



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 361 725**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05778104 .9**  
96 Fecha de presentación : **19.08.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1917530**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.05.2008**

54 Título: **Uso de un fragmento de endoplasmina y derivados del mismo como biomarcador para adenoma y/o carcinoma colorrectal; método de detección y sistema de ensayo.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.06.2011**

73 Titular/es: **Indivumed GmbH**  
**Orchideenstieg 14**  
**22297 Hamburg, DE**

72 Inventor/es: **Juhl, Hartmut;**  
**David, Kerstin y**  
**Fentz, Anne-Kristin**

74 Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 361 725 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Uso de un fragmento de endoplasmina y derivados del mismo como biomarcador para adenoma y/o carcinoma colorrectal; método de detección y sistema de ensayo.

La presente invención se refiere al campo de la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

5 El carcinoma colorrectal es el tercer carcinoma diagnosticado con más frecuencia (9,4%) en todo el mundo. En 2003, se diagnosticaron casi 945.000 nuevos casos de carcinoma colorrectal en todo el mundo y aproximadamente 492.000 personas murieron de esta enfermedad. La incidencia del carcinoma colorrectal está aumentando, mientras que la tasa de mortalidad del carcinoma colorrectal está disminuyendo. La incidencia del carcinoma colorrectal aumenta con la edad, comenzando a aproximadamente los 40 años de edad, y es mayor para hombres que para mujeres (40,6 para hombres frente a 30,6 para mujeres, por 100.000 por año) (World cancer report, 2003, Ed. BW. Stewart and P. Kleihues. IARC Press, Lyon).

En la mayoría de los pacientes, el desarrollo del carcinoma colorrectal sigue una progresión de múltiples etapas desde adenoma premaligno a tumores invasivos que son propensos a la metástasis.

15 Hasta el momento, solamente desagradables ensayos de cribado colorrectal, tales como colonoscopia, han demostrado conseguir la detección de carcinoma colorrectal en fase temprana y sus precursores. Sin embargo, se han observado grandes tasas de falsos negativos para lesiones neoplásicas planas y lesiones polipoides menores de 10 mm de diámetro (Kudo S. (1997) Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am. 7: 87-98). Por lo tanto, sería deseable tener un sistema de ensayo que permita la detección temprana de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal, así como la discriminación específica entre diferentes fases tumorales. Esto también permitiría una adaptación específica de la terapia.

20 Los ensayos de cribado conocidos actualmente basados en la detección de un marcador tumoral en muestras de sangre carecen de la sensibilidad y la especificidad necesarias. Por ejemplo, los niveles de CEA (antígeno carcinoembrionario) en muestras de sangre se han usado para detectar carcinoma de colon. Sin embargo, los niveles de CEA no son específicamente elevados en carcinoma de colon y han demostrado ser elevados también en pacientes con otras enfermedades malignas (por ejemplo, cánceres de estómago, páncreas, mama y pulmón) y con diversas afecciones no malignas (por ejemplo, enfermedad hepática alcohólica, enfermedad intestinal inflamatoria, fuerte consumo de cigarrillos, bronquitis crónica y pancreatitis). (Posner MR, Mayer RJ: The use of serologic tumor markers in gastro intestinal malignancies. Hematol Oncol Clin North Am 8: 533, 1994). Además, los niveles de CEA no son elevados en adenomas de colon. Además, los niveles de CEA no son adecuados para distinguir adenoma colorrectal de carcinoma colorrectal o diferentes fases tumorales.

El documento Wang Xiao-Ping et al., World J. Gastroenterol. 2005; 11(7): 1056-1059 se refiere a la correlación entre la patología clínica y la expresión de la proteína de choque térmico 70 y la proteína regulada por glucosa 94 en adenocarcinoma de colon humano.

35 La página Web <http://www.ihop-net.org/UniPub/iHOP/mgi/92825.html> describe que endoplasmina es un sinónimo de proteína regulada por glucosa de 94 kDa.

El documento DE 100 19 967 A1 describe anticuerpos contra gp96 nativa.

El documento Schreiter K. et al., Gut 2005; 54: 935-943 se refiere a la expresión de glucoproteína (gp) 96 inducida durante la diferenciación de macrófagos intestinales, pero alterada en la enfermedad de Crohn.

40 Un objeto de la invención es proporcionar medios que permitan una detección temprana de adenoma de colon y/o carcinoma de colon.

Es un objeto adicional proporcionar un biomarcador que pueda usarse en la detección de adenoma y/o carcinoma colorrectal.

45 Los objetos esenciales de la presente invención se resuelven mediante el uso de un fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10-14 kDa como biomarcador para la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal en un individuo. La detección se realiza in vitro.

Los objetos se resuelven además mediante un método para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal que comprende las etapas:

- a) proporcionar un material de muestra aislado que se ha extraído de un individuo,
- b) determinar el nivel de un fragmento de endoplasmina en dicho material de muestra aislado,
- c) comparar el nivel determinado de un fragmento de endoplasmina con uno o más valores de referencia,

en el que el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa.

5 Los objetos se resuelven además mediante un método para discriminar adenoma colorrectal y carcinoma colorrectal, que comprende las etapas:

- a) proporcionar un material de muestra aislado que se ha extraído de un individuo,
- b) determinar el nivel de un fragmento de endoplasmina en dicho material de muestra aislado,
- c) comparar el nivel determinado de un fragmento de endoplasmina con uno o más valores de referencia.

10 en el que el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa.

Los objetos también se resuelven mediante un método para monitorizar el desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal, que comprende las etapas:

- a) proporcionar un material de muestra aislado que se ha extraído de un individuo,
- b) determinar el nivel de un fragmento de endoplasmina en dicho material de muestra aislado,
- c) comparar el nivel determinado de un fragmento de endoplasmina con uno o más valores de referencia,

15 en el que el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa.

En una realización preferida, la eficacia de un procedimiento quirúrgico o terapéutico está controlada para decidir si el adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal está completamente extirpado. En otra realización, la terapia de un paciente con adenoma colorrectal y/o cáncer colorrectal tratando al paciente con una o más sustancias químicas, anticuerpos, proteínas, péptidos, fármaco de molécula pequeña, ARN antisentido, radiación, por ejemplo rayos X, o combinaciones de los mismos está controlada para controlar la eficacia del tratamiento.

20 Los métodos de la invención pueden usarse con un método de ensayo para detectar adenoma colorrectal y/o cáncer colorrectal en una muestra de un individuo, que comprende:

Los métodos de la invención pueden usarse con un método de ensayo para detectar adenoma colorrectal y/o cáncer colorrectal en una muestra de un individuo, que comprende:

- a) un anticuerpo o un receptor que se une a un epítipo de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo,
- b) un soporte sólido que soporta a dicho anticuerpo o receptor,
- c) un reactivo para detectar la unión de dicho epítipo de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo a dicho anticuerpo o receptor.

25

Los métodos de la invención pueden usarse con una matriz (*array*) que comprende moléculas de detección para la detección de adenoma colorrectal y/o cáncer por carcinoma colorrectal y/o en un individuo, que comprende como molécula de detección:

- a) una sonda de ácido nucleico inmovilizada en un soporte sólido para unirse a y detectar ARNm que codifica un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo, o
- b) un anticuerpo inmovilizado en un soporte sólido para la unión a y la detección de un epítipo de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo, o
- c) un receptor inmovilizado en un soporte sólido para la unión a y la detección de un epítipo de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo,

35

en la que preferentemente diferentes cantidades de moléculas de detección están inmovilizadas en el soporte sólido para aumentar la precisión de la cuantificación.

5 La sonda de ácido nucleico se selecciona, por ejemplo, entre el grupo constituido por ADN o ARN de cadena sencilla o de cadena doble, aptámeros y combinaciones de los mismos. Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla que asumen una forma dependiente de la secuencia, específica y se unen a proteínas objetivo con alta especificidad y afinidad. Los aptámeros se identifican usando el proceso SELEX (Tuerk C. y Gold L. (1990) Science 249: 505-510; Ellington AD. y Szostak JW (1990) Nature 346, 818-822).

En las reivindicaciones dependientes se especifican realizaciones preferidas.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "material de muestra" también se designa como "muestra".

10 De acuerdo con la presente invención, el término "biomarcador" pretende designar una proteína o fragmento de proteína o un ácido nucleico que es indicativo de la incidencia de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. Esto significa que el "biomarcador" se usa como un medio para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

El término "individuo" o "individuos" pretende designar un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un ser humano, tal como un paciente.

15 La expresión "individuo sano" o "individuos sanos" pretende designar un individuo o individuos no enfermos de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. Es decir, la expresión "individuo o individuos sanos" se usa solamente respecto al estado patológico de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal y no excluye al individuo de padecer enfermedades diferentes de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

20 La expresión "discriminación de diferentes fases tumorales" de acuerdo con la presente invención significa la discriminación de adenoma colorrectal frente a carcinoma colorrectal y/o la discriminación de diferentes fases tumorales, por ejemplo TNM I, II, III y IV.

25 La expresión "derivado del mismo" pretende describir cualquier modificación a nivel de ADN, ARNm o proteínas que comprende por ejemplo el gen truncado, fragmentos de dicho gen, un gen mutado, o gen modificado o los productos génicos respectivos del mismo. La expresión "derivados del mismo" incluye secuencias de ácido nucleico, tales como ADN, ARN, ARNm o secuencias proteicas o secuencias peptídicas. El derivado puede ser una modificación que es un resultado de una delección, sustitución o inserción en el gen. La modificación génica puede ser un resultado de la variabilidad génica de origen natural. La expresión "variabilidad génica de origen natural" significa modificaciones que no son el resultado de manipulación genética. El derivado puede ser un resultado del procesamiento del gen o del producto génico dentro del cuerpo y/o un producto de degradación. La modificación a nivel proteico puede deberse a una modificación enzimática o química dentro del cuerpo. Por ejemplo, la modificación puede ser una glucosilación o fosforilación o farnesilación.

30 La expresión "fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo" como se usa en la presente descripción también comprende fragmentos de endoplasmina mutados o fragmentos de endoplasmina modificados o fragmentos de endoplasmina modificada. La modificación del "fragmento de endoplasmina" puede deberse a modificación enzimática o química.

35 Los términos "tumor" y "cáncer" se usan de forma intercambiable y tienen el mismo significado.

40 En una realización, el fragmento de endoplasmina o derivado del mismo es una proteína que comprende un fragmento N-terminal o un fragmento C-terminal de endoplasmina. La expresión fragmento N-terminal o fragmento C-terminal no debe entenderse como que esta secuencia comprende el extremo N o el extremo C completo de endoplasmina, respectivamente, sino que el fragmento se genera a partir de la región N-terminal o C-terminal de endoplasmina.

El fragmento también puede generarse a partir de una parte media de la secuencia proteica de endoplasmina.

45 La longitud de la secuencia del fragmento de endoplasmina (SEC ID N° 1) debe ser lo suficientemente larga para ser específica para endoplasmina. Se ha demostrado que los fragmentos de endoplasmina que comprenden al menos 7 aminoácidos contiguos, preferentemente al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia de endoplasmina (SEC ID N° 1) son altamente específicos para endoplasmina. De acuerdo con una realización preferida de la invención, el fragmento comprende al menos 9 aminoácidos contiguos de endoplasmina (SEC ID N° 1).

Una escisión específica de la endoplasmina de longitud completa (SEC ID N° 1), que también se designa como grp94, conduce a dos fragmentos de aproximadamente 10-14 kDa y 80 kDa. Se supone que la escisión de endoplasmina es inducida por Calpaína (figura 4).

