se basan en datos obtenidos mediante el análisis de los patrones de expresión del RNA en el tejido mamario (canceroso) comparado con un tejido diferente o con un tejido normal adyacente. Estas investigaciones se pueden resumir bajo el concepto de técnicas de visualización de mRNA diferenciales.

La patente WO 00/60076 se mencionará y será comentada como ejemplo de datos disponibles de técnicas de visualización de mRNA. Esta solicitud describe y reivindica más de doscientos polinucleótidos aislados y sus polipéptidos correspondientes, así como su empleo en la detección del CM. No obstante, es de conocimiento general que las diferencias en la cantidad de mRNA no se reflejan en el nivel de las proteínas correspondientes. Una proteína codificada por un mRNA escaso puede encontrarse en cantidades muy elevadas y una proteína codificada por un mRNA abundante puede sin embargo ser prácticamente imposible de detectar o encontrar (Chen, G., *et al.*, Molecular and Cellular Proteomics, 1.4 (2002) 304-313). Esta falta de correlación entre la cantidad de mRNA y la cantidad de proteína se debe a razones como la estabilidad del mRNA, la eficiencia de la traducción, la estabilidad de la proteína, etc. También existen estrategias de investigación recientes sobre las diferencias en los patrones proteicos entre diferentes tejidos o entre tejidos sano y enfermo con el fin de identificar moléculas marcadoras candidatas que puedan emplearse en el diagnóstico del CM. Wulfkühle *et al.* Cancer Research 62 (2002) 6740-6749 han identificado cincuenta y siete proteínas que se expresaron de forma diferencial en tejido mamario canceroso y tejido normal adyacente. No se informó de ningún dato procedente de muestras líquidas obtenidas de un individuo.

La patente WO 02/23200 describe cerca de doce manchas asociadas a cáncer de mama halladas mediante desorción e ionización por láser en superficie mejorada (SELDI, siglas en inglés). Estas manchas se observan con mayor frecuencia en sueros obtenidos de pacientes con CM que en los obtenidos de controles sanos. Sin embargo, se desconoce la identidad de la/s molécula/s que conforman dicha mancha, p. ej. su secuencia.

Durante muchos años se han utilizado secreciones mamarias obtenidas a través del pezón como método no invasivo potencial para identificar marcadores específicos del cáncer de mama. Kuerer *et al.* compararon las secreciones mamarias emparejadas obtenidas a través de los dos pezones de mujeres con carcinoma de mama invasivo unilateral mediante electroforesis en gel 2D (Kuerer, H.M., *et al.*, Cancer 95 (2002) 2276-2282). Se detectaron de 30 a 202 man-

chas proteicas diferentes en las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón de mamas con carcinoma de mama y no en las secreciones mamarias correspondientes obtenidas a través del pezón de las mamas sanas. Estas manchas se detectaron mediante un análisis de imagen de gel. No obstante se desconoce identidad de las manchas proteicas. A pesar del enorme listado, que no para de crecer, de marcadores proteicos candidatos en el campo del CM, hasta la fecha se desconoce la utilidad clínica/diagnóstica de estas moléculas. Para que tenga utilidad clínica, un marcador diagnóstico nuevo como marcador individual debe ser por lo menos igual de bueno que el mejor marcador individual que se conoce en el campo. O bien, un marcador nuevo debería suponer una mejora de la sensibilidad o la especificidad del diagnóstico, tanto si se emplea de forma individual como en combinación con uno o varios marcadores diferentes. La sensibilidad o la especificidad diagnóstica de una prueba se valora mejor por sus características de rendimiento diagnóstico, que serán descritas con detalle más adelante.

En la actualidad, para facilitar el diagnóstico en el campo del CM solamente hay disponibles análisis sanguíneos diagnósticos basados en la detección del antígeno tumoral 15-3 (CA 15-3), una mucina asociada al cáncer, y del antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína asociada al cáncer. El antígeno tumoral CA 15-3 se ve normalmente aumentado en pacientes con cáncer de mama avanzado. En mujeres con cáncer de mama de estadio inicial es poco habitual que presenten una concentración de CA 15-3 elevada (Duffy, M.J., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38 (2001) 225-262). Los cánceres de ovario, pulmón y próstata también pueden incrementar los niveles de CA 15-3. Unos niveles elevados de CA 15-3 pueden asociarse a trastornos no cancerosos, como enfermedades benignas de mama u ovario, endometriosis, enfermedad inflamatoria pélvica o hepatitis. El embarazo y la lactancia también pueden causar el aumento de los niveles de CA 15-3 (National Cancer Institute, *Cancer Facts, Fact Sheet* 5.18 (1998) 1-5). El uso principal del CEA consiste en la evaluación del cáncer de colon, especialmente cuando se ha producido metástasis. No obstante, una diversidad de cánceres puede producir niveles elevados de CEA, incluido el cáncer de mama.

Debido a la falta de especificidad en cuanto a órganos o tumores, no se recomienda la medición de CA 15-3 o de CEA para el cribado del CM. Estos marcadores tumorales son herramientas de diagnóstico que sirven de ayuda en el seguimiento de pacientes con CM (Untch, M., *et al.*, *J. Lab. Med.* 25 (2001) 343-352).

Las fuentes de muestras más habituales en la práctica clínica son la sangre total, el suero, el plasma o las secreciones mamarias obtenidas a través del pezón. La identificación de un marcador tumoral de CM inicial que permitiera la detección fiable del cáncer o proporcionara información pronóstica precoz, podría suponer una prueba diagnóstica que sería de gran ayuda en el diagnóstico y en el tratamiento de esta enfermedad. En consecuencia, existe una necesidad clínica urgente de mejorar el diagnóstico hematológico del CM. Es de especial importancia el hecho de mejorar el diagnóstico precoz del CM, ya que la probabilidad de supervivencia de los pacientes con un diagnóstico precoz es mucho mayor que la de aquellos a los que se les ha diagnosticado la enfermedad en un estadio avanzado.

La labor de la presente invención fue investigar la posibilidad de identificar un nuevo marcador que facilite el diagnóstico del CM.

De forma sorprendente, se ha encontrado que con la utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II se pueden superar, al menos en parte, los problemas conocidos en la técnica actual.

La presente invención, por tanto, está relacionada con un método para el diagnóstico del cáncer de mama que comprende los siguientes pasos: a) obtener una muestra líquida de un individuo, b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específica a la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II y c) correlacionar la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico del cáncer de mama.

Otra realización preferida de la invención es un método para el diagnóstico del cáncer de mama que comprende los siguientes pasos: a) poner en contacto una muestra líquida obtenida de un individuo con un agente de unión específica a la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II bajo las condiciones adecuadas para que se forme un complejo entre dicho agente de unión y la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II; y b) correlacionar la cantidad de complejo formado en (a) con el diagnóstico del cáncer de mama.

Como apreciarán los expertos en la materia, cualquier método de diagnóstico de este tipo se realiza *in vitro*. Después del procedimiento la muestra del paciente se deshecha. La muestra del paciente se emplea exclusivamente para el método de diagnóstico *in vitro* de la invención y el material que la compone no se transfiere de vuelta al organismo del paciente. De forma característica, la muestra es una muestra líquida.

La proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II (CRABP-II) (Swiss-PROT: P29373) se caracteriza por la secuencia dada en el ID. de SEC. núm.: 1. Esta secuencia es traducida a una proteína con un peso molecular de 15.562 Da y un punto isoeléctrico a pH 5,43.

Las dos isoformas de proteína celular transportadora de ácido retinoico (CRABP-I y -II) fueron caracterizadas por primera vez por Siegenthaler *et al.* en 1992. Se observó que CRABP-II era la isoforma principal, expresada en grandes cantidades en la epidermis humana por fibroblastos y queratinocitos (Siegenthaler, G., *Biochemical Journal* 287 (1992) 383-389).

