

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 167**

51 Int. Cl.:
C07K 14/81 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03795518 .4**
96 Fecha de presentación: **27.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1539817**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **INMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN ESPECÍFICA DE ISOFORMAS DE SCCA.**

30 Prioridad:
10.09.2002 SE 0202702

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2012

73 Titular/es:
Fujirebio Diagnostics AB
Majnabbe Terminal Building
414 55 Göteborg , SE

72 Inventor/es:
RÖJER, Eva y
OLLE, Nilsson

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 376 167 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

Inmunoensayos para la determinación específica de isoformas de SCCA

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a la determinación específica de diferentes isoformas de SCCA y al uso de la concentración serológica de las diferentes isoformas y proporción entre ellas como un medio de diagnóstico del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 El antígeno de carcinoma de células escamosas (SCCA) es un marcador serológico para los carcinomas de células escamosas (SCC) del útero, cuello del útero, pulmón, cabeza y cuello, vulva y esófago (1, 2). Lo purificaron originalmente al final de la década de los 70 Kato y colaboradores a partir del complejo TA-4 del carcinoma de células escamosas del cuello del útero humano con un peso molecular de 42-48 kDa (1, 3). La electroforesis del complejo TA-4 reveló más de 10 fracciones y el isoelectroenfoco del antígeno sugirió dos subfracciones, una isoforma ácida ($pI < 6,25$) y una neutra ($pI \geq 6,25$) (4).

15 La clonación del ADNc de SCCA muestra que pertenece a la familia de los inhibidores de serina proteasas (serpinas) (6). La clonación adicional de la región genómica del cromosoma 18q21.3 reveló dos genes dispuestos en tándem (7). El más telomérico, el SCCA original, se designó SCCA1, mientras que el más centromérico se designó SCCA2 (Figura 1). Ambos contienen ocho exones y los límites intrón-exón, sitios de corte y empalme, codones de inicio y codones terminales potenciales son idénticos. Son idénticos en un 98% a nivel de nucleótidos e idénticos en un 92% a nivel de aminoácidos. Los valores de pI deducidos de los productos génicos SCCA1 y SCCA2 muestran que la isoforma neutra está codificada por SCCA1 y la isoforma ácida por SCCA2.

20 En los seres humanos las serpinas se localizan en uno de dos grupos cromosómicos. *PI6*, *PI9* y *ELNAH2* se localizan en 6p25, mientras que *PI8*, *Bomapina*, *PAI2*, *SCCA1*, *SCCA2*, *Headpin* y *Maspina* se localizan en 18q21.3 (Figura 1) (7-12). Se supone que estos grupos han surgido a través de dos duplicaciones intercromosómicas independientes y varios ciclos de duplicaciones intracromosómicas (9). Se ha publicado frecuentemente que la región cromosómica 18q es una región con una frecuencia alta de reorganizaciones (9, 13-16). Las dianas y funciones de las serpinas no se entienden completamente. Para la mayor parte, las funciones principales son la regulación de eventos proteolíticos asociados con la coagulación, fibrinólisis, apoptosis e inflamación, aunque se han publicado funciones alternativas tales como regulación del transporte de hormonas y de la presión sanguínea (17-24).

25 Aunque SCCA1 y SCCA2 son casi idénticas, se diferencian en sus bucles de sitio reactivo (Figura 2 y 3). SCCA1 inhibe las cisteína proteinasas semejantes a papaina catepsina S, K y L (25, 26) mientras que SCCA2 inhibe las serina proteinasas semejantes a quimiotripsina catepsina G y quimasa de mastocitos (27). Los estudios sobre el bucle del sitio reactivo (RSL) de SCCA1 muestran que RSL es esencial para la inhibición de cisteína proteinasa (28). La parte variable de RSL dicta la especificidad de las proteinasas diana mostrado por mutantes de intercambio de RSL de SCCA1 y SCCA2 y mutantes únicos (28, 29). Es probable que las serpinas utilicen un mecanismo dependiente de RSL común para inhibir tanto las serina como las cisteína proteinasas.