5 En una realización de la invención, el fragmento de endoplasmina en el fragmento N-terminal que tiene un peso molecular de aproximadamente 10 a 14 kDa. De acuerdo con otra realización de la invención, los fragmentos que tienen un peso molecular de aproximadamente 10 a 14 kDa o aproximadamente 80 kDa son inducidos mediante escisión por Calpaína. Además, se describen fragmentos de aproximadamente 80 kDa.

10 En una realización de la invención, el fragmento de endoplasmina comprende una parte de la secuencia SEC ID N° 1. En una realización preferida de la invención, el fragmento de endoplasmina comprende un fragmento N-terminal. Preferentemente el fragmento comprende la secuencia peptídica SEC ID N° 2 y/o la secuencia peptídica SEC ID N° 3. De acuerdo con otra realización de la invención, el fragmento comprende la secuencia peptídica SEC ID N° 4.

De acuerdo con la invención, el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa, más preferentemente de 10,3 kDa.

15 El fragmento de endoplasmina puede ser un péptido o proteína que es o que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2, la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 4 (figura 1) y que es capaz de detectar de forma específica adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

20 El fragmento de endoplasmina puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 80%, preferentemente al menos el 90%, más preferentemente al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEC ID N° 1, en base a la secuencia del fragmento.

25 Las proteínas relacionadas con glucosa (grp) son un grupo de proteínas altamente conservadas sintetizadas después de la inducción de estrés. Las grp actúan como acompañantes moleculares que ayudan a transportar, plegar y procesar sus proteínas objetivo respectivas. La tinción inmunohistoquímica detecta grp94 principalmente en el citoplasma. La grp94 también se denomina endoplasmina. La grp94 (endoplasmina) muestra las propiedades dobles de una proteína luminal y una proteína integral, sugiriendo que existe en dos formas diferentes dentro del retículo endoplasmático.

El término "epítipo" pretende designar cualquier elemento estructural de una proteína o péptido o cualquier estructura proteínica que permita la unión específica de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una estructura proteica o peptídica o un receptor.

30 Los métodos de la presente invención se realizan con materiales de muestra tales como fluidos corporales o muestras de tejido que ya se han aislado del cuerpo humano. Preferentemente, El material de muestra es una muestra de tejido. Posteriormente, el material de muestra puede fraccionarse y/o purificarse. Es posible, por ejemplo, almacenar el material de muestra a ensayar en un congelador y realizar los métodos de la presente invención en un momento apropiado después de descongelar el material de muestra respectivo.

35 Los inventores de la presente invención han descubierto, sorprendentemente, que un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo puede usarse como biomarcador, preferentemente como biomarcador temprano, para la detección de adenoma y/o carcinoma colorrectal.

40 Los inventores han descubierto ahora sorprendentemente que los niveles de proteína de fragmentos de endoplasmina o derivados de los mismos en un material de muestra tal como una muestra de tejido o un fluido corporal son elevados en individuos que tienen adenoma y/o carcinoma colorrectal. Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que el nivel de proteínas del fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo en una muestra de tejido o un fluido corporal puede usarse para distinguir personas sanas de personas con adenoma y/o carcinoma colorrectal, así como adenoma colorrectal de carcinoma colorrectal. Además, el nivel del fragmento de endoplasmina puede usarse para discriminar entre diferentes fases tumorales, por ejemplo TNM I, II, III y/o IV. El fragmento de endoplasmina es un biomarcador específico que puede usarse para discriminar adenoma colorrectal y carcinoma colorrectal y/o diferentes fases tumorales. Las diferentes fases tumorales pueden ser, por ejemplo, TNM I, II, III y/o IV. El fragmento de endoplasmina es un marcador selectivo y específico que puede usarse para confirmar el diagnóstico obtenido mediante histopatología.

50 Los inventores han descubierto también, sin embargo, que un nivel elevado de endoplasmina completa en el material de muestra tal como tejido o fluidos biológicos, por ejemplo suero o plasma, es específico de adenoma colorrectal. Por lo tanto, un nivel elevado de la endoplasmina completa también es indicativo de adenoma

colorrectal. En vista de esto, todas las explicaciones dadas anteriormente o a continuación se aplican para endoplasmina completa, respectivamente.

5 Sin embargo, los inventores también han descubierto sorprendentemente que un nivel elevado de fragmentos de endoplasmina en un material de muestra tal como tejido o un fluido corporal es un biomarcador mucho más específico y sensible para adenoma y/o carcinoma colorrectal.

10 De acuerdo con la presente invención, el material de muestra puede ser tejido, células o un fluido corporal. El material de muestra puede ser un fluido corporal tal como sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, médula ósea, heces, líquido sinovial, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, esputo, orina, leche materna, esperma, exudados y mezclas de los mismos. En una realización de la invención los fluidos corporales se fraccionan mediante cromatografía.

Preferentemente, el fluido corporal se ha aislado antes de realizar los métodos de la presente invención. Los métodos de la invención son realizados in vitro por un técnico en un laboratorio.

15 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el nivel de fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa se mide en plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. El suero sanguíneo puede obtenerse fácilmente extrayendo sangre de un individuo que se examinará médicamente y separando el sobrenadante de la sangre coagulada.

20 El nivel del fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo es mayor con formación progresiva de adenoma colorrectal. El adenoma colorrectal es una neoplasia benigna que puede volverse maligna. Cuando se desarrolla cáncer colorrectal a partir de adenoma colorrectal benigno, el nivel del fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo en fluidos corporales, preferentemente suero sanguíneo, aumenta adicionalmente.

Después de la transformación de adenoma colorrectal en cáncer colorrectal, el estado patológico del individuo afectado puede exacerbarse adicionalmente mediante la formación de metástasis. Los niveles más elevados del fragmento de endoplasmina están correlacionados con la incidencia de adenoma y/o carcinoma colorrectal y/o metástasis.

25 La presente invención proporciona un biomarcador de fase temprana que permite detectar la enfermedad neoplásica en una fase temprana y/o aún benigna y/o una fase tumoral temprana. La detección temprana permite al médico extirpar a tiempo el adenoma colorrectal y aumenta de forma dramática las posibilidades de supervivencia del individuo.

30 Además, la presente invención permite monitorizar el nivel de un fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa en un fluido corporal tal como suero sanguíneo durante un periodo de tiempo prolongado, tal como años.

35 La monitorización a largo plazo permite diferenciar entre adenoma colorrectal y carcinoma colorrectal. El nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo puede comprobarse de forma rutinaria en fluido corporal, por ejemplo, una o dos veces al año. Si se detecta un aumento del nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo, éste puede ser indicativo de adenoma colorrectal. Un aumento adicional del nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo puede ser indicativo, entonces, de la transformación en carcinoma colorrectal maligno.

40 Además, la evolución de la enfermedad y/o el tratamiento pueden monitorizarse. Si el nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo aumenta adicionalmente, por ejemplo después de la extirpación del adenoma colorrectal, esto puede ser indicativo de la exacerbación del estado patológico.

45 Eso significa que el nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo es un valioso parámetro clínico para la detección y/o monitorización de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. El nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo en fluidos corporales aumenta después de la incidencia de adenoma colorrectal. Por lo tanto, el nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo es un importante parámetro clínico para permitir un diagnóstico temprano y, por consiguiente, un tratamiento temprano de la enfermedad. Además, el nivel de un fragmento de endoplasmina puede usarse para comprobar la eficacia de la cirugía y/o de otra terapia.

50 El método de la invención para la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal comprende la etapa de proporcionar un material de muestra aislado que se ha extraído de un individuo, a continuación determinar el nivel de un fragmento de endoplasmina en el material de muestra aislado, y finalmente comparar el nivel

determinado de un fragmento de endoplasmina con uno o más valores de referencia, en el que el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa. En una realización, uno o más biomarcadores adicionales se detectan adicionalmente en un material de muestra aislado que se ha extraído de un individuo, se determina el nivel del o de los biomarcadores y se compara con uno o más valores de referencia.

- 5 El valor de referencia puede calcularse como el nivel promedio de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo determinado en una pluralidad de muestras aisladas de individuos sanos o individuos que padecen adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. Este valor de referencia puede establecerse a partir de personas sanas que abarcan un intervalo que se considerará normal, o un intervalo que se considera que es elevado de pacientes que padecen adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. Habitualmente, los valores de referencia se dan como un intervalo de valores de referencia. Por lo tanto, se define que las expresiones valor de referencia e intervalo de valores de referencia como se usan en la presente invención, tienen el mismo significado.

- 10 Un valor específico dentro de un intervalo de valor de referencia puede ser entonces indicativo del estado sano o el estado patológico de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal. Este intervalo de valores de referencia puede establecerse tomando un número estadísticamente relevante de muestras de tejido o muestras de fluido corporal, tales como muestras de suero, de individuos sanos y de individuos que padecen adenoma de colon y/o carcinoma de colon como ya se ha hecho para cualquier otro intervalo de parámetro médico tal como, por ejemplo, azúcar en sangre. El valor de referencia para un estado sano también puede obtenerse de tejido sano de un paciente con adenoma colorrectal y/o tumor colorrectal.

- 15 Preferentemente, se calculan dos valores de referencia que se designan como control negativo y control positivo 1. El valor de referencia del control negativo se calcula a partir de individuos sanos o tejido sano de pacientes de adenoma colorrectal y/o tumor colorrectal y el control positivo se calcula a partir de individuos que padecen adenoma colorrectal o carcinoma colorrectal. Más preferentemente, se calculan tres valores de referencia que se designan como control negativo y control positivo 1 y control positivo 2. El control positivo 1 puede calcularse a partir de individuos que padecen carcinoma colorrectal y el control positivo 2 puede calcularse a partir de adenoma colorrectal.

- 20 En otra realización preferida de la presente invención, los valores de referencia pueden ser valores de referencia individuales calculados como el nivel promedio de un fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa, determinado en una pluralidad de muestras aisladas tomadas del individuo durante un periodo de tiempo.

- 25 Cuando se monitoriza el nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo durante un periodo de tiempo prolongado, tal como meses o años, es posible establecer un nivel promedio individual. El nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo puede medirse, por ejemplo, a partir de la misma muestra de suero sanguíneo cuando se mide el azúcar en sangre y puede usarse para establecer una curva de calibración individual que permite detectar específicamente cualquier aumento individual del nivel de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo.

- 30 El valor de referencia para biomarcadores adicionales también puede calcularse de la misma manera que se ha descrito para endoplasmina. Los niveles promedio del fragmento de endoplasmina o biomarcadores adicionales pueden ser el nivel medio o mediano.

- 35 El método de la presente invención puede usarse con un sistema de ensayo para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal en un material de muestra aislado de un individuo. El sistema de ensayo se basa en la especificidad de un anticuerpo o un receptor para unirse específicamente a un epítipo o un elemento estructural adecuado de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo. Un receptor puede ser cualquier estructura capaz de unirse específicamente a un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo. El receptor puede ser, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab o  $F(ab)_2$  o cualquier otra estructura proteica o peptídica que sea capaz de unirse específicamente a un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo. El receptor también puede ser un aptámero que se una específicamente a un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo.

- 40 El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o receptor está unido a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una superficie o perlas de plástico para permitir la unión y la detección de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo. Por ejemplo, puede usarse una placa de microvaloración convencional como superficie plástica. La detección de la unión de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo puede realizarse, por ejemplo, usando un anticuerpo secundario marcado con un grupo detectable. El grupo detectable puede ser, por ejemplo, un isótopo radiactivo o una enzima como peroxidasa de rábano rústico o fosfatasa alcalina detectable añadiendo un sustrato adecuado para producir, por ejemplo, un color o una señal de fluorescencia.