ES 2 285 469 T3

Anders *et al.* (Anders, V., *et al.*, Journal of Investigative Dermatology 106 (1996) 1070-1074) encontraron una concentración aumentada de CRABP-II en casos de queratoacantoma y cáncer de células escamosas, pero no de carcinoma de células basales de la piel.

5 En el citoplasma, CRABP-II regula la concentración, el transporte y el metabolismo del ácido retinoico intracelular. Se ha demostrado que el ácido retinoico induce la duplicación de los niveles de mRNA en el cáncer de células escamosas mediante regulación positiva transcripcional (Vo, H.P., Crowe, D.L., Anticancer Research 18 (1998) 217-224).

10 La presencia de CRABP-II en células de cáncer de mama humano fue descrita por primera vez por Wang *et al.* 1998. Localizaron CRABP-II en células de cáncer de mama humano por medio de técnicas de inmunohistoquímica (Wang, Y., *et al.*, Laboratory Investigation 78 (1998) 30 A).

15 La función de CRABP-II en las células de carcinoma mamario la describieron Budhu y Noy en 2002 (Molecular and Cellular Biology 22 (2002) 2632-2641). El CRABP-II citosólico al unirse al ácido retinoico adquiere una localización nuclear e interacciona con el receptor del ácido retinoico con quien constituye un complejo de vida corta. La sobreexpresión de CRABP-II en las líneas celulares mamarias MCF7 mejora su sensibilidad a la inhibición del crecimiento inducida por el ácido retinoico.

20 En un primer análisis proteómico de unidades ductales/lobulares normales emparejadas con carcinoma *in situ* ductal (DCIS, siglas en inglés) de la mama humana, Wulfskuhle *et al.* (Cancer Research 62 (2002) 6740-6749) identificaron cincuenta y siete proteínas que se expresaron de forma diferencial en células normales y células preneoplásicas. En DCIS se halló un nivel de CRABP-II cinco veces superior que en las células normales. Se ha descrito un aumento comparable a este para un máximo de 23 proteínas. No obstante, no se llevaron a cabo más investigaciones como, p.
25 ej., si era posible detectar CRABP-II en muestras líquidas (Wulfskuhle, J.D. *et al.*, *supra*).

La proteína CRABP-II se ha mencionado en diferentes solicitudes de patente, además de un gran número de genes y sus proteínas para el diagnóstico o el pronóstico del desarrollo o de la progresión del cáncer de mama (WO 02/77176, WO 02/101075, WO 02/59377). Pero no se ha descrito la aplicación diagnóstica.

30 Como resultará obvio para los expertos en la materia, no se debe interpretar que la presente invención se limite a la proteína CRABP-II completa de ID. de SEC. núm.: 1. La presente invención también engloba fragmentos fisiológicos o artificiales de CRABP-II, modificaciones secundarias de CRABP-II y variantes alélicas de CRABP-II. Los fragmentos artificiales comprenden preferiblemente un péptido producido de forma sintética o mediante técnicas recombinantes,
35 que al menos contenga un epítipo de interés diagnóstico formado por al menos 6 aminoácidos contiguos procedentes de la secuencia descrita bajo el ID. de SEC. núm.: 1. Este fragmento puede emplearse de forma ventajosa para generar anticuerpos o bien como patrón en un inmunoensayo. Es más preferible que el fragmento artificial contenga por lo menos dos epítipos de interés que sean adecuados para preparar un inmunoensayo de tipo sándwich.

40 En realizaciones preferidas, el nuevo marcador CRABP-II puede emplearse para realizar funciones de control o de cribado.

45 Cuando se emplea en el control de los pacientes el método diagnóstico de acuerdo con la presente invención puede servir de ayuda para evaluar la carga tumoral, la eficacia del tratamiento y la recurrencia del tumor durante el seguimiento realizado al paciente. Unos niveles aumentados de CRABP-II están directamente correlacionados con la carga tumoral. Un incremento a corto plazo de CRABP-II tras la quimioterapia (de pocas horas a 14 días) puede servir como un indicador de la muerte de células neoplásicas. En el seguimiento de los pacientes (de 3 meses a 10 años), un incremento de CRABP-II puede emplearse como indicador de la recurrencia del tumor.

50 En una realización preferida, el método diagnóstico presentado por la presente invención se emplea para realizar funciones de cribado. Es decir, se utiliza para evaluar individuos que carecen de un diagnóstico previo de CM midiendo el nivel de CRABP-II y la correlación del nivel medido con la presencia o ausencia de CM.

55 La clasificación del cáncer en estadios atiende a criterios de extensión, progresión y gravedad de la enfermedad. Agrupa a los pacientes de cáncer de manera que permite realizar generalizaciones acerca del pronóstico o de la elección del tratamiento.

60 Hoy en día el sistema TNM es la clasificación de la extensión anatómica de cáncer más empleada. Representa un sistema aceptado internacionalmente de estadificación uniforme. 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 metástasis a distancia). Los criterios del TNM los publica la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer) (Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds.): TNM Classification of Malignant Tumours, quinta edición, 1997). El sistema de estadificación para el cáncer de mama ha sido revisado recientemente (Singletary, S.E., *et al.*, Journal of Clinical Oncology 20 (2002) 3628-3636).

65 Lo que realmente es importante es que el diagnóstico precoz del CM se traduce en un pronóstico mucho mejor. Así, el mejor pronóstico lo tienen aquellos pacientes que se encuentran en estadios tan iniciales como T_{is}, N0, M0 o T1-3, N0, M0 que, si se tratan adecuadamente, presentan una probabilidad mayor del 90% de sobrevivir 5 años después

ES 2 285 469 T3

del diagnóstico mientras que la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes diagnosticados cuando ya padecen metástasis a distancia es del 18%.

5 Por lo que respecta a la presente invención, un diagnóstico precoz del CM consiste en un diagnóstico en un estado preneoplásico (DCIS) o en un estadio tumoral en el que no existe ningún tipo de metástasis (ni a distancia ni ganglionar), es decir, T_{is}, N0, M0 o T1-4, N0, M0. T_{is} denota carcinoma *in situ*.

10 En una realización preferida se emplea CRABP-II para diagnosticar el CM en un estadio no metastásico, es decir, que el diagnóstico se hace en un estadio T_{is}, N0, M0 o T1-3, N0, M0 (=T_{is}-3, N0, M0).

El método diagnóstico presentado por la presente invención está basado en una muestra líquida que procede de un individuo. A diferencia de los métodos conocidos en el campo, CRABP-II se mide de forma específica en la misma muestra líquida empleando un agente de unión específica.

15 Un agente de unión específica es, p. ej., un receptor de CRABP-II, una lectina de unión a CRABP-II o un anticuerpo frente a CRABP-II. Un agente de unión específica presenta una afinidad por su molécula diana correspondiente de al menos 10⁷ l/mol. La afinidad del agente de unión específica por su molécula diana es preferiblemente de 10⁸ l/mol o incluso más preferiblemente de 10⁹ l/mol. Como apreciará cualquier experto en la materia, el término “específico” se emplea para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen de forma significativa al agente de unión
20 específica a CRABP-II. De un modo preferible, el grado de unión a una biomolécula diferente a la molécula diana da como resultado una afinidad de unión de solamente el 10% de la afinidad de la molécula diana, más preferiblemente de solo el 5% o menos. El agente de unión específica más preferido debe cumplir los dos criterios mínimos anteriores, para la afinidad y para la especificidad.

25 Un agente de unión específica es preferiblemente un anticuerpo reactivo frente a CRABP-II. El término “anticuerpo” se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos o constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo. También se puede utilizar cualquier fragmento de anticuerpo que cumpla los criterios anteriores de un agente de unión específica.

30 Los anticuerpos se generan mediante procedimientos establecidos actualmente en el campo, p. ej. como describe Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990); el libro entero, pero en especial las páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam). Además, Los expertos en la materia ya conocen bien los métodos que emplean inmunosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante estos métodos es posible mejorar la calidad de los anticuerpos policlonales y, por tanto, su acción en los inmunoensayos. (Tijssen, P., *supra*,
35 páginas 108-115).

Para alcanzar los resultados descritos en la presente invención se han empleado anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos policlonales se han generado en conejos. No obstante, también se pueden utilizar claramente anticuerpos policlonales procedentes de otras especies como ratas o cobayas. Los anticuerpos monoclonales se obtienen de células esplénicas de ratones inmunizados. Dado que se puede producir cualquier cantidad que se requiera de anticuerpos monoclonales con unas propiedades constantes, estos representan una herramienta ideal para el desarrollo de una prueba de aplicación en la práctica clínica. La generación y el uso de anticuerpos monoclonales frente a CRABP-II en un método según la presente invención constituye aun otra realización preferida.

45 Como apreciará cualquier experto en la materia, ahora que CRABP-II ha sido identificada como marcador que sirve para el diagnóstico del CM, cabe la posibilidad de utilizar métodos alternativos para alcanzar un resultado comparable a los resultados de la presente invención. Por ejemplo, se pueden emplear estrategias alternativas para generar anticuerpos. Estas estrategias incluyen, entre otras, la utilización de péptidos sintéticos que representan un epítipo de CRABP-II para la inmunización. Es preferible que un péptido sintético contenga una subsecuencia del ID. de SEC.
50 núm.: 1 que sea específica de CRABP-II; es decir, que en comparación posea una homología menor con otros péptidos relacionados. Se prefiere que el péptido sintético contenga una secuencia contigua formada por un número de 5 a 25 residuos aminoácidos del ID. de SEC. núm.: 1. Es más preferible que el péptido contenga una secuencia contigua formada por un número de 10 a 15 residuos aminoácidos del ID. de SEC. núm.: 1.

55 Una subsecuencia especialmente preferible de CRABP-II consiste en los residuos aminoácidos 85-96 del ID. de SEC. núm.: 1. Una subsecuencia más preferida todavía consiste en los residuos aminoácidos 106-120 del ID. de SEC. núm.: 1 y un residuo de cisteína adicionado a su extremo carboxiterminal para facilitar el acoplamiento mediante enlaces SH.

60 Como alternativa es posible utilizar métodos de inmunización genética también conocidos como vacunación genética.

Para realizar las mediciones, la muestra líquida obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específica a CRABP-II bajo unas condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre CRABP-II y el agente de unión.
65 No es necesario especificar estas condiciones adecuadas de incubación puesto que los expertos en la materia pueden fácilmente identificarlas sin hacer ningún esfuerzo especial.

ES 2 285 469 T3

En un último paso de acuerdo con el método descrito en la presente invención se mide la cantidad de complejo y se correlaciona con el diagnóstico de CM. Como apreciará cualquier experto en la materia, existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo formado entre el agente de unión específica y CRABP-II, todos ellos descritos con detalle en libros de texto de referencia (véase, p. ej., Tijssen P., *supra* o Diamandis *et al.*, eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston).

El ensayo de detección de CRABP-II es preferiblemente uno de tipo sándwich. En este tipo de ensayo se emplea un primer agente de unión específica para capturar CRABP-II por un lado y, por otro, un segundo agente de unión específica que está marcado para facilitar su detección de forma directa o indirecta.

Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha observado de forma sorprendente que CRABP-II puede medirse en una muestra líquida obtenida de un individuo. Para aplicar el marcador CRABP-II en el diagnóstico del CM no se necesita ninguna muestra de tejido o de biopsia.

En una realización preferida, el método presentado por la presente invención se lleva a cabo con suero como material líquido de muestra.

En otra realización preferida, el método presentado por la presente invención se lleva a cabo con plasma como material líquido de muestra.

En otra realización preferida, el método presentado por la presente invención se lleva a cabo con sangre total como material líquido de muestra.

En otra realización preferida, el método presentado por la presente invención se lleva a cabo con secreciones mamarias obtenidas a través del pezón como material líquido de muestra.

Mientras la aplicación de los métodos habituales en la proteómica a muestras de tejido conduce a la identificación de muchos candidatos de marcadores potenciales para el tejido seleccionado, los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar sorprendentemente CRABP-II en una muestra líquida del organismo. Es aún más sorprendente el hecho de que han sido capaces de demostrar que la presencia de CRABP-II en dicha muestra líquida obtenida de un individuo puede correlacionarse con el diagnóstico del cáncer de mama.

La utilización de los anticuerpos frente a CRABP-II puede resultar muy ventajosa en procedimientos establecidos, p. ej. en la detección de células de cáncer de mama *in situ*, en biopsias o en procedimientos inmunohistológicos.

Preferiblemente se emplea un anticuerpo frente a CRABP-II en un inmunoensayo cualitativo (CRABP-II presente o ausente) o cuantitativo (se determina la cantidad de CRABP-II).

La medición de la cantidad de proteína CRABP-II ha resultado ser muy ventajosa en el campo del CM. Por esta razón, en otra realización preferida, la presente invención está relacionada con el uso de la proteína CRABP-II como marcador molecular en el diagnóstico del cáncer de mama a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

El término “molécula marcadora” se emplea para indicar que un nivel aumentado del analito CRABP-II medido en un líquido del organismo de un individuo marca la presencia de CM.

Se prefiere especialmente que el nuevo marcador CRABP-II se utilice en el diagnóstico del cáncer de mama.

El propio uso de la proteína CRABP-II representa un progreso importante en el desafiante campo del diagnóstico del CM. Si se combina la medición de CRABP-II con otros marcadores conocidos, p. ej. CA 15-3 y CEA, o con otros marcadores de CM conocidos o que aún están por descubrir, será posible obtener todavía más adelantos. Por esta razón, en otra realización preferida, la presente invención está relacionada con el uso de CRABP-II como marcador molecular de cáncer de mama en combinación con uno o varios marcadores moleculares de cáncer de mama para el diagnóstico del cáncer de mama a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo. A este respecto, la expresión “uno o varios” denota de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5 y, más preferiblemente, 3. Los otros marcadores de CM seleccionados con los que se puede combinar la medición de CRABP-II son CEA y CA 15-3. Lo más preferido es que se use CRABP-II como parte de un repertorio de marcadores que incluye por lo menos CRABP-II y CA 15-3. Por lo tanto, otra realización preferida de la presente invención consiste en la utilización de la proteína CRABP-II como marcador molecular de cáncer de mama en combinación con uno o varios marcadores moleculares de cáncer de mama para el diagnóstico del cáncer de mama a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo, siendo al menos uno de los otros marcadores moleculares CA 15-3.

El método de la invención se emplea preferiblemente con muestras de pacientes de los que se sospecha que padecen cáncer de mama. Un individuo del que se sospecha que padece cáncer de mama es un individuo para el que han descartado otros tipos de cáncer. Otros cánceres incluyen, entre otros, los de colon, pulmones, estómago, ovario y próstata. Por tanto, una realización preferida de la invención consiste en un método para el diagnóstico del cáncer de mama que comprende los siguientes pasos: a) obtener una muestra líquida de un individuo del que se sospecha que padece cáncer de mama, b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específica a la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II bajo las condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre

ES 2 285 469 T3

dicho agente de unión y la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II y c) correlacionar la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico del cáncer de mama.

5 Los reactivos para diagnóstico en el campo de los ensayos de unión específica, como los inmunoensayos, normalmente se proporcionan en un equipo que comprende el agente de unión específica y los reactivos complementarios necesarios para llevar a cabo el ensayo. La presente invención también está relacionada por tanto con un equipo inmunológico que contiene por lo menos un agente de unión específica a CRABP-II y reactivos complementarios para la medición de CRABP-II.