El sistema de ensayo puede ser un inmunoensayo tal como un ensayo inmunoadsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA) o inmunoensayo por luminiscencia (LIA). Sin embargo, puede usarse cualquier otro sistema de ensayo inmunológico que use la especificidad de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, tal como transferencia de Western o inmuno-precipitación.

5 El método de la invención puede usarse con una matriz que comprende moléculas de detección para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal en un individuo, en el que la molécula de detección puede ser una sonda de ácido nucleico inmovilizada sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de ARNm que codifica fragmentos de endoplasmina, mutaciones, variantes o derivados de los mismos, o un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido para la unión a y la detección de un epítipo de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo. Preferentemente, la matriz comprende moléculas de detección adicionales para biomarcadores, para detectar adenoma colorrectal y carcinoma colorrectal. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico comprende secuencias de ácido nucleico seleccionadas entre el grupo constituido por las secuencias de ácido nucleico correspondientes a la SEC ID N° 2 y/o la SEC ID N° 3 o la SEC ID N° 4. Como alternativa, el método de la presente invención también puede usarse con una matriz inversa que comprende muestras de un paciente inmovilizadas sobre un soporte sólido que pueden ser detectadas por las moléculas de detección definidas anteriormente.

Preferentemente, la matriz comprende moléculas de detección que están inmovilizadas en una superficie sólida en posiciones identificables.

20 El término "matriz", como se usa en la presente descripción, se refiere a un agrupamiento o una disposición, sin que sea necesariamente una disposición regular. Una matriz comprende preferentemente al menos 2, más preferentemente 5, de la forma más preferente 10 conjuntos diferentes de moléculas de detección. Preferentemente, la matriz de la presente invención comprende al menos 50 conjuntos de moléculas de detección, se prefieren además al menos 100 conjuntos de moléculas de detección. La matriz puede comprender al menos 500 conjuntos de moléculas de detección. La molécula de detección puede ser, por ejemplo, una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo o un receptor, como ya se ha descrito anteriormente.

La sonda de ácido nucleico puede ser cualquier oligonucleótido de origen natural o sintético, aptámeros así como ADNc, ARNc y similares.

30 La matriz descrita puede usarse en un sistema de ensayo. El término "matriz", como se usa en la presente descripción, se refiere tanto a macromatrices como a micromatrices.

De acuerdo con otra realización de la invención, el nivel de un fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa se determina mediante espectrometría de masas.

35 La espectrometría de masas permite detectar específicamente un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo mediante su peso molecular y cuantificar la cantidad de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo muy fácilmente.

40 Cualquier método de ionización adecuado en el campo de espectrometría de masas conocido en la técnica puede emplearse para ionizar el fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo, molécula, fragmentos, mutaciones, variantes o derivados del mismo. Los métodos de ionización comprenden impacto de electrones (EI), ionización química (CI), ionización por campo (FDI), ionización por electropulverización (ESI), ionización por desorción láser (LDI), ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) y ionización por desorción láser potenciada por superficie (SELDI).

45 Cualquier método de detección adecuado en el campo de la espectrometría de masas conocido en la técnica puede emplearse para determinar la masa molecular de un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo. Los métodos de detección comprenden espectrometría de masas cuadrupolar (QMS), espectrometría de masas de transformación de Fourier (FT-MS) y espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS).

50 Preferentemente, la espectrometría de masas es una espectrometría de masas por desorción láser potenciada por superficie - tiempo de vuelo (SELDI-TOF-MS). Antes de realizar una SELDI-TOF-MS, el fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo en la muestra aislada se inmoviliza preferentemente sobre un chip o soporte sólido con una superficie activada. La superficie activada comprende preferentemente anticuerpos inmovilizados contra un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales de conejo. Después de la unión del fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo a los anticuerpos, se realiza un



análisis de tiempo de vuelo en un espectrómetro de masas SELDI-TOF, que suministra señales de intensidad para la determinación del nivel del fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo.

Además, la espectrometría de masas permite detectar simultáneamente otras proteínas que pueden tener una relevancia con respecto a la detección de adenoma colorrectal y/o cáncer colorrectal.

- 5 En una realización de la presente invención, la sensibilidad y/o la especificidad de la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal se potencia mediante la detección adicional de uno o más biomarcadores adicionales.

10 Preferentemente, la sensibilidad y especificidad de los métodos y usos de acuerdo con la presente invención aumentan mediante la combinación de detección de un fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10-14 kDa así como alfa-defensina 1, 2 ó 3.

15 La expresión "alfa-defensina 1, 2, 3 o un derivado de la misma" como se usa en la presente descripción también comprende alfa-defensina 1, 2 ó 3 truncada, fragmentos de alfa-defensina 1, 2 ó 3, alfa-defensina 1, 2 ó 3 mutada, o alfa-defensina 1, 2 ó 3 modificada. La modificación de "alfa-defensina 1, 2 ó 3" puede deberse a modificación química o enzimática, las alfa-defensinas 1, 2 y 3 también se designan como péptidos de neutrófilos humanos (HNP) 1, 2 y 3, respectivamente. Los tres péptidos tienen proporciones de masa/carga (m/z) de  $3445 \pm 10$ ,  $3374 \pm 10$  y  $3489 \pm 10$ .

Los péptidos HNP 1-3 forman parte de la familia de péptidos de la defensina que son componentes fundamentales del sistema inmunitario y tienen la capacidad de destruir/inactivar una amplia gama de patógenos. También se sabe que las defensinas funcionan como reguladores del sistema inmunitario tanto innato como adaptivo.

- 20 Estudios previos indican que la expresión de HNP 1-3 en tumores se origina principalmente de eosinófilos y neutrófilos que invaden el tumor. Sin embargo, también puede ser producida por células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de vejiga).

*(Albrethsen J, Bogebo R, Gammeltoft S, Olsen J, Winther B, Raskov H. Upregulated expression of human neutrophil peptides 1, 2 and 3 (HNP 1-3) in colon cancer serum and tumours: a biomarker study. BMC Cancer. 2005, 5: 8.)*

- 25 En una realización adicional de la presente invención, la sensibilidad y/o especificidad de la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal puede potenciarse mediante la detección de un fragmento de endoplasmina que tiene un peso molecular de 10-14 kDa en combinación con uno o más biomarcadores adicionales seleccionados entre el grupo constituido por alfa-defensina 1, 2 ó 3, transtirretina, p53, C3a, CEA (antígeno carcinoembrionario), CA 19-9, CA 15-3, CA-125, Kras,  $\beta$ -Catenina, Her-2/neu, proteína C-reactiva, inestabilidad de microsatélite de MHL1 o MSH2 y combinaciones de los mismos.

Otro biomarcador para adenoma y/o carcinoma colorrectal puede comprender una proteína o un polipéptido que tiene un peso molecular de  $4.838 \pm 25$  Da, preferentemente  $4.838 \pm 10$  Da. El fragmento de endoplasmina y la proteína o polipéptido que tiene un peso molecular de  $4.838 \pm 25$  Da, preferentemente  $4.838 \pm 10$  Da, puede usarse para detectar adenoma y/o carcinoma colorrectal.

- 35 Un fragmento de endoplasmina o un derivado del mismo en combinación con C3a o un derivado y/o transtirretina o un derivado de la misma pueden usarse como biomarcadores para detectar adenoma y/o carcinoma colorrectal y/o para discriminar diferentes fases tumorales.

40 La expresión "transtirretina o un derivado de la misma" como se usa en la presente descripción también comprende transtirretina truncada, fragmentos de transtirretina, transtirretina mutada, o transtirretina modificada. La modificación de "transtirretina" puede deberse a una modificación enzimática o química. Además, el término "transtirretina" también se usa para designar formas monoméricas o multiméricas de transtirretina. Por ejemplo, el término "transtirretina" abarca específicamente la cadena proteica monomérica que habitualmente forma parte de la proteína homotetramérica transtirretina.

- 45 La transtirretina también se designa como prealbúmina. La transtirretina es una proteína tetramérica que tiene un peso molecular de aproximadamente 54.000 Da que se sintetiza principalmente en el hígado. La transtirretina normalmente es un homotetrámero que comprende cuatro cadenas proteicas que tienen, cada una, un peso molecular de aproximadamente 14.000 Da. Usando espectrometría de masas, los inventores han detectado varias variantes de las cadenas proteicas de transtirretina que tienen un peso molecular de, entre otros, 13.776 Da, 13.884 Da o 14.103 Da. Los inventores han descubierto que, especialmente, el nivel de variantes moleculares de

transtirretina que tienen un peso molecular de 13.776 Da y 13.884 Da disminuye en un fluido corporal tal como suero en caso de incidencia de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

5 La expresión "C3a o un derivado de la misma" como se usa en la presente descripción también comprende C3a truncada, fragmentos de C3a, C3a mutada, C3a modificada o la precursora C3 (figura 2, SEC ID N° 5) o fragmentos de C3. El derivado puede tener o comprender una secuencia proteica que tiene una identidad de al menos el 80%, preferentemente de al menos el 90%, más preferentemente de al menos el 98% con la secuencia SEC ID N° 6 (figura 3A, SEC ID N° 6).

10 La modificación de "C3a" puede deberse a modificación enzimática o química. En particular, el término C3a o un derivado de la misma comprende especialmente una proteína C3a truncada que tiene preferentemente un peso molecular en el intervalo de 8.950 ± 25 Da; más preferentemente en el intervalo de 8.950 ± 20 Da. La proteína C3a truncada tiene preferentemente un peso molecular de 8.939 Da. Preferentemente, la proteína C3a no tiene arginina C-terminal y tiene opcionalmente un peso molecular en el intervalo de 8.950 ± 20 Da. El derivado de C3a puede ser C3a-desArg (figura 3B, SEC ID N° 7). El derivado de C3a puede obtenerse mediante escisión de C3a mediante quimasa de mastocitos. La C3a puede obtenerse mediante escisión de C3 mediante C3-convertasa. La presente descripción también incluye combinación de las realizaciones mencionadas anteriormente.

20 C3a pertenece al grupo de las anafilatoxinas. C3a, C4a y C5a son productos proteolíticos de serina proteasas del sistema del complemento. C3a (SEC ID N° 6) se obtiene del tercer componente (C3) (SEC ID N° 5) del sistema del complemento sanguíneo durante la activación del complemento. C3a es una hormona con eficacia local. Aproximadamente el 40% de los restos de aminoácidos en C3a están implicados en una conformación helicoidal. Las anafilatoxinas del suero están implicadas en diversas respuestas inmunitarias celulares, así como siendo potentes agentes proinflamatorios. C3a produce potentes efectos sobre las paredes de los vasos sanguíneos, contracción del músculo liso y un aumento de la permeabilidad vascular. La arginina C-terminal en C3a tiene una importancia fundamental para su actividad biológica. Las anafilatoxinas están reguladas por carboxipeptidasa N (inactivador de anafilatoxina), que retira en segundos la arginina carboxiterminal. Este mecanismo convierte la anafilatoxina intacta en una forma C3a-desArg menos activa (SEC ID N° 7).

25 Esto permite la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal con una mayor sensibilidad y/o especificidad y/o la discriminación de diferentes fases tumorales. Además, los métodos de la presente invención serán bien aceptados por los pacientes, dado que estos métodos no son tan desagradables como una colonoscopia. De acuerdo con la presente invención, el material de muestra aislado del individuo, que puede ser una muestra de tejido o un fluido biológico, por ejemplo plasma o suero, se criba con los métodos de la invención. El material de muestra puede obtenerse, por ejemplo, extrayendo sangre o mediante una biopsia.