10 La mejor descripción de la exactitud de una prueba la ofrecen las características de rendimiento diagnóstico (ROC, del inglés *Receiver Operating Characteristics*) (véase en especial Zweig, M. H. y Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). La curva ROC es una representación de todos los pares formados por los datos referentes a sensibilidad y a especificidad que resultan de la variación continua del umbral de decisión a lo largo de la totalidad del abanico de datos observados.

15 La función clínica de una prueba analítica depende de su exactitud diagnóstica o su capacidad de clasificar de forma correcta los individuos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad del análisis para distinguir correctamente entre dos trastornos diferentes de los individuos investigados. Estos trastornos son, por ejemplo, salud o enfermedad o enfermedad benigna frente a enfermedad maligna.

20 En cada caso, la curva ROC representa la superposición entre las dos distribuciones mediante la representación del parámetro sensibilidad frente a 1 - especificidad a lo largo de todo el abanico de umbrales de decisión. En el eje de ordenadas se encuentra la sensibilidad o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados verdaderos positivos)/(número de resultados verdaderos positivos + número de resultados falsos negativos)]. A este parámetro también se le ha denominado positividad en cuanto a la presencia de una enfermedad o trastorno. Para calcularla se parte solamente del subgrupo afectado. En el eje de abscisas se encuentra la fracción de falsos positivos [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Se trata de un índice de especificidad y se calcula exclusivamente a partir del subgrupo no afectado. Dado que las fracciones de falsos y verdaderos positivos se calculan de forma separada totalmente, si se utilizan los resultados de dos subgrupos diferentes, la curva ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la curva ROC representa un binomio sensibilidad/especificidad que corresponde a un umbral de decisión en concreto. Un análisis con una discriminación perfecta (sin superposición en las dos distribuciones de resultados) presenta una curva ROC que discurre por la parte superior izquierda, allí donde la fracción de verdaderos positivos es 1,0 o del 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). La curva teórica de un análisis sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal con 45° de inclinación que va de la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayoría de las curvas se encuentran entre estos dos extremos. (Si la curva ROC se encuentra totalmente bajo la diagonal del 45°, esto se puede solucionar invirtiendo el criterio para "positividad" de "mayor que" a "menor que" o viceversa.) Por lo que respecta a la calidad, cuanto más cercana esté la curva a la esquina superior izquierda mayor será la exactitud general del análisis.

30 Un objetivo práctico en la cuantificación de la exactitud diagnóstica de una prueba de laboratorio consiste en expresar su resultado con un único número. La medida global más común es el área bajo la curva ROC. La convención es que esta área siempre es $\geq 0,5$ (si no es así, es posible invertir la norma de decisión para conseguir que se cumpla). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores analíticos de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencias evidentes entre la distribución de los dos grupos de valores). El área no depende solamente de una fracción en concreto de la curva, como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad cuando la especificidad es del 90%, sino de la curva en su totalidad. Se trata de una expresión descriptiva cuantitativa de lo cercana que está la curva ROC de la curva perfecta (área = 1,0).

35 La utilidad clínica del nuevo marcador CRABP-II se ha evaluado comparándola o combinándola con el marcador establecido CA 15-3 mediante el empleo de un análisis de curvas de rendimiento diagnóstico (ROC; Zweig, M. H. y Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). Este análisis se ha basado en cohortes de pacientes bien definidas formadas por 50 muestras cada una de pacientes con, respectivamente: carcinoma lobular o ductal invasivo en T1-3, N0, M0; con un tumor más avanzado, es decir, T4 o metástasis de extensión diversa (N+ o M+); carcinoma medular, papilar, mucinoso y tubular; carcinoma *in situ*; y controles sanos.

40 Al comparar el método diagnóstico basado en la medición exclusiva de CRABP-II con el basado en la medición exclusiva del marcador establecido CA 15-3, se ha descubierto que el primero presenta una exactitud diagnóstica (perfil sensibilidad/especificidad) por lo menos igual de buena que el segundo, como demuestra el área bajo la curva.

Se presentan los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias, tablas y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención cuyo auténtico ámbito de aplicación se expone en las reivindicaciones anexas.

65 Descripción de las figuras

Figura 1 La figura 1 muestra un ejemplo típico de un gel 2D cargado con una muestra de tumor (lado izquierdo) y un gel cargado con una muestra del control correspondiente (lado derecho). El círculo en la sección ampliada de estos

ES 2 285 469 T3

geles indica la posición de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II (CRABP-II). Al utilizar el mismo método no se ha detectado esta proteína en tejido sano.

5 Figura 2 La figura 2 muestra curvas ROC: Cáncer de mama frente a controles o frente a otros cánceres. El eje de abscisas indica el valor calculado restándole a 1 el valor de especificidad. El eje de ordenadas indica la sensibilidad. En ambos casos el valor de 1 corresponde al 100%. Los valores ROC determinados para CRABP-II, CEA y CA 15-3 son el 73%, 51% y 54%, respectivamente.

10 Figura 3 La figura 3 muestra curvas ROC: Cáncer de mama frente a controles o frente a otros cánceres, excluido el cáncer de ovario. El eje de abscisas indica el valor calculado restándole a 1 el valor de especificidad. El eje de ordenadas indica la sensibilidad. En ambos casos el valor de 1 corresponde al 100%. Los valores ROC determinados para CRABP-II, CEA y CA 15-3 son el 74%, 50% y 58%, respectivamente.

Abreviaciones

- 15 ABTS Sal diamónica del ácido 2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]
- BSA albúmina sérica bovina
- 20 cDNA DNA complementario
- CHAPS (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propanosulfonato)
- DMSO dimetilsulfóxido
- 25 DTT ditioneitol
- EDTA ácido etilendiamino tetraacético
- 30 ELISA ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida
- HRP peroxidasa de rábano picante
- IAA yodoacetamida
- 35 IgG inmunoglobulina G
- IEF isoelectroenfoque
- 40 IPG gradiente de pH inmovilizado
- LDS dodecil-sulfato de litio
- MALDI-TOF espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz acoplada a un
45 analizador de tiempo de vuelo
- MES mesitol, 2,4,6-trimetilfenil
- DO densidad óptica
- 50 PAGE electroforesis en gel de poliacrilamida
- PBS solución salina tamponada con fosfato
- 55 PI punto isoelectrónico
- RTS sistema de traducción rápida
- SDS dodecil-sulfato sódico
- 60 UICC Unión internacional contra el cáncer

65

ES 2 285 469 T3

Ejemplo 1

Identificación de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II (CRABP-II) como marcador potencial de cáncer de mama

Origen de los tejidos

Con la finalidad de identificar proteínas específicas del tumor como marcadores potenciales del cáncer de mama, se realiza el análisis de dos tipos diferentes de tejido empleando métodos propios de la proteómica.

En total se analizan muestras de tejido de 14 pacientes que padecen cáncer de mama. De cada paciente se toman muestras de dos tipos diferentes de tejido a partir de resecciones terapéuticas: tejido tumoral (tumor > 80%) (T) y tejido sano adyacente (N). El último tipo de tejido sirve como muestra control sana correspondiente. Los tejidos se congelan inmediatamente después de la resección y se conservan a -80°C hasta su procesamiento. El diagnóstico de los tumores se realiza según criterios histopatológicos.

Preparación de los tejidos

Se disponen 0,8-1,2 g de tejido congelado en un mortero y se congelan totalmente con nitrógeno líquido. El tejido se pulveriza en el mortero, se disuelve en un volumen multiplicado por 10 (p/v) de tampón de lisis (citrato sódico 40 mM, MgCl₂ 5 mM, Genapol X-080 1%, azida sódica 0,02% y Complete® sin EDTA [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, núm. de Cat. 1 873 580]) y seguidamente realizó un homogenado en un homogeneizador Wheaton® de vidrio (20 x pistón de ajuste holgado, 20 x pistón de ajuste casi total). Se someten 3 ml del homogenado a una centrifugación por densidad de sacarosa (10-60% sacarosa) durante 1 h a 4.500 x g. Después de este paso de centrifugación se obtienen tres fracciones. La fracción superior del gradiente contiene las proteínas solubles y se emplea para posteriores análisis.