La sensibilidad y especificidad se definen de la siguiente manera:

35 La sensibilidad es el número de pacientes auténticos positivos detectados (%) con respecto al número de todos los pacientes (100%). Los pacientes pueden ser individuos que tienen adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

La especificidad es el número de individuos negativos detectados (%) con respecto al número de todos los individuos sanos (100%).

La sensibilidad y la especificidad pueden definirse, como alternativa, mediante las siguientes fórmulas:

		diagnóstico	
		+	-
ensayo	+	<b>TP</b>	<b>FP</b>
	-	<b>FN</b>	<b>TN</b>

TP: Auténtico positivo (ensayo positivo, diagnóstico correcto);

40 FP: Falso positivo (ensayo positivo, diagnóstico incorrecto);

TN: Auténtico negativo (ensayo negativo, diagnóstico correcto);

FN: Falso negativo (ensayo negativo, diagnóstico incorrecto);

La sensibilidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{TP}{(TP + FN)}$$

y la especificidad se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$5 \quad \frac{TN}{(TN + FP)}$$

El resultado de cada grupo de análisis, que se selecciona entre TP, FP, TN, FN, se calcula para una pluralidad de muestras aisladas seleccionadas entre el grupo constituido por individuos sanos, pacientes con adenoma colorrectal y/o pacientes con carcinoma colorrectal. TP, FP, TN, FN se refiere al número de individuos que están correlacionados con el estatus auténtico positivo, falso positivo, auténtico negativo, falso negativo, respectivamente.

10 Los métodos de la presente invención pueden realizarse en combinación con otros métodos de diagnóstico para la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal para aumentar la sensibilidad y/o la especificidad global. La detección de un fragmento de endoplasmina permite una detección muy temprana de adenoma colorrectal y puede usarse, por lo tanto, como un biomarcador muy temprano. Además, la detección de un fragmento de endoplasmina permite la discriminación de diferentes fases tumorales.

15 Preferentemente, los métodos de la presente invención se realizan como un método de detección y/o monitorización tempranas. Si los resultados de los métodos de la presente invención indicaran la incidencia de adenoma colorrectal y/o adenoma colorrectal en muestras de fluido corporal, podrían realizarse exámenes adicionales tales como colonoscopia. Si los resultados obtenidos mediante histoquímica con muestras de tejido indican la incidencia de adenoma colorrectal y/o adenoma colorrectal, debe analizarse el nivel de un fragmento de endoplasmina  
20 opcionalmente en combinación con un biomarcador adicional, para discriminar las diferentes fases tumorales.

Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos. No debe interpretarse que la invención está limitada a los siguientes ejemplos.

### Figuras

25 La figura 1 muestra la secuencia proteica de endoplasmina (SEC ID N° 1) en la figura 1A, y tres secuencias peptídicas que forman parte, cada una, del fragmento de endoplasmina N-terminal (SEC ID N° 2, 3 y 4) en la figura 1B.

La figura 2 muestra la secuencia proteica de C3 (SEC ID N° 5).

La figura 3 muestra la secuencia proteica de C3a (SEC ID N° 6) en la figura 3A y la secuencia proteica de C3a-desArg (SEC ID N° 7) en la figura 3B.

30 La figura 4 muestra el supuesto sitio de escisión de endoplasmina por calpaína para generar un fragmento de aproximadamente 80 kDa y uno de aproximadamente 14 kDa.

La figura 5 muestra perfiles proteicos de SELDI-TOF-MS de lisados de tejido de colon normal, con adenoma y tumoral. La intensidad de p10.3 (parte N-terminal de endoplasmina, 10.300 Da) aumenta significativamente en el tejido de pacientes sanos a pacientes con adenoma a pacientes con cáncer.

35 La figura 6 muestra el análisis del fragmento de endoplasmina p10.3 mediante SELDI-TOF-MS. Se analizaron 30 muestras de cáncer de colon y 29 muestras de tejido con adenoma, así como de tejido de colon sano normal correspondiente. Las concentraciones medias del fragmento de endoplasmina p10.3 son significativamente más altas en el grupo de adenoma (A) y/o el grupo de carcinoma (T) en comparación con el grupo sano (N).

40 La figura 7 muestra la detección de p10.3 en diferentes tipos de cáncer mediante SELDI TOF MS. El nivel de expresión de p10.3 era significativamente menor en muestras analizadas de cáncer de estómago, esófago, pulmón, próstata y mama en comparación con diferentes fases de carcinoma de colon. Los lisados se analizaron en una matriz SAX Protein Chip®. Las diferencias en los niveles de expresión de

p10.3 entre tejidos normal y tumoral son estadísticamente significativas. N = tejido normal, T = tejido canceroso.

5 La figura 8 muestra perfiles proteicos de SELDI-TOF-MS de lisados de tejido de colon normal, con adenoma y canceroso. Las intensidades máximas de p3489 (un miembro de la familia de alfa-defensina, p3.4) aumentan significativamente en el tejido, de pacientes con adenoma colorrectal a pacientes con cáncer. N = tejido normal, A = tejido de adenoma, T = tejido canceroso.

10 La figura 9 muestra perfiles proteicos de SELDI TOF MS de lisados de tejido de colon normal, con adenoma y canceroso. La intensidad máxima de p4838 (p4.8) es significativamente elevada en tejidos de pacientes con adenoma colorrectal en comparación con tejidos sanos de control y con cáncer colorrectal. N = tejido normal, A = tejido con adenoma, T = tejido canceroso.

15 La figura 10 muestra que la combinación de dos marcadores (p10.3 y p4.8 o p10.3 y p3.4) mejoraba en una población de pacientes heterogénea tanto la sensibilidad como la especificidad de tejidos de adenoma y cancerosos. A) Se alcanzaron una sensibilidad del 90% por tejido canceroso (79% por adenoma) y una especificidad del 90%, si la detección se basaba en combinación de p10.3 y p4.8. B) Usando la combinación de p10.3 y el miembro de la familia de alfa defensina p3.4 los números correspondientes fueron del 70% para muestras de cáncer (82% para adenoma) con una especificidad del 90%. N = mucosa de colon normal, T = tejido con carcinoma, A = tejido con adenoma. Los números delante de la letra designan el número de individuos diferentes. Los otros números se refieren a los valores límite.

### Ejemplos

20 A no ser que se indique otra cosa, todos los métodos se realizaron siguiendo el protocolo del fabricante de los sistemas analíticos.

#### Ejemplo 1:

##### Preparación de la muestra

25 Muestras de tejido Se analizaron tejido tumoral de pacientes con adenoma y cáncer colorrectal (TNM fase III) así como tejido de colon normal correspondiente de cada paciente. *Pacientes:* las directrices éticas y la confidencialidad del paciente se han asegurado estrictamente y todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito para participar en este estudio. Todos los pacientes tenían preparaciones preoperatorias comparables, tales como tiempo de ayuno y medicación en el momento de la cirugía.

30 Preparación de extractos de tejido Secciones de criostato (5 µm) de tumor recién congelado y tejidos normales se tiñeron con hematoxilina/eosina para controlar la histopatología y la cantidad de tumor/estroma. Los bloques de tejido con un contenido de tumor o contenido de adenoma por encima del 50% así como tejidos normales se cortaron en secciones (8 x 20 µm) y se transfirieron inmediatamente a 500 µl de tampón de solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 12H<sub>2</sub>O 6,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4). Las secciones se centrifugaron a 13.200 rpm durante 10 minutos a 4°C. Los sedimentos se extrajeron mediante 35 150 µl de tampón de lisis (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, Tween al 0,5% pH 7,2, complete<sup>®</sup> al 0,1% (Roche, Mannheim, Alemania) durante 10 minutos en hielo. Después de una exhaustiva agitación en vórtice, los lisados se centrifugaron durante 10 minutos a 13.200 rpm. Las concentraciones de proteína de los sobrenadantes se midieron mediante ensayo BCA (BCA Assay, Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) y se ajustaron para cada muestra a una concentración de 5 µg/50 µl con tampón de lisis.

#### 40 Ejemplo 2

Preparación de la matriz Ciphergen ProteinChip<sup>®</sup>. Los lisados de proteínas se analizaron en una matriz intercambiadora aniónica fuerte (SAX; Ciphergen Biosystems, Femont, CA, Estados Unidos). Matrices de proteínas SAX (intercambiadora aniónica fuerte) se procesaron en un bioprocesador (Ciphergen Biosystems, Inc). Los chips se 45 equilibraron con tampón de unión (Tris/HCl 0,1 M, pH 7,5) durante 2 x 5 minutos y posteriormente se incubaron con 50 µl de lisado de proteína en cada punto. Después de 45 minutos, el material no unido se retiró y los chips se lavaron 3 veces con tampón y 2 veces con agua. Después del secado, se añadieron 2 aplicaciones de ácido sinapínico (1,0 µl) y los chips se analizaron con el lector *Ciphergen Protein ChipReader* (modelo PBSII). Para minimizar la variabilidad de los datos, la medición se realizó en dos días usando muestras de todos los grupos de 50 pacientes distribuidos aleatoriamente en los chips. Como control convencional para la normalización, se usó un extracto de tejido de un paciente con cáncer en paralelo para todas las mediciones.

5 Análisis SELDI-TOF-MS. Los espectros de masas de las proteínas se generaron usando un promedio de 195 disparos láser a una intensidad del láser de 180. El detector se puso en marcha a una sensibilidad de 6. Para la adquisición de datos, el intervalo de tamaño de detección estaba entre 2.000 y 40.000 Da. El láser se enfocó a 10.000 Da. Los datos se analizaron con el programa *ProteinChip Data Analysis* (versión 3.1, Ciphergen Biosystems) y con el programa *Biomarker Wizard* (versión 3.1, Ciphergen Biosystems). Las intensidades máximas se normalizaron respecto a la corriente iónica total.

### **Ejemplo 3**

#### Evaluación estadística de los datos

10 Para los tres grupos de pacientes, se calculan valores límite mediante el algoritmo C&RT(CART) en base a análisis por árbol de decisión (Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., & Stone, C. J. (1984). *Classification and regression trees*. Monterey, CA: Wadsworth & Brooks/Cole Advanced Books & Software). Los valores límite se han calculado para seleccionar y especificar los valores limitantes entre los diferentes grupos de análisis. La evaluación se ha realizado con el Software STATISTICA Versión 7.1 de STATSOFT INC, el análisis por árbol de decisión se realiza con Árboles de Decisión Estándar del subprograma Data-Miner Modul (CAndRT) (StatSoft, Inc. (2005). STATISTICA (sistema de software de análisis de datos), versión 7.1. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).)

15 Los datos estadísticos se evalúan en base al valor medio y la desviación típica. Además, las figuras 6, 8 y 9 muestran un intervalo de confianza de la media  $\pm 0,95$ , que indica que los valores medios de los posibles grupos de pacientes se encuentran con un 95% de probabilidades dentro de este intervalo. La evaluación estadística se realiza mediante el test T (Tabla 1). Los test se consideraron significativos con niveles de  $p < 0,05$ . Las patillas del diagrama de caja muestran la desviación típica.

### **Ejemplo 4**

25 Muestras de proteínas de tejido tumoral de un paciente con adenoma y uno con cáncer colorrectal (TNM fase II) así como tejido de colon normal se prepararon y analizaron de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2. La figura 5 muestra perfiles proteicos de SELDI-TOF de lisados de tejido de colon normal, de adenoma y tumoral. La intensidad de p10.3 aumenta significativamente en el tejido, de pacientes sanos a pacientes con cáncer.

30 La figura 6 muestra las intensidades medias de p10.3 (fragmento de endoplasmina) en tejido normal, con adenoma y con cáncer de colon. Se analizaron 30 muestras de tejido de cáncer de colon y 29 de adenoma así como tejido de colon normal correspondiente de acuerdo con los ejemplos 1 a 3. Las diferencias en las intensidades medias de p10.3 en tejido normal y tumoral de colon así como en tejido normal y de adenoma eran estadísticamente significativas. Para la discriminación de muestras tumorales se consiguió una especificidad del 97% y una sensibilidad del 93%. La especificidad por muestras de adenoma era del 90% con una sensibilidad del 86%.

35 La figura 8 muestra las intensidades medias de uno de los miembros de la familia de alfa-defensina identificados (pico 3.489) en la misma población de pacientes. Las intensidades medias en los grupos de adenoma y cáncer de colon eran significativamente elevadas en comparación con los niveles en tejido de colon normal. Una discriminación de muestras de adenoma se consiguió con una sensibilidad del 52% y una especificidad del 90%. Los valores respectivos para la discriminación de muestras tumorales eran del 90% y el 89,6%.

40 La figura 9 muestra el nivel específicamente elevado del pico 4838 en las muestras del grupo de adenoma. Las muestras de adenoma podrían discriminarse de las muestras de pacientes con tumores y normales con una sensibilidad del 76% y una especificidad del 100%. La Tabla 1 resume las intensidades máximas detectadas en los grupos de pacientes para los picos 10.324, 4.838 y los picos para el miembro de la familia de defensina 3.375, 3.445 y 3.489.

Tabla 1:

Variable (m/z)	N válido	n válido de N A T	n válido	n válido de A+T	Media Desv. Típ. N	Media Desv. Típ. A	Media Desv. Típ. T	Media Desv. Típ. A+T	Valor p N frente a A	Valor p N frente a T	Valor p N frente a A+T	Valor p A frente a T
3375	29	29	30	59	3,155 3,476	6,54 4,73	20,98 12,89	13,88 ±12,4	0,0029	0,0000001	0,000011	0,0000001
3445	29	29	30	59	2,66 3,28	5,86 ± 5,1	19,79 13,26	12,85 12,3	0,01	0,0000001	0,000034	0,000002
3489	29	29	30	59	1,14 1,06	2,39 2,32	14,96 13,39	8,78 11,5	0,01	0,000001	0,00061	0,000006
4838	29	29	30	59	0,619 0,166	1,68 1,026	0,58 0,21	1,12 0,91	0,000001	0,49	0,0040	0,0000001
10324	29	29	30	59	0,95 0,38	2,37 1,24	3,44 1,57	2,91 ± 1,5	0,0000001	0,0000001	0,0000001	0,00531

n: número de pacientes  
 N: tejido normal  
 A: tejido con adenoma  
 T: tejido canceroso

Todos los datos de la Tabla 1 se obtuvieron mediante SELDI-TOF-MS

**Ejemplo 5****Expresión de p10.3 en diferentes tejidos**

5 Para identificar p10.3 como biomarcador específico del colon, se prepararon y se analizaron extractos celulares mediante espectrometría de masas de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2 para diferentes tejidos tumorales, concretamente de mama, estómago, esófago, pulmón y próstata. Como se muestra en la figura 7 y en la Tabla 2, la mayor intensidad de p10.3 puede encontrarse en carcinoma colorrectal, (estadio I y III). Sin embargo, el fragmento de endoplasmina se expresa a un nivel inferior en tejido de cáncer de esófago, pulmón y próstata y normal.

**Tabla 2: Intensidades de p10.3 en diferentes tipos de cáncer.** Los lisados se analizaron en una matriz SAX Protein Chip®.

Tipo de tejido		Intensidad de p10.3
<b>Mama</b>	normal	1,002
	tumor	0,672
<b>Pulmón</b>	normal	1,431
	tumor	1,907
<b>Estómago</b>	normal	1,849
	tumor	1,629
<b>Esófago</b>	normal	0,506
	tumor	0,944
<b>Próstata</b>	normal	0,933
	tumor	0,852
<b>Colon (estadio I)</b>	normal	0,948
	tumor	2,830
<b>Colon (estadio III)</b>	normal	1,035
	tumor	3,283

10 Puede observarse, a partir de la figura 7, que los fragmentos de endoplasmina, especialmente el fragmento de proteína que tiene un peso molecular aparente de 10.300 Da (p10.3), son altamente específicos para el carcinoma de colon. En contraste con tumores de mama, pulmón, estómago, esófago o próstata, existe una diferencia significativa del nivel de p10.3 entre pacientes sanos y enfermos. Además, el nivel de p10.3 aumenta con la fase del cáncer (estadio I frente a estadio III).

**Ejemplo 6**

30 muestras de tejido de cáncer de colon y 29 de adenoma, así como tejido de colon normal correspondiente, se aislaron y se analizaron como se ha descrito en los Ejemplos 1 a 3, excepto que se usó un segundo marcador, una proteína que tenía un peso molecular de 4.838 Da (p4.8) o un peso molecular de 3.489 Da (p3.4), en combinación con el pico del fragmento de endoplasmina. En combinación con una segunda proteína marcadora, por ejemplo 4.838 Da (p4.8) o 3.489 Da (p3.4), se consiguió la separación simultánea de tejido normal de tejidos de adenoma y/o cancerosos. Usando p10.3 como primer y p4.8 como segundo marcador, 26 de 29 (especificidad 90%) muestras de tejido normal, 23 de 29 muestras de adenoma (sensibilidad 79%) así como 27 de 30 muestras de cáncer (sensibilidad 90%) se separaron correctamente (Figura 10A). La combinación con el pico de 3489 conseguía una especificidad del 90% y una sensibilidad del 82% para muestras de adenoma y el 70% para muestras tumorales (Figura 10B).

20

25

**Resultados**

Como se muestra en la figura 6, la cantidad del fragmento de endoplasmina difiere significativamente entre los tres grupos (N = normal, A = adenoma, T = cáncer). El nivel de fragmento de endoplasmina aumenta de individuos sanos pasando por pacientes con adenoma colorrectal a pacientes con carcinoma colorrectal.

5 Estos datos muestran que un fragmento de endoplasmina, opcionalmente en combinación con otros biomarcadores tales como una proteína que tiene un peso molecular de 4.838 Da (p4.8) o de 3.489 Da (p3.4), es (son) un excelente biomarcador o biomarcadores para la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal.

10 En contraste con biomarcadores ya conocidos, CEA y CA 19-9, es posible discriminar entre individuos sanos y pacientes con adenoma. Además, es posible discriminar pacientes con adenoma y pacientes con carcinoma colorrectal. La sensibilidad y la especificidad del ensayo del fragmento de endoplasmina son altas y permiten una detección específica temprana de adenomas así como la discriminación entre diferentes fases tumorales.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> indivumed GmbH

15 <120> USO DE UN FRAGMENTO DE ENDOPLASMINA Y DERIVADOS DEL MISMO COMO BIOMARCADOR PARA ADENOMA Y/O CARCINOMA COLORRECTAL; MÉTODO DE DETECCIÓN Y SISTEMA DE ENSAYO

<130> 47399WO

<140> PCT/EP 2005/009005

<141> 19-08-2005

<160> 7

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 803

<212> PRT

<213> humana

25 <400> 1



ES 2 361 725 T3

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

Lys Met Thr Glu Ala Gln Glu Asp Gly Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile  
 180 185 190  
 Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Phe Leu Val Ala Asp Lys  
 195 200 205  
 Val Ile Val Thr Ser Lys His Asn Asn Asp Thr Gln His Ile Trp Glu  
 210 215 220  
 Ser Asp Ser Asn Glu Phe Ser Val Ile Ala Asp Pro Arg Gly Asn Thr  
 225 230 235 240  
 Leu Gly Arg Gly Thr Thr Ile Thr Leu Val Leu Lys Glu Glu Ala Ser  
 245 250 255  
 Asp Tyr Leu Glu Leu Asp Thr Ile Lys Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser  
 260 265 270  
 Gln Phe Ile Asn Phe Pro Ile Tyr Val Trp Ser Ser Lys Thr Glu Thr  
 275 280 285  
 Val Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Glu Lys Glu  
 290 295 300  
 Glu Ser Asp Asp Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys  
 305 310 315 320  
 Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met  
 325 330 335  
 Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu  
 340 345 350  
 Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp  
 355 360 365  
 Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys  
 370 375 380  
 Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu  
 385 390 395 400  
 Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val  
 405 410 415  
 Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe  
 420 425 430  
 Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg  
 435 440 445

Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu  
 450 455 460  
 Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr  
 465 470 475 480  
 Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val  
 485 490 495  
 Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe  
 500 505 510  
 Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val  
 515 520 525  
 Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser  
 530 535 540  
 Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys  
 545 550 555 560  
 Lys Gly Tyr Glu Val Ile Tyr Leu Thr Glu Pro Val Asp Glu Tyr Cys  
 565 570 575  
 Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala  
 580 585 590  
 Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg  
 595 600 605  
 Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp  
 610 615 620  
 Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu  
 625 630 635 640  
 Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly  
 645 650 655  
 Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp  
 660 665 670  
 Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn  
 675 680 685  
 Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp  
 690 695 700  
 Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr  
 705 710 715 720

Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly  
 725 730 735

Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp  
 740 745 750

Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu  
 755 760 765

Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val  
 770 775 780

Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu Lys  
 785 790 795 800

Asp Glu Leu

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

5 <213> humana

<400> 2

Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala ser Gln Ile Arg  
 1 5 10 15

<210> 3

<211> 9

10 <212> PRT

<213> humana

<400> 3

Phe Ala Phe Gln Ala Glu Val Asn Arg  
 1 5

<210> 4

15 <211> 33

<212> PRT

<213> humana

<400> 4

Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala Ser Gln Ile Arg  
1 5 10 15

Glu Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Phe Ala Phe Gln Ala Glu Val Asn  
20 25 30

Arg

<210> 5

<211> 1641

<212> PRT

5 <213> humana

<400> 5

Ser Pro Met Tyr Ser Ile Ile Thr Pro Asn Ile Leu Arg Leu Glu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp Ala Gln Gly Asp Val Pro  
 20 25 30  
 Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly Lys Lys Leu Val Leu Ser  
 35 40 45  
 Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr Asn His Met Gly Asn Val  
 50 55 60  
 Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe Lys Ser Glu Lys Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe Gly Thr Gln Val Val Glu  
 85 90 95  
 Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly Tyr Leu Phe Ile Gln Thr  
 100 105 110  
 Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr Val Leu Tyr Arg Ile Phe  
 115 120 125  
 Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly Arg Thr Val Met Val Asn  
 130 135 140  
 Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys Gln Asp Ser Leu Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser Trp Asp Ile Pro Glu Leu  
 165 170 175  
 Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro  
 180 185 190  
 Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val Lys Glu Tyr Val Leu Pro  
 195 200 205  
 Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr  
 210 215 220  
 Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr Ala Arg Phe Leu Tyr Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile Phe Gly Ile Gln Asp Gly  
 245 250 255

Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu Lys Arg Ile Pro Ile Glu  
 260 265 270  
 Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg Lys Val Leu Leu Asp Gly  
 275 280 285  
 Val Gln Asn Leu Arg Ala Glu Asp Leu Val Gly Lys Ser Leu Tyr Val  
 290 295 300  
 Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser Asp Met Val Gln Ala Glu  
 305 310 315 320  
 Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro Tyr Gln Ile His Phe Thr  
 325 330 335  
 Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met Pro Phe Asp Leu Met Val  
 340 345 350  
 Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala Tyr Arg Val Pro Val Ala  
 355 360 365  
 Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu Thr Gln Gly Asp Gly Val  
 370 375 380  
 Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser Gln Lys Pro Leu Ser Ile  
 385 390 395 400  
 Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser Glu Ala Glu Gln Ala Thr  
 405 410 415  
 Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr Val Gly Asn Ser Asn Asn  
 420 425 430  
 Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu Leu Arg Pro Gly Glu Thr  
 435 440 445  
 Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp Arg Ala His Glu Ala Lys  
 450 455 460  
 Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn Lys Gly Arg Leu Leu Lys  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln Asp Leu Val Val Leu Pro  
 485 490 495  
 Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser Phe Arg Leu Val Ala Tyr  
 500 505 510  
 Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg Glu Val Val Ala Asp Ser  
 515 520 525

Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val Gly Ser Leu Val Val Lys  
 530 535 540

Ser Gly Gln Ser Glu Asp Arg Gln Pro Val Pro Gly Gln Gln Met Thr  
 545 550 555 560

Leu Lys Ile Glu Gly Asp His Gly Ala Arg Val Val Leu Val Ala Val  
 565 570 575

Asp Lys Gly Val Phe Val Leu Asn Lys Lys Asn Lys Leu Thr Gln Ser  
 580 585 590

Lys Ile Trp Asp Val Val Glu Lys Ala Asp Ile Gly Cys Thr Pro Gly  
 595 600 605

Ser Gly Lys Asp Tyr Ala Gly Val Phe Ser Asp Ala Gly Leu Thr Phe  
 610 615 620

Thr Ser Ser Ser Gly Gln Gln Thr Ala Gln Arg Ala Glu Leu Gln Cys  
 625 630 635 640

Pro Gln Pro Ala Ala Arg Arg Arg Arg Ser Val Gln Leu Thr Glu Lys  
 645 650 655

Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro Lys Glu Leu Arg Lys Cys Cys  
 660 665 670

Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met Arg Phe Ser Cys Gln Arg Arg  
 675 680 685

Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala Cys Lys Lys Val Phe Leu Asp  
 690 695 700

Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg Arg Gln His Ala Arg Ala Ser  
 705 710 715 720

His Leu Gly Leu Ala Arg Ser Asn Leu Asp Glu Asp Ile Ile Ala Glu  
 725 730 735

Glu Asn Ile Val Ser Arg Ser Glu Phe Pro Glu Ser Trp Leu Trp Asn  
 740 745 750

Val Glu Asp Leu Lys Glu Pro Pro Lys Asn Gly Ile Ser Thr Lys Leu  
 755 760 765

Met Asn Ile Phe Leu Lys Asp Ser Ile Thr Thr Trp Glu Ile Leu Ala  
 770 775 780

Val Ser Met Ser Asp Lys Lys Gly Ile Cys Val Ala Asp Pro Phe Glu  
 785 790 795 800



Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp Leu Arg Leu Pro Tyr Ser  
 805 810 815

Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg Ala Val Leu Tyr Asn Tyr  
 820 825 830

Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val Glu Leu Leu His Asn Pro  
 835 840 845

Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg Arg His Gln Gln Thr Val  
 850 855 860

Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val Pro Tyr Val Ile Val Pro  
 865 870 875 880

Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val Lys Ala Ala Val Tyr His  
 885 890 895

His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser Leu Lys Val Val Pro Glu  
 900 905 910

Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val Arg Thr Leu Asp Pro Glu  
 915 920 925

Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu Asp Ile Pro Pro Ala Asp  
 930 935 940

Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser Glu Thr Arg Ile Leu Leu  
 945 950 955 960

Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu Asp Ala Val Asp Ala Glu  
 965 970 975

Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser Gly Cys Gly Glu Gln Asn  
 980 985 990

Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile Ala Val His Tyr Leu Asp Glu  
 995 1000 1005

Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala  
 1010 1015 1020

Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg  
 1025 1030 1035

Gln Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala Phe Val Lys Arg Ala Pro Ser  
 1040 1045 1050

Thr Trp Leu Thr Ala Tyr Val Val Lys Val Phe Ser Leu Ala Val  
 1055 1060 1065

ES 2 361 725 T3

Asn Leu Ile Ala Ile Asp Ser Gln Val Leu Cys Gly Ala Val Lys  
 1070 1075 1080  
 Trp Leu Ile Leu Glu Lys Gln Lys Pro Asp Gly Val Phe Gln Glu  
 1085 1090 1095  
 Asp Ala Pro Val Ile His Gln Glu Met Ile Gly Gly Leu Arg Asn  
 1100 1105 1110  
 Asn Asn Glu Lys Asp Met Ala Leu Thr Ala Phe Val Leu Ile Ser  
 1115 1120 1125  
 Leu Gln Glu Ala Lys Asp Ile Cys Glu Glu Gln Val Asn Ser Leu  
 1130 1135 1140  
 Pro Gly Ser Ile Thr Lys Ala Gly Asp Phe Leu Glu Ala Asn Tyr  
 1145 1150 1155  
 Met Asn Leu Gln Arg Ser Tyr Thr Val Ala Ile Ala Gly Tyr Ala  
 1160 1165 1170  
 Leu Ala Gln Met Gly Arg Leu Lys Gly Pro Leu Leu Asn Lys Phe  
 1175 1180 1185  
 Leu Thr Thr Ala Lys Asp Lys Asn Arg Trp Glu Asp Pro Gly Lys  
 1190 1195 1200  
 Gln Leu Tyr Asn Val Glu Ala Thr Ser Tyr Ala Leu Leu Ala Leu  
 1205 1210 1215  
 Leu Gln Leu Lys Asp Phe Asp Phe Val Pro Pro Val Val Arg Trp  
 1220 1225 1230  
 Leu Asn Glu Gln Arg Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Thr Gln  
 1235 1240 1245  
 Ala Thr Phe Met Val Phe Gln Ala Leu Ala Gln Tyr Gln Lys Asp  
 1250 1255 1260  
 Ala Pro Asp His Gln Glu Leu Asn Leu Asp Val Ser Leu Gln Leu  
 1265 1270 1275  
 Pro Ser Arg Ser Ser Lys Ile Thr His Arg Ile His Trp Glu Ser  
 1280 1285 1290  
 Ala Ser Leu Leu Arg Ser Glu Glu Thr Lys Glu Asn Glu Gly Phe  
 1295 1300 1305  
 Thr Val Thr Ala Glu Gly Lys Gly Gln Gly Thr Leu Ser Val Val  
 1310 1315 1320

Thr Met Tyr His Ala Lys Ala Lys Asp Gln Leu Thr Cys Asn Lys  
 1325 1330 1335  
 Phe Asp Leu Lys Val Thr Ile Lys Pro Ala Pro Glu Thr Glu Lys  
 1340 1345 1350  
 Arg Pro Gln Asp Ala Lys Asn Thr Met Ile Leu Glu Ile Cys Thr  
 1355 1360 1365  
 Arg Tyr Arg Gly Asp Gln Asp Ala Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile  
 1370 1375 1380  
 Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln  
 1385 1390 1395  
 Leu Ala Asn Gly Val Asp Arg Tyr Ile Ser Lys Tyr Glu Leu Asp  
 1400 1405 1410  
 Lys Ala Phe Ser Asp Arg Asn Thr Leu Ile Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1415 1420 1425  
 Val Ser His Ser Glu Asp Asp Cys Leu Ala Phe Lys Val His Gln  
 1430 1435 1440  
 Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile Gln Pro Gly Ala Val Lys Val Tyr  
 1445 1450 1455  
 Ala Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro  
 1460 1465 1470  
 Glu Lys Glu Asp Gly Lys Leu Asn Lys Leu Cys Arg Asp Glu Leu  
 1475 1480 1485  
 Cys Arg Cys Ala Glu Glu Asn Cys Phe Ile Gln Lys Ser Asp Asp  
 1490 1495 1500  
 Lys Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu Asp Lys Ala Cys Glu Pro Gly  
 1505 1510 1515  
 Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Arg Leu Val Lys Val Gln Leu Ser  
 1520 1525 1530  
 Asn Asp Phe Asp Glu Tyr Ile Met Ala Ile Glu Gln Thr Ile Lys  
 1535 1540 1545  
 Ser Gly Ser Asp Glu Val Gln Val Gly Gln Gln Arg Thr Phe Ile  
 1550 1555 1560  
 Ser Pro Ile Lys Cys Arg Glu Ala Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys  
 1565 1570 1575

His Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys  
 1580 1585 1590

Pro Asn Leu Ser Tyr Ile Ile Gly Lys Asp Thr Trp Val Glu His  
 1595 1600 1605

Trp Pro Glu Glu Asp Glu Cys Gln Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln  
 1610 1615 1620

Cys Gln Asp Leu Gly Ala Phe Thr Glu Ser Met Val Val Phe Gly  
 1625 1630 1635

Cys Pro Asn  
 1640

<210> 6

<211> 77

<212> PRT

5 <213> humana

<400> 6

Ser Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro  
 1 5 10 15

Lys Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met  
 20 25 30

Arg Phe Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala  
 35 40 45

Cys Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg  
 50 55 60

Arg Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala Arg  
 65 70 75

<210> 7

<211> 76

10 <212> PRT

<213> humana

<400> 7

ES 2 361 725 T3

Ser Val Gln Leu Thr Glu Lys Arg Met Asp Lys Val Gly Lys Tyr Pro  
1 5 10 15

Lys Glu Leu Arg Lys Cys Cys Glu Asp Gly Met Arg Glu Asn Pro Met  
20 25 30

Arg Phe Ser Cys Gln Arg Arg Thr Arg Phe Ile Ser Leu Gly Glu Ala  
35 40 45

Cys Lys Lys Val Phe Leu Asp Cys Cys Asn Tyr Ile Thr Glu Leu Arg  
50 55 60

Arg Gln His Ala Arg Ala Ser His Leu Gly Leu Ala  
65 70 75

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal o un método para discriminar entre adenoma colorrectal y carcinoma colorrectal o un método para monitorizar el desarrollo y/o la evolución y/o el tratamiento de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal que comprende las etapas:
- 5 a) proporcionar un material de muestra aislado que se ha extraído de un individuo,
- b) determinar el nivel de un fragmento de endoplasmina en dicho material de muestra aislado,
- c) comparar el nivel determinado de un fragmento de endoplasmina con uno o más valores de referencia,
- en el que el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10,3 kDa.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que el fragmento de endoplasmina comprende la secuencia peptídica SEC ID N° 2 y/o SEC ID N° 3 o SEC ID N° 4.
- 15 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el nivel de un fragmento de endoplasmina en dicho material de muestra extraído de un paciente con adenoma colorrectal o carcinoma colorrectal aumenta en comparación con un material de muestra de un individuo sano.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que un primer aumento del nivel de un fragmento de endoplasmina en un primer material de muestra es indicativo de adenoma colorrectal y en el que un segundo aumento del nivel de un fragmento de endoplasmina en una segundo material de muestra, aislado de dicho individuo en un momento posterior respecto a dicho primer material de muestra, es indicativo de carcinoma colorrectal, con la condición de que dicho segundo aumento sea más fuerte que dicho primer aumento.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que en la etapa (b) uno o más biomarcadores para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal se determinan en dicho material de muestra aislado y en el que en la etapa (c) el nivel determinado de dichos biomarcadores se compara con uno o más valores de referencia respectivos.
- 25 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dichos biomarcadores adicionales para detectar adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal se seleccionan entre el grupo constituido por alfa-defensina 1, 2 ó 3, transtirretina, p53, C3a, CEA (antígeno carcinoembrionario), CA 19-9, CA 15-3, CA-125, Kras,  $\beta$ -Catenina, Her-2/neu, proteína C-reactiva e inestabilidad de microsatélite de MHL1 o MSH2 y combinaciones de los mismos.
- 30 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los valores de referencia de un fragmento de endoplasmina y opcionalmente los valores de referencia de biomarcadores adicionales se calculan como el nivel promedio de un fragmento de endoplasmina y opcionalmente biomarcadores adicionales en una pluralidad de muestras aisladas de un grupo respectivo de individuos, en el que el grupo de individuos son individuos sanos, pacientes con adenoma colorrectal y/o pacientes con carcinoma colorrectal.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el valor de referencia es un valor de referencia individual calculado como el nivel promedio de un fragmento de endoplasmina y opcionalmente de biomarcadores adicionales determinado en una pluralidad de material de muestra aislado extraído de dicho individuo en un periodo de tiempo.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de muestra aislado es un fluido corporal o tejido y en el que el fluido corporal se selecciona entre el grupo constituido por sangre, plasma sanguíneo, suero, médula ósea, heces, líquido sinovial, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, esputo, orina, leche materna, esperma, exudado y mezclas de los mismos.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de un fragmento de endoplasmina y opcionalmente de biomarcadores adicionales en dicho material de muestra se determina a nivel proteico.
- 45 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de un fragmento de endoplasmina y opcionalmente de biomarcadores adicionales en dicho material de muestra se determina mediante métodos inmunológicos o técnica proteómica y/o espectrometría de masas.
- 50 13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el método se realiza en combinación con otros métodos de diagnóstico para adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal para aumentar la sensibilidad y/o la especificidad.