Inmovilización del anticuerpo monoclonal frente a albúmina humana sobre sefarosa 4B activada con CNBr

Se rehidrata y se lava sefarosa 4B activada con CNBr liofilizada (Amersham Biosciences, 17-0430-01) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se disuelve anticuerpo monoclonal dirigido contra albúmina humana en NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, NaCl 0,5 M, 10 mg/ml. Se mezcla 1 ml de solución de anticuerpo con 1 ml de sefarosa 4B activada con CNBr rehidratada. El tiempo de reacción es de 1 h. El bloqueo de los grupos activos restantes y el lavado del gel se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Eliminación de la albúmina sérica

Se equilibran 7 ml de gel antialbúmina en tampón de lisis sin Genapol X-080. Se aplican 7 ml de la fracción superior de la centrifugación por densidad de sacarosa (véase el apartado anterior de preparación de tejidos) sobre la columna y se realiza el lavado con tampón de lisis sin Genapol X-080. El efluente combinado se utiliza para los experimentos de isoelectroenfoque.

Isoelectroenfoque (IEF) y SDS-PAGE

Para el IEF se mezclan 3 ml de la preparación de tejido del que se ha eliminado la albúmina sérica humana con 12 ml de tampón de muestra (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, tampón IPG 0,4% pH 4-7, DTT 0,5%) y se incuban durante 1 h. Las muestras se concentran en un dispositivo Amicon® Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y se determina la concentración de proteínas empleando el ensayo para proteínas Bio-Rad® (núm. de Cat. 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual del proveedor. A un volumen correspondiente a 1,5 mg de proteína se le añade tampón de muestra hasta un volumen final de 350 µl. Esta solución se usa para rehidratar tiras de IPG de pH 4-7 (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) durante la noche. Se realiza el IEF siguiendo el siguiente protocolo de gradiente: (1.) 1 minuto a 500 V; (2.) 2 h a 3500 V; (3.) 22 h a 3500 V constantes dando lugar a 82 kVh. Tras el IEF, se conservan las tiras a -80°C o bien se emplean directamente para SDS-PAGE.

Antes del procedimiento SDS-PAGE, las tiras se incuban en tampón de equilibrio (urea 6 M, Tris/HCl 50 mM, pH 8,8, glicerol al 30%, SDS al 2%), para la reducción en DTT (15 min, + 50 mg DTT/10 ml) y para la alquilación en IAA (15 min, + 235 mg de yodoacetamida/10 ml) is added. Las tiras se colocan sobre geles de poliacrilamida 12,5% y se someten a electroforesis a 1 W/gel y después durante 1 h a 17 W/gel. Seguidamente, se fijan los geles (metanol al 50%, acetato al 10%) y se tiñen durante la noche con el equipo de tinción Novex™ Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, núm. de Cat. LC6025, 45-7101).

Detección de CRABP-II como marcador potencial de cáncer de mama

Cada paciente es analizado por separado mediante análisis por imagen con el programa ProteomeWeaver® (Definiens AG, München, Alemania). Asimismo, todas las manchas del gel son cortadas por un robot que las recoge y se identifican las proteínas presentes en las manchas por espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex™ Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente se comparan 4 geles de la muestra de tumor con 4

geles de tejido adyacente cada uno y se analizan en busca de manchas destacadas que correspondan a proteínas expresadas de forma diferencial. Con este sistema se descubre que CRABP-II se expresa de forma específica, o bien sufre una sobreexpresión importante, en el tejido tumoral mientras que no se puede detectar en el tejido control sano. Por esta razón, junto con muchas otras proteínas, la CRABP-II cumple los requisitos para ser un marcador candidato de uso en el diagnóstico del cáncer de mama.

Ejemplo 2

Generación de anticuerpos frente a la proteína CRABP-II marcadora de cáncer de mama

Se genera un anticuerpo policlonal frente a la proteína CRABP-II marcadora de cáncer de mama para su posterior uso en la medición de los niveles séricos, plasmáticos o hemáticos de CRABP-II mediante ensayos de inmunodetección, p. ej. transferencias Western o ELISA.

Expresión y purificación de proteína recombinante

Con el propósito de generar anticuerpos frente a CRABP-II, se lleva a cabo la expresión recombinante de la proteína para la obtención de inmunógenos. La expresión se realiza aplicando una combinación del sistema de expresión RTS 100 y *E. coli*. En un primer paso se analiza la secuencia de DNA y, empleando el sistema "ProteoExpert RTS *E. coli* HY", se obtienen recomendaciones para una producción elevada de variantes mutacionales silentes de cDNA y de sus respectivas secuencias cebadoras para PCR. Se trata de un servicio comercial por internet (www.proteoexpert.com). Si se emplean los pares de cebadores recomendados, se debe utilizar el sistema "RTS 100 *E. coli* Linear Template Generation Set, His-tag" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, núm. de Cat. 3186237) para generar moldes lineales de PCR a partir del cDNA para la transcripción y la expresión *in vitro* de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína CRABP-II. Para la detección mediante transferencia Western y la posterior purificación, la proteína expresada contiene una cola de histidinas. Se debe identificar la variante que se exprese mejor. Todos los pasos desde la PCR hasta la expresión y la detección se realizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR respectivo, que contiene todas las regiones T7 reguladoras necesarias (promotor, sitio de unión a ribosomas y terminador T7), se clona en el vector pBAD TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, núm. de Cat. K 4300/01) según las instrucciones del fabricante. Para conseguir la expresión empleando las secuencias reguladoras T7, se transforma *E. coli* BL 21 (DE 3) (Studier, F.W., *et al.*, *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89) con el constructo y las bacterias transformadas se cultivan en un volumen de 1 l para la expresión proteica.

La purificación de la proteína de fusión His-CRABP-II se realiza según procedimientos estándar sobre una columna quelante de níquel. En resumen, se precipita por centrifugación 1 l de cultivo bacteriano que contiene el vector de expresión para la proteína de fusión His-CRABP-II. El pellet celular se resuspende en tampón de lisis que contiene fosfato, pH 8,0; cloruro de guanidinio 7 M; imidazol y tioglicerol; y seguidamente se homogeneiza en un Ultra-Turrax[®]. El material insoluble se precipita mediante centrifugación a alta velocidad y se aplica el sobrenadante a una columna cromatográfica quelante de níquel. La columna se lava con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis seguido de lavados con tampón que contiene fosfato, pH 8,0 y urea. Finalmente, se eluye el antígeno unido con un tampón de fosfato que contiene SDS bajo condiciones ácidas.

Asimismo, se expresa y purifica la proteína CRABP-II como se describe en Kleywegt, G.J. *et al.*, *Structure* 2 (1994) 1241-1258, en particular la página 1252 ("Protein preparation").

Síntesis peptídica

Los péptidos se sintetizan y se purifican según procedimientos químicos propios de la técnica actual.

El péptido CRABP-II que corresponde a las posiciones 85 a 96 del ID. de SEC. núm.: 1 contiene un residuo de cisteína. A partir de este punto también nos referiremos al péptido como CRABP-II (85-96) o péptido CRABP-II (85-96).

Al péptido CRABP-II que corresponde a las posiciones 106 a 120 del ID. de SEC. núm.: 1 se le añade un residuo de cisteína en su extremo carboxiterminal. A partir de este punto también nos referiremos a este péptido como CRABP-II (106-120 Cys) o péptido CRABP-II (106-120 Cys).

Síntesis de conjugados de péptido-hemocianina para la obtención de anticuerpos

La síntesis se lleva a cabo por procedimientos químicos heterobifuncionales (maleimida/SH).

El péptido CRABP-II (85-96) se acopla con hemocianina activada con 3-maleimido-hexanoil N-hidroxisuccinimida éster (MHS). El péptido CRABP-II (106-120 Cys) se acopla igualmente con hemocianina activada con 3-maleimido-hexanoil N-hidroxisuccinimida éster (MHS). La hemocianina se lleva a una concentración de 10 mg/ml en NaH₂PO₄/NaOH 100 mM, pH 7,2. Se añaden 100 µl de MHS (12,3 mg en DMSO) por cada ml de hemocianina y se incuban durante 1 h. La muestra se dializa durante toda la noche frente a NaH₂PO₄/NaOH 100 mM, pH 6,5 y se ajusta a 6 mg/ml con tampón de diálisis. Se disuelve el péptido CRABP-II (85-96) o el péptido CRABP-II (106-120 Cys) en DMSO (5 mg/ml para un péptido de 1.500 Da [Dalton]). Por cada ml de hemocianina activada con MHS (6

ES 2 285 469 T3

mg/ml) se añaden 20 μ l de EDTA 100 mM, pH 7,0 y 100 μ l del péptido CRABP-II (85-96) que contiene cisteína o del péptido CRABP-II (106-120 Cys). Transcurrida 1 h, se bloquean los grupos de maleimida restantes añadiendo 10 μ l de cisteína 0,5 M/HCl por cada ml de mezcla de reacción. Este preparado se emplea la inmunización sin purificación posterior.

5

Producción de anticuerpos monoclonales frente a CRABP-II

a) Inmunización de ratones

10 Inicialmente se inmunizan ratones A/J de 12 semanas por vía intraperitoneal con 100 μ g de CRABP-II o conjugado de péptido-hemocianina (véase el apartado anterior). Pasadas 6 semanas se realizan dos inmunizaciones intraperitoneales más con un intervalo de un mes. En este proceso a cada ratón se le administran 100 μ g de CRABP-II o de conjugado de péptido-hemocianina adsorbidos en hidróxido de aluminio y 10^9 bacterias *Bordetella pertussis*. Posteriormente, las dos últimas inmunizaciones se llevan a cabo por vía intravenosa el tercer y segundo día previos a la fusión, empleando 100 μ g de CRABP-II o de conjugado de péptido-hemocianina en tampón PBS en cada una.

15

b) Fusión y clonación

20

Se fusionan células esplénicas de los ratones inmunizados según el punto a) con células de mieloma de acuerdo con Galfre, G. y Milstein, C., *Methods in Enzymology* 73 (1981) 3-46. En este procedimiento se mezclan cerca de 1×10^8 células esplénicas del ratón inmunizado con 2×10^7 células de mieloma (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580) y se centrifugan (10 min a 300 x g y 4°C). A continuación se lavan las células una vez con medio RPMI 1640 sin suero fetal bovino (FCS) y se centrifugan de nuevo a 400 x g en un tubo cónico de 50 ml. Se deshecha el sobrenadante, el sedimento celular se desprende mediante golpecitos ligeros, se añade un 1 ml de PEG (peso molecular de 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcla mediante pipeteado. Transcurrido 1 min 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 lapso de tiempo de 4 a 5 min. Después se añaden 5 ml de RPMI 1640 con un 10% de FCS gota a gota durante cerca de 1 min, se mezcla a conciencia, se añade medio hasta alcanzar 50 ml (RPMI 1640 + 10% de FCS) y posteriormente se centrifuga durante 10 min a 400 x g y a 4°C. Las células sedimentadas se resuspenden en medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y se siembran en medio de selección con hipoxantina-azaserina (100 mmol/l de hipoxantina, 1 μ g/ml de azaserina en RPMI 1640 + 10% de FCS). Como factor de crecimiento se le añade al medio interleucina 6 a una concentración de 100 U/ml.

25

30

35 Pasados unos 10 días los cultivos primarios se analizan en busca del anticuerpo específico. Los cultivos primarios positivos para CRABP-II se clonan en placas de cultivo de 96 pocillos mediante citofluorometría. En este proceso también se le añade al medio como factor de crecimiento interleucina 6 a una concentración de 100 U/ml.

40

c) Aislamiento de inmunoglobulinas del sobrenadante de los cultivos celulares

Las células de hibridoma obtenidas se siembran a una densidad de 1×10^5 células por ml en medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y se dejan proliferar durante 7 días en un fermentador (Thermodux Co., Wertheim/Main, modelo MCS-104XL, núm. de pedido 144-050). De media se obtienen concentraciones de 100 μ g de anticuerpo monoclonal por ml en el sobrenadante del cultivo. La purificación de este anticuerpo del sobrenadante del cultivo se lleva a cabo por métodos convencionales en el estudio químico de las proteínas (p. ej. siguiendo a Bruck, C., *et al.*, *Methods in Enzymology* 121 (1986) 587-695).

45

Generación de anticuerpo policlonal

50

a) Inmunización

Para la inmunización se prepara una nueva emulsión de la solución proteica [100 μ g/ml de CRABP-II o conjugado de péptido-hemocianina que contiene el péptido CRABP-II (85-96) o el péptido CRABP-II (106-120 Cys)] con adyuvante de Freund en una proporción de 1:1. Para cada uno de los péptidos se inmuniza cada conejo con 1 ml de emulsión en los días 1, 7, 14, 30, 60 y 90. Se extrae sangre y el suero anti-CRABP-II se emplea en otros experimentos descritos en los ejemplos 3 y 4.

55

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

60

Se diluye un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes de tampón de acetato (60 mM, pH 4,0). El pH se ajusta a 4,5 con base Tris 2 M. Se añade ácido caprílico (25 μ l/ml de muestra diluida) gota a gota en agitación vigorosa. Transcurridos 30 min se centrifuga la muestra (13.000 x g, 30 min, 4°C), se deshecha el pellet y se recoge el sobrenadante. El pH del sobrenadante se ajusta a 7,5 al añadir base Tris 2 M y se realiza un filtrado (0,2 μ m).

65

ES 2 285 469 T3

Se realiza la precipitación de la inmunoglobulina del sobrenadante en agitación vigorosa con la adición gota a gota de una solución de sulfato de amonio 4 M hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogen por centrifugación (8.000 x g, 15 min, 4°C).

- 5 El sobrenadante se deshecha. El pellet se disuelve en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializa de forma exhaustiva. El líquido de diálisis se centrifuga (13.000 x g, 15 min, 4°C) y se filtra (0,2 μm).

Biotinación de IgG policlonal de conejo

- 10 La IgG policlonal de conejo se lleva a una concentración de 10 mg/ml en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. Se añaden 50 μl de biotina-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO) por cada ml de solución de IgG. Pasados 30 min a temperatura ambiente la muestra se somete a cromatografía en Superdex 200 ($\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). La fracciones que contienen IgG biotinada se recogen. Los anticuerpos monoclonales se biotinan de acuerdo con el mismo procedimiento.

15

Digoxigenación de IgG policlonal de conejo

- 20 La IgG policlonal de conejo se lleva a una concentración de 10 mg/ml en $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, NaCl 30 mM, pH 7,5. Se añaden 50 μl de digoxigenina-3-O-metilcarbonil-E-ácido aminocaproico-N-hidroxisuccinimida éster (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, núm. de Cat. 1 333 054)(3,8 mg/ml en DMSO). Pasados 30 min a temperatura ambiente la muestra se somete a cromatografía en Superdex 200 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). La fracciones que contienen IgG digoxigenada se recogen. Los anticuerpos monoclonales se marcan con digoxigenina de acuerdo con el mismo procedimiento.