14. Un uso de un fragmento de endoplasmina como biomarcador para la detección de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal en una muestra aislada de un individuo, en el que dicho fragmento de endoplasmina tiene un peso molecular de 10 a 14 kDa.
- 5 15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, para una detección temprana de adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal en una muestra aislada de un individuo.
16. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15, en combinación con uno o más biomarcadores adicionales para adenoma colorrectal y/o carcinoma colorrectal para aumentar la sensibilidad y/o la especificidad.
- 10 17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que al menos un biomarcador adicional se selecciona entre el grupo constituido por alfa-defensina 1, 2 ó 3, transtirretina, p53, C3a, CEA (antígeno carcinoembrionario), CA 19-9, CA 15-3, CA-125, Kras,  $\beta$ -Catenina, Her-2/neu, proteína C-reactiva e inestabilidad de microsatélite de MHL1 o MSH2 y combinaciones de los mismos.

**Figura 1**

**Figura 1A**

**SEC ID Nº 1**

**Secuencia de Endoplasmina ( grp 94)**

```

1 MRALWVLGLC CVLLTFGSVR ADDEVVDVGT VEEDLGKSRE GSRTDDEVVQ REEEAIQLDG
61 LNASQIRELR EKSEKFAFQA EVNRMMKLII NSLYKNKEIF LRELISNASD ALDKIRLISL
121 TDENALSGNE ELTVKIKCDK EKNLLHVTDI GVGMTREELV KNLGTIAKSG TSEFLNKMTE
181 AQEDGQSTSE LIGQFGVGFY SAFLVADKVI VTSKHNDTQ HIWESDSNEF SVIADPRGNT
241 LGRGTTITLV LKEEASDYLE LDTIKNLVKK YSQFINFPIY VWSSKTETVE EPMEEEEAAK
301 EEKEESDDEA AVEEEEEEEK PKTKKVEKTV WDWELMNDIK PIWQRPSKEV EEDEYKAFYK
361 SFSKESDDPM AYIHFTAEGE VTFKSILFVP TSAPRGLFDE YGSKKSDYIK LYVRRVFITD
421 DFHDMMPKYL NFVKGVVDS DPLNVSRET LQQHKLLKVI RKKLVRKTLD MIKKIADDKY
481 NDTFWKEFGT NIKLGVIEDH SNRTRLAKLL RFQSSHPTD ITSLDQYVER MKEKQDKIYF
541 MAGSSRKEAE SSPFVERLLK KGYEVIYLTE PVDEYCIQAL PEFDGKRFQN VAKEGVKFDE
601 SEKTESREA VEKEFEPLN WMKDKALKDK IEKAVVSQRL TESPCALVAS QYGWSGNMER
661 IMKAQAYQTG KDISTNYIAS QKKTFEINPR HPLIRDMLRR IKEDEDDKTV LDLAVVLFET
721 ATLRSGYLLP DTKAYGDRIE RMLRSLNID PDAKVEEPEE EEPEETAEDT TEDTEQDEDE
781 EMDVGTDEEE ETAKESTAEK DEL
    
```

**Figura 1B**

**Fragmentos de endoplasmina ( grp 94)**

**SEC ID Nº 2**

EEEAIQLDG LNASQIR

**SEC ID Nº 3**

FAFQA EVNR

**SE ID Nº 4**

EEEAIQLDG LNASQIRELR EKSEKFAFQA EVNR



**Figura 2**  
**C3 (SEC ID N° 5)**

## C3 Protein

ID CO3\_HUMAN\_2; parent: CO3 HUMAN  
 FT CHAIN 23 1663 Complement C3.  
 SQ Sequence 1641 AA;

SPMYSIITPN ILRLESEETM VLEAHDAQGD VPVTVTVHDF PGKKLVLSSE KTVLTPATNH  
 MGNVTFITPA NREFKSEKGR NKFVTVQATF GTQVVEKVVL VSLQSGYLFI QTDKTIYTPG  
 STVLYRIFTV NHKLLPVGRT VMVNIENPEG IPVKQDSLSS QNQLGVLPPLS WDIPELVNMG  
 QWKIRAYYEN SPQQVFSTEF EVKEYVLPSP EVIVEPTEKF YYIYNEKGLE VTITARFLYG  
 KKVEGTAFVI FGIQDGEQRI SLPESLKRIP IEDGSGEVVL SRKVLDDGVQ NLRAEDLVGK  
 SLYVSATVIL HSGSDMVQAE RSGIPIVTSF YQIHFTKTPK YFKPGMPFDL MVFVTNPDGS  
 PAYRVPVAVQ GEDTVQSLTQ GDGVAKLSIN THPSQKPLSI TVRTKKQELS EAEQATRTMQ  
 ALPYSTVGNS NNYLHLSVLR TELRPGETLN VNFLLRMDRA HEAKIRYYTY LIMNKGRLLK  
 AGRQVREPGQ DLVVLPLSIT TDFIPSFRLV AYYTLIGASG QREVVADSVW VDVKDCVGS  
 LVVKSGQSED RQVVPQQMT LKIEGDHGAR VVLVAVDKGV FVLNKKNKLT QSKIWDVVEK  
 ADIGCTPGSG KDYAGVFSDA GLTFTSSSGQ QTAQRAELQC PQPAARRRRS VQLTEKRMDK  
 VGKYPKELRK CCEDGMRENF MRFSCQRRTF FISLGEACKK VFLDCCNYIT ELRRQHARAS  
 HGLLARSNLD EDIIAEENIV SRSEFPESWL WNVEDLKEPP KNGISTKLMN IFLKDSITTW  
 EILAVSMSDK KGICVADPFE VTVMQDFPID LRLPYSVVRN EQVEIRAVLY NYRQNQELKV  
 RVELLHNPFAF CSLATKRRH QQTVTIPPKS SLSVPYVIVP LKTGLQEVV KAAVYHHFIS  
 DGVKSLKVV PEGIRMNKTV AVRTLDPERL GREGVQKEDI PPADLSDQVP DTESETRILL  
 QGTPVAQMTD DAVDAERLKH LIVTPSGCGE QNMIGMTPTV IAVHYLDETE QWEKFGLEKR  
 QGALELIKKG YTQQLAFROP SSAFAAFVKR APSTWLTAYV VKVFSLVANL IAIDSQVLCG  
 AVKWLILEKQ KPDGVFQEDA PVIHQEMIGG LRNNNEKDMA LTAFVLISLQ EAKDICEEQV  
 NSLPGSITKA GDFLEANYMN LQRSYTVVIA GYALAQMGRL KGPLLNKFLT TAKDKNRWED  
 PGKQLYNVEA TSYALLALLQ LKDFDFVPEV VRWLNEQRY GGGYGSTQAT FMVFQALAQY  
 QKDAPDHQEL NLDVSLQLPS RSSKITHRIH WESASLLRSE ETKENEGFTV TAEGKGQGTI  
 SVVTMYHAKA KDQLTCNKFD LKVTIKPAPE TEKRPODAKN TMILEICTRY RGDQDATMSI  
 LDISMMTGFA PDTDDLKQLA NGVDRIYSKY ELDKAFSDRN TLIYLDKVS HSEDDCLAFK  
 VHQYFNVELI QPGAVKVYAY YNLEESCTRF YHPEKEDGKL NKLCRDELKR CAEENCFFIQK  
 SDDKVTLEER LDKACEPGVD YVYKTRLVKV QLSNDFDEYI MATEQTIKSG SDEVQVGQQR  
 TFISPIKCRE ALKLEKKHY LMWGLSSDFW GEKPNLSYII GKDTWVEHWP EEDECQDEEN  
 QKQCQDLGAF TESMVFVFGCP N

**Figura 3A**

C3A: 77 aminoácidos, 9,094 Da, pl 9,7 ( SEC ID N° 6)

ID CO3\_HUMAN\_5; parent: CO3\_HUMAN

FT PEPTIDE 672 748 C3a anaphylatoxin.

SQ Sequence ;

SVQLTEKRMD KVGKYPKELR KCCEDGMREN PMRFSCQRRT RFISLGEACK  
KVFLDCCNYITELRRQHARA SHLGLAR

**Figura 3B**

C3A-desArg: 76 aminoácidos, pl 9,54 ( SEC ID N° 7)