- 25 Ejemplo 3

Transferencia Western para la detección de CRABP-II en muestras de suero y plasma humanos

- 30 SDS-PAGE y la transferencia Western se llevan a cabo con reactivos y equipo de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Se diluyen muestras de plasma humano a 1:20 en tampón de muestra reductor NuPAGE[®] LDS (Invitrogen) y se calienta durante 5 min a 95°C. Se corren alícuotas de 10 μl sobre geles NuPAGE[®] al 4-12% (Bis-Tris) en el sistema de tampón MES. La mezcla de proteínas separadas en el gel se transfiere a membranas de nitrocelulosa con el módulo de transferencia Invitrogen XCell II[™] Blot Module (Invitrogen) y el sistema tampón de transferencia NuPAGE[®]. Las membranas se lavan tres veces en PBS/0,05% Tween-20 y se bloquean con tampón SuperBlock Blocking (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE. UU.). El anticuerpo primario biotinado se diluye en tampón SuperBlock Blocking (0,01-0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y se incuba con la membrana durante 1 h. Las membranas se lavan tres veces en PBS/0,05% Tween-20. El anticuerpo primario biotinado unido de forma específica se marca con un conjugado estreptavidina-HRP (20 mU_{ABTS}/ml en tampón SuperBlock Blocking). Después de una hora de incubación, las membranas se lavan tres veces en PBS/0,05% Tween-20. El conjugado estreptavidina-HRP unido se detecta con un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Femto Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EE. UU.) y película autorradiográfica. El tiempo de exposición varía entre 10 min y toda la noche.

- 35 Ejemplo 4

- 45 *ELISA para la medición de CRABP-II en muestras de suero y plasma humanos*

Para la detección de CRABP-II en suero o plasma humanos se desarrolló un ELISA tipo sándwich empleando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas de estreptavidina.

- 50 Para la detección de CRABP-II en suero o plasma humanos se desarrolló un ELISA tipo sándwich empleando placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas de estreptavidina.

- 55 Se incubaron 20 μl de una muestra de suero o plasma humanas o de una dilución seriada de la proteína CRABP-II recombinante como antígeno estándar con 100 μl de anticuerpo policlonal anti-CRABP-II (85-96) biotinado (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y con anticuerpo monoclonal anti-CRABP-II digoxigenado (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA 1%, NaCl 0,9% y Tween-20 0,1%. Después de toda la noche de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con NaCl 0,9%, Tween-20 0,1%. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo se añadieron 100 μl de anticuerpo monoclonal antidigoxigenina conjugado con peroxidasa en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA 1%, NaCl 0,9% y Tween-20 0,1% y se incubaron durante 2 h. El exceso de conjugado se eliminó mediante tres lavados de las placas con NaCl 0,9% y Tween-20 0,1%. La cantidad de conjugado unido se detectó mediante la incubación con 100 μl de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania, núm. de Cat. 11685767) durante 30-60 min. El desarrollo del color se cuantificó a 405 nm con un lector de ELISA. La concentración de CRABP-II en una muestra de suero o plasma se calculó a partir de la curva estándar con una dilución seriada de CRABP-II recombinante.

65

Ejemplo 5

Evaluación, sensibilidad y especificidad del marcador; análisis ROC para evaluar la utilidad clínica en términos de exactitud diagnóstica

5

La exactitud se evalúa analizando muestras líquidas individuales obtenidas de cohortes de pacientes bien caracterizados. El colectivo control (véase la tabla 1) incluía 50 pacientes a los que se había sometido a una mamografía. Hubo 40 pacientes cuya mamografía salió negativa y no se detectaron síntomas de otras enfermedades mamarias. Se diagnosticaron 5 pacientes con mastitis (3 de 5 con una mamografía positiva) y 5 pacientes con microcalcificación (todos con mamografía positiva). La cohorte de muestra se resume en la tabla 1.

10

TABLA 1

15	Σ Pacientes sanos		50		
20		Controles sanos (mamografía negativa)	40		
25		Mastitis	5	Mamografía positiva	3
30		Microcalcificación	5	Mamografía positiva	5
35	Σ Cáncer de mama	Estadio	50		
40		UICC I	20		
45		UICC II	19		
		UICC III	10		
		UICC IV	1		
50	Otros tipos de cáncer		120		
55		Cáncer de colon	40		
60		Cáncer de pulmón	20		
	5	Cáncer de estómago	20		
65		Cáncer de ovario	20		
	0	Cáncer de próstata	20		

ES 2 285 469 T3

Se agruparon 50 pacientes de cáncer de mama entre los que había pacientes con carcinoma invasivo ductal o lobular en diferentes estadios. Debido al objetivo de diagnosticar el cáncer de mama en estadios iniciales, la proporción de individuos en estadios UICC I y UICC II fue del 78%. Para analizar la especificidad respecto a otros tumores sólidos también se midió un colectivo de muestras de diferentes tipos de cáncer: 40 de colon, 20 de pulmón, 20 de estómago, 20 de ovario y 20 de próstata. A partir del suero obtenido de cada uno de estos individuos se ha cuantificado los siguientes marcadores: CA 15-3 y CEA, medidos con ensayos comerciales (Roche Diagnostics, *CA 15-3-assay*: núm. de Cat. 0 304 5838 y *CEA-assay*: núm. de Cat. 1731629) para el analizador de inmunoensayos Elecsys® Systems; y CRABP-II, medida del modo antes descrito.

El valor de corte se define con respecto al percentil del 95% del grupo control, de modo que equivalga a una especificidad del 95%. Por lo tanto, en la presente serie de experimentos el valor de corte para CRABP-II se establece en 0,92 ng/ml.

Cabe destacar que los tres pacientes control positivos (de los que se había asumido que eran falsos positivos) de la medición de CRABP-II en el grupo de "Controles sanos" no presentan mastitis ni microcalcificaciones. Este tipo de pacientes normalmente dan lugar a una proporción elevada de resultados de mamografía positivos. No se encontró ninguna reacción positiva en los grupos de cáncer de pulmón, estómago o próstata. Solamente hubo tres resultados positivos en los pacientes con cáncer de colon. Esta observación es comparable a la del grupo de controles sanos. Las reacciones más positivas se observan en el grupo de cáncer de ovario, es decir, en 6 de 20.

Los datos que resumen la sensibilidad y la especificidad de CRABP-II comparada con los marcadores CEA y CA 15-3 se muestran en las tablas 2 y 3.

TABLA 2
Sensibilidad

Número de resultados positivos	CRABP-II	CA 15-3	CEA
UICC I	4/20	1/20	1/20
UICC II	5/19	4/19	4/19
UICC III	2/10	6/10	3/10
UICC IV	1/1	1/1	1/1
Total	12/50	12/50	9/50
Sensibilidad	24 %	24 %	18 %

ES 2 285 469 T3

TABLA 3

Especificidad

Valores dados en [%]	CRABP-II	CA 15-3	CEA
Controles	94	90	90
Otros tipos de cáncer:	96	90	61
Colon + pulmón + estómago			
Colon + pulmón + estómago + ovario	91	81	64
Colon + pulmón + estómago + ovario + próstata	93	79	68
Todos los controles	93	82	75

Se realizó el análisis ROC de acuerdo con Zweig, M. H. y Campbell, *supra*. Se encontró que el poder de discriminación para diferenciar los pacientes del grupo de cáncer de mama de los pacientes del grupo de "controles sanos" medido por el área bajo la curva era al menos igual de bueno para CRABP-II (64%) que para CA 15-3 (60%) y CEA (65%). Por otro lado, CRABP-II mostró una elevada especificidad para el cáncer de mama, ya que no hubo resultados positivos en ninguna de las muestras de cáncer de estómago, pulmón o próstata. En las muestras de cáncer de colon solamente 3 de 40 fueron positivas (comparable con el grupo de controles sanos) y en las de cáncer de ovario 6 de 20 muestras fueron positivas. Este hecho indica un mejor poder de discriminación de CRABP-II (73%) que de CA 15-3 (54%) y CEA (51%), cuando se compara el colectivo con cáncer de mama con la totalidad de controles, incluidos el resto de tumores sólidos.

TABLA 4

Valores ROC

Valores dados en [%]	CRABP-II	CA 15-3	CEA
Cáncer de mama/ controles	64	60	65
Cáncer de mama/ controles + otros tipos de cáncer	73	54	51

En resumen, CRABP-II es igual de sensible que CA 15-3 y al mismo tiempo muestra una especificidad más elevada en el grupo control aumentado, es decir, en el grupo control que incluye los otros tipos de cáncer. Asimismo, CRABP-II detecta más tumores en estadios iniciales. CRABP-II tiene una especificidad muy elevada para los tumores mamarios. No se han obtenido resultados positivos en muestras de suero procedentes de pacientes con cáncer de pulmón, estómago o próstata, y solamente se han obtenido reacciones positivas menores en muestras procedentes de pacientes con cáncer de colon. En las muestras de cáncer de ovario la especificidad es menor, pero sigue siendo mayor que la especificidad del marcador CA 15-3. Si se toman todas las muestras control incluyendo el resto de tumores sólidos, el poder de discriminación de CRABP-II (73%) es más elevado que el de CA 15-3 (54%) y CEA (51%). Los datos indican que CRABP-II también puede ser de gran ayuda en el diagnóstico del cáncer de mama o en el seguimiento de pacientes tras un tratamiento quirúrgico.

En algunas de las muestras de pacientes de CM tanto los niveles de CRABP-II como los de CA 15-3 son elevados. Además, en muestras individuales obtenidas de pacientes diferentes de cáncer de mama se encuentra que uno de CRABP-II o CA 15-3 es positivo. Este hecho implica una mayor sensibilidad si ambos marcadores se miden en la muestra de un paciente. En el caso de que una muestra de un paciente se clasifique como positiva cuando uno de los marcadores CRABP-II o CA 15-3 sea positivo, es posible conseguir una sensibilidad del 40%. Debido a la elevada especificidad de CRABP-II, la especificidad de esta combinación es comparable a la especificidad de CA 15-3 solo.

ES 2 285 469 T3

En consecuencia, la mayor sensibilidad de la combinación de los marcadores CRABP-II y CA 15-3 no repercute negativamente sobre la especificidad (del 75% para solamente CA 15-3 y del 78% para la combinación).

TABLA 5

Sensibilidad

Número de resultados positivos	CRABP-II o CA 15-3
UICC I	5/20
UICC II	7/20
UICC III	7/10
UICC IV	1/1
Total	20/50
Sensibilidad	40 %

TABLA 6

Especificidad

Valores dados en [%]	CRABP-II o CA 15-3
Controles	86
Otros tipos de cáncer:	86
Colon + pulmón + estómago	
Colon + pulmón + estómago + ovario	77
Colon + pulmón + estómago + ovario + próstata	76
Todos los controles	78

Lista de referencias

- Anders, V., et al., *Journal of Investigative Dermatology* 106 (1996) 1070-1074
- Bruck, C., et al., *Methods in Enzymology* 121 (1986) 587-596
- Budhu, A.S., Noy, N., *Molecular and Cellular Biology* 22 (2002) 2632-2641
- Carney, P.A., et al., *Ann. Intern. Med.* 138 (3) (2003) 168-175
- Chen, G., et al., *Molecular and Cellular Proteomics* 1.4 (2002) 304-313
- Bruck, C., Chen, G., et al., *Methods Enzymol.* 121 (1986) 587-695
- Diamandis et al., eds. (1996) *Immunoassay*, Academic Press, Boston

ES 2 285 469 T3

Duffy, M.J., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38 (2001) 225-262

Essermann, L., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 369-375

5 **Galfre, G. y Milstein, C.**, *Methods in Enzymology* 73 (1981) 3-46

Kleywegt, G.J. et al., *Structure* 2 (1994) 1241-1258

10 **Kuerer, H.M.**, *et al.*, *Cancer* 95 (2002) 2276-2282

National Cancer Institute, Cancer Facts, Fact Sheet 5.18 (1998) 1-5

Siegenthaler, G., *Biochemical Journal* 287 (1992) 383-389

15 **Singletary, S.E.**, *et al.*, *Journal of Clinical Oncology* 20 (2002) 3628-3636

Galfre, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.* 73 (1981) 3-46

20 **Untch, M.**, *et al.*, *J. Lab. Med.* 25 (9/10) (2001) 343-352

Studier, F.W., *et al.*, *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89

25 **Tijssen, P.**, *Practice and theory of enzyme immunoassays* 11 (1990) the whole book, especially pages 43-78; Elsevier, Amsterdam

UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), TNM Classification of Malignant Tumours, fifth edition, 1997

30 **Untch, M.**, *et al.*, *J. Lab. Med.* 25 (2001) 343-352

Vo, H.P., Crowe, D.L., *Anticancer Research* 18 (1998) 217-224

Wang, Y., *et al.*, *Laboratory Investigation* 78 (1998) 30 A

35 WHO, Screening for Breast Cancer, 10 de mayo de 2002

WO 00/60076

40 WO 02/101075

WO 02/23200

WO 02/59377

45 WO 02/77176

Wulfkuhle, J.D., *et al.*, *Cancer Research* 62 (2002) 6740-6749

50 **Zweig, M. H. y Campbell, G.**, *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico del cáncer de mama que comprende los siguientes pasos:

5 a) proporcionar una muestra líquida obtenida de un individuo,

b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específica a la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II bajo las condiciones adecuadas para que se forme un complejo entre dicho agente de unión y la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II y

10 c) correlacionar la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico del cáncer de mama.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** también por que dicha muestra es suero.

15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** además por que dicha muestra es plasma.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** además por que dicha muestra es sangre total.

20 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que se **caracteriza** también por que dicha muestra es secreción mamaria obtenida a través del pezón.

6. La utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II como marcador molecular en el diagnóstico del cáncer de mama a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

25 7. La utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II como marcador molecular en el diagnóstico precoz del cáncer de mama a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

8. La utilización de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el diagnóstico precoz se hace a partir de muestras de pacientes de CM en estadio T_{is}-3; N0; M0.

9. La utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II como marcador molecular de cáncer de mama en combinación con uno o varios marcadores moleculares de cáncer de mama para el diagnóstico del cáncer de mama a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

35 10. La utilización de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el otro marcador molecular es CA 15-3.

ES 2 285 469 T3

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> Utilización de la proteína celular transportadora de ácido retinoico de tipo II como marcador del cáncer de mama

<130> 21781 WO

<150> EP 03012942.3 <151> 06-06-2003

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Pro Asn Phe Ser Gly Asn Trp Lys Ile Ile Arg Ser Glu Asn Phe Glu
1 5 10 15

Glu Leu Leu Lys Val Leu Gly Val Asn Val Met Leu Arg Lys Ile Ala
20 25 30

Val Ala Ala Ala Ser Lys Pro Ala Val Glu Ile Lys Gln Glu Gly Asp
35 40 45

Thr Phe Tyr Ile Lys Thr Ser Thr Thr Val Arg Thr Thr Glu Ile Asn
50 55 60

Phe Lys Val Gly Glu Glu Phe Glu Glu Gln Thr Val Asp Gly Arg Pro
65 70 75 80

Cys Lys Ser Leu Val Lys Trp Glu Ser Glu Asn Lys Met Val Cys Glu
85 90 95

Gln Lys Leu Leu Lys Gly Glu Gly Pro Lys Thr Ser Trp Thr Arg Glu
100 105 110

Leu Thr Asn Asp Gly Glu Leu Ile Leu Thr Met Thr Ala Asp Asp Val
115 120 125

Val Cys Thr Arg Val Tyr Val Arg Glu
130 135