SVQLTEKRMD KVGKYPKELR KCCEDGMREN PMRFSCQRRT RFISLGEACK  
KVFLDCCNYITELRRQHARA SHLGLA

Figura 4

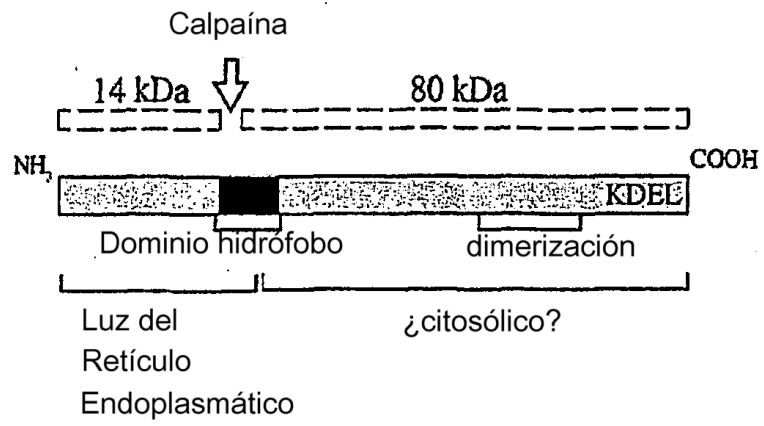


Figura 5

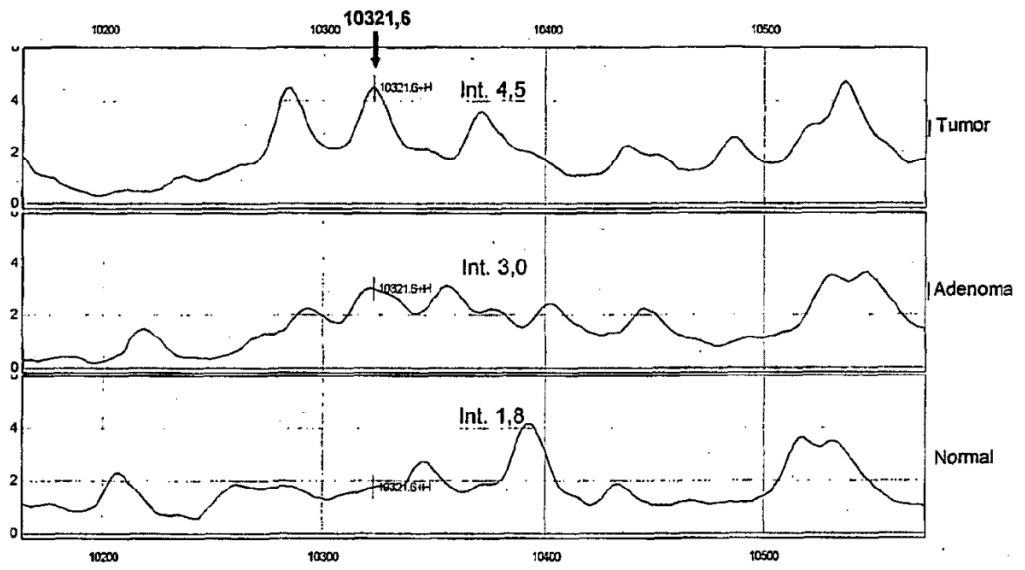


Figura 6

Fragmento de endoplasmina

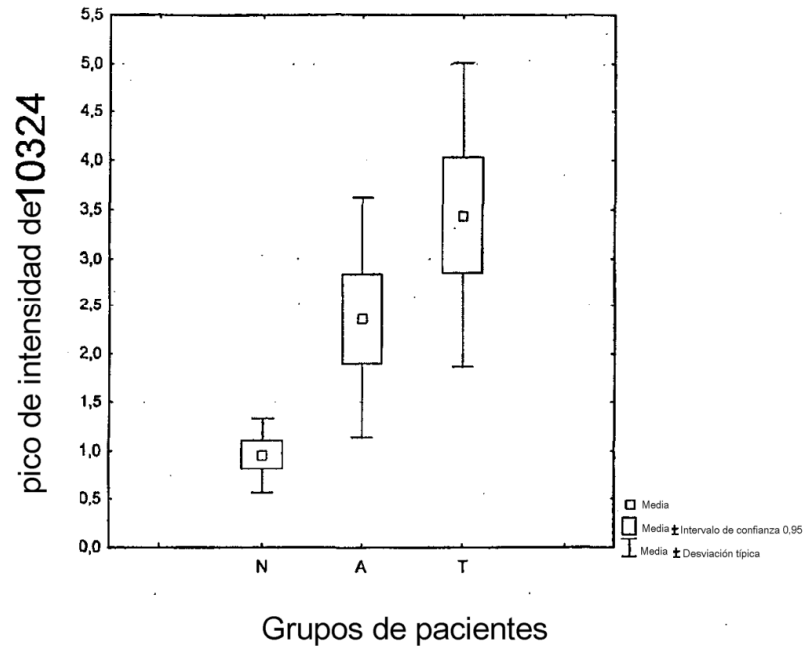
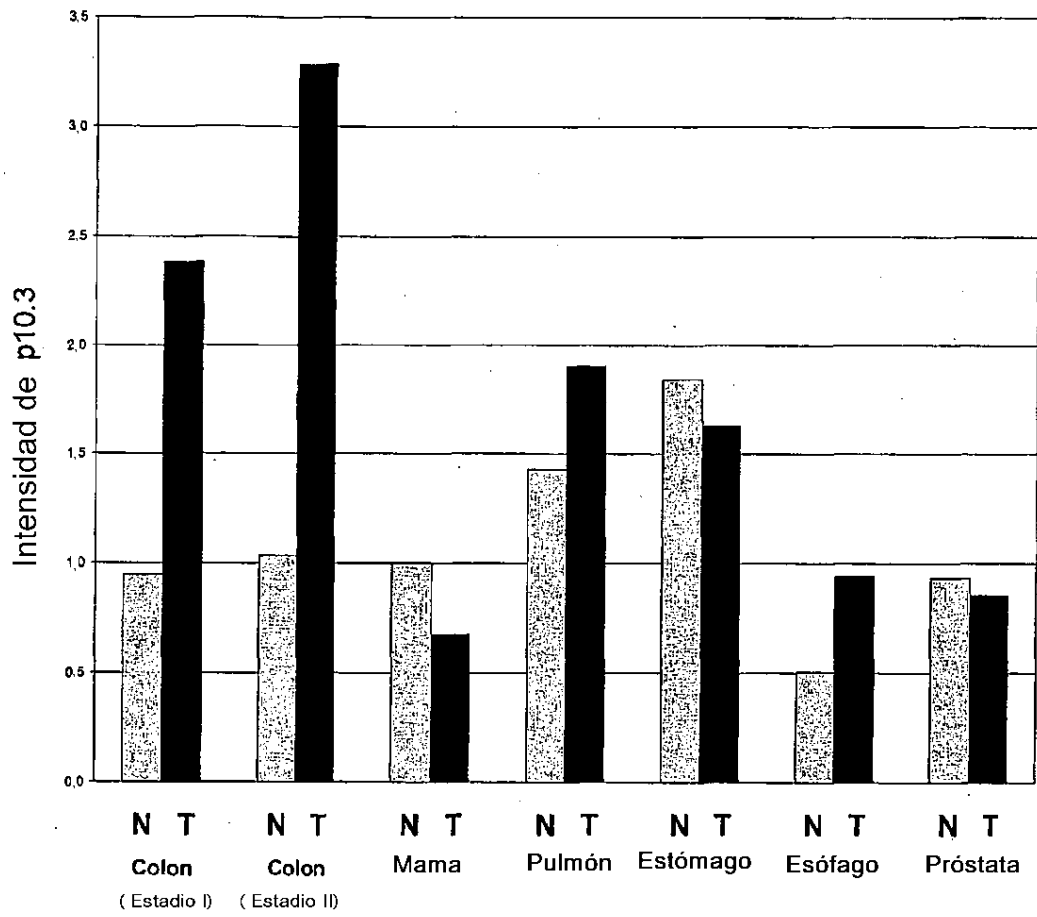


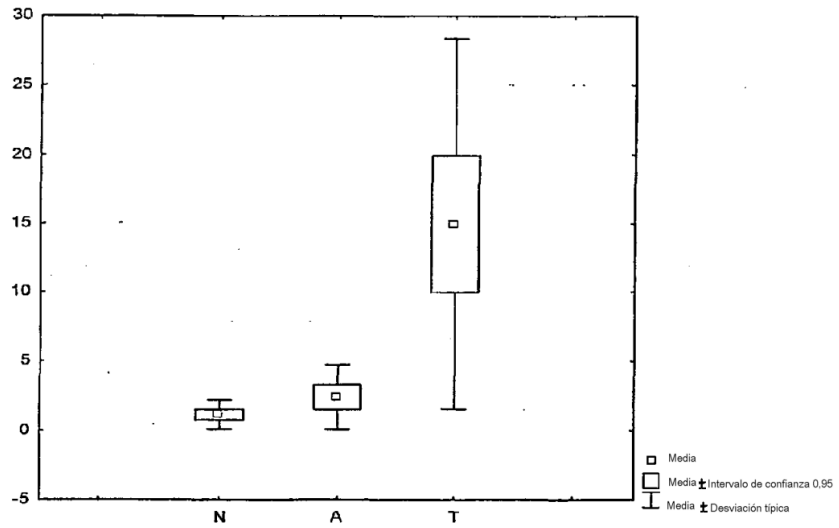
Figura 7



**Figura 8**

Análisis del pico 3.489 [Da] mediante SELDI-TOF-MS

**Pico de  
intensidad  
3489**



**Paciente**

Figura 9

Análisis del pico 4838 [Da] mediante SELDI-TOF-MS

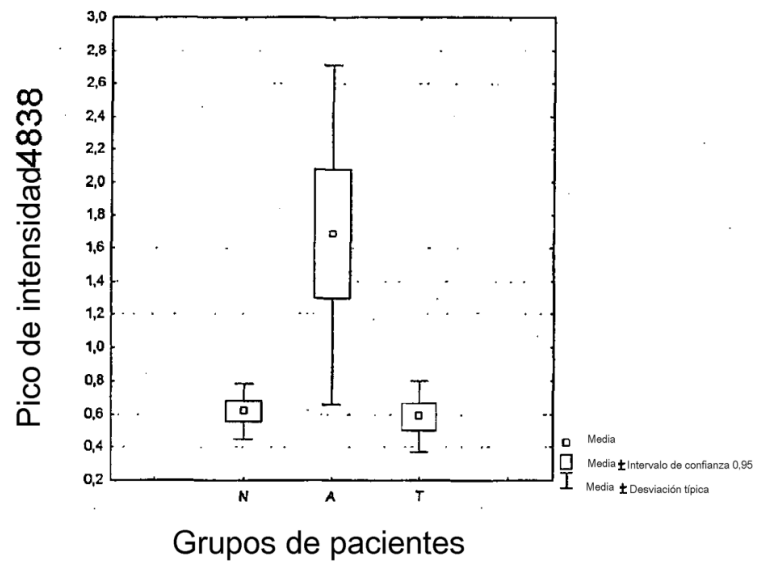




Figura 10 A

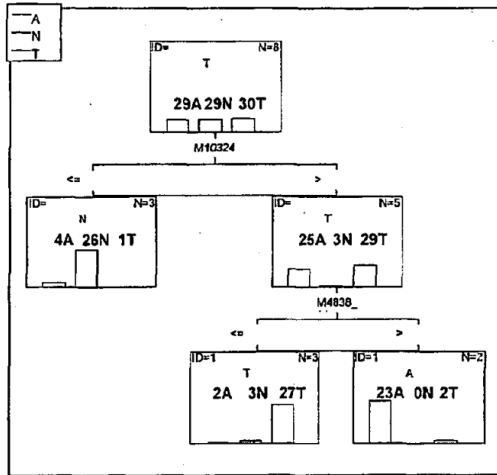
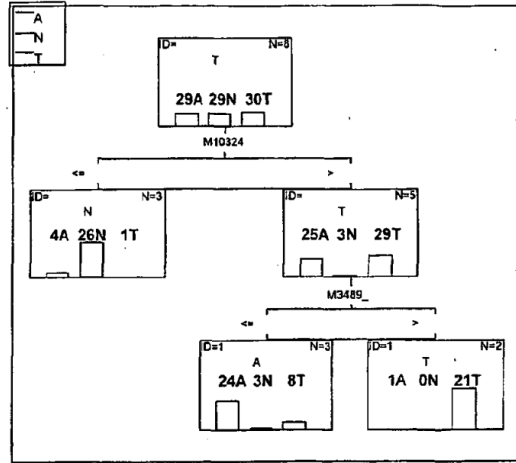


Figura 10 B



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente Europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

5 **Documentos de patentes citados en la descripción**

- DE 10019967 A1 [0008]
- EP 2005009005 W [0114]

**Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción**

- World cancer report. IARC Press, 2003 [0010]
- **Kudo S.** *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.*, 1997, vol. 7, 87-98 [0004]
- **Posner MR; Mayer RJ.** The use of serologic tumor markers in gastro intestinal malignancies. *Hematol Oncol Clin North Am*, 1994, vol. 8, 533 [0005]
- **Wang Xiao-Ping et al.** *World J. Gastroenterol.*, 2005, vol. 11 (7), 1056-1059 [0006]
- **Schreiter K. et al.** *Gut*, 2005, vol. 54, 935-943 [0009]
- **Tuerk C.; Gold L.** *Science*, 1990, vol. 249, 505-510 [0019]
- **Ellington AD.; Szostak JW.** *Nature*, 1990, vol. 346, 818-822 [0019]
- **Breiman, L.; Friedman, J. H.; Olshen, R. A.; Stone, C. J.** Classification and regresion trees. 1984 [0103]