30 El papel biológico de SCCA1 y SCCA2 no se entiende completamente. Se considera que son serpinas inhibitoras. Los datos sugieren que SCCA están implicadas en la apoptosis y la expresión hace que las células cancerosas sean resistentes a varios mecanismos de muerte por inhibición de la apoptosis (30).

35 SCCA1 y SCCA2 se detectan en el citoplasma de células epiteliales escamosas normales (31, 33). El antígeno, que aparece en el suero de pacientes, puede ser una función de la superproducción de SCCA por las células tumorales y su velocidad de recambio normal (34). Se ha publicado que el SCCA detectado en el suero usando un ensayo de radioinmunología con anticuerpo o PCR en tiempo real, RT-PCR, es principalmente SCCA2 (1, 35, 36) pero otros estudios usando PCR indican que ambos antígenos pueden amplificarse y detectarse en muestras de pacientes (37).

40 Las concentraciones séricas en pacientes con SCC se correlacionan con el estadio clínico y con el grado de diferenciación histológica del tumor (1). Para el cáncer del cuello del útero, varios estudios muestran una correlación entre los valores de pretratamiento y el resultado clínico (1, 38-43). Los estudios también muestran una correlación entre niveles altos de SCCA y volumen tumoral. La recurrencia o enfermedad progresiva pudieron detectarse varios meses antes de la evidencia clínica (39). Se observan resultados similares para carcinomas de células escamosas de pulmón, vulva, cabeza y cuello y esófago (1, 2, 44, 45). En todos estos estudios, han medido el nivel total de SCCA. Por ejemplo, Cataltepe et al. (33) describen el desarrollo de anticuerpos monoclonales específicos y un ensayo discriminatorio sensible para los marcadores tumorales circulantes SCCA1 y SCCA2. Sin embargo, los anticuerpos según Cataltepe et al. (33) sólo pueden usarse para la determinación de SCCA1 o SCCA2 "total". Sólo son útiles para la determinación de

niveles altamente elevados de estas moléculas y por lo tanto no son adecuados para distinguir entre sujetos con cáncer y sanos ni para la monitorización de la respuesta a terapia y detección de enfermedad recurrente.

5 Las SCCA pertenecen a la familia de las serpinas y es probable que diferentes formas de las serpinas puedan detectarse en tejidos y en la circulación. La función general de las serpinas es regular la actividad de diferentes enzimas proteolíticas y puede especularse que SCCA1 y SCCA2 en tejidos y suero también pueden aparecer como la serpina "libre" y como un complejo con sus proteasas diana. Esto sería similar a la serina proteasa PSA que en el suero se encuentra principalmente como un complejo con la serpina alfa1-antitripsina. La determinación específica de SCCA1 y SCCA2 así como la forma respectiva "libre" y en complejo de la serpina respectiva también puede proporcionar información clínica adicional comparada con SCCA "total".

10 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención describe el establecimiento de anticuerpos monoclonales capaces de distinguir entre SCCA1 y SCCA2 así como entre la cantidad "libre" y "total" de la serpina respectiva. Además, la invención describe el uso de los anticuerpos discriminatorios establecidos para el diseño de inmunoensayos para la determinación de la forma total y "libre" de las serpinas SCCA1 y SCCA2, así como el uso de los inmunoensayos para el diagnóstico del cáncer y la detección de enfermedad recurrente.

DESCRIPCION DE REALIZACIONES ESPECIFICAS

20 El establecimiento de anticuerpos monoclonales frente a epítomos de SCCA1 y SCCA2, así como SCCA varios expuestos y escondidos en el complejo serina proteasa de las SCCA, respectivamente, hace posible diseñar inmunoensayos específicos para la determinación de la forma respectiva de SCCA. Además, en la presente invención se describen métodos para el diagnóstico del cáncer usando los inmunoensayos específicos.

EJEMPLO 1

Producción de SCCA recombinante

1.1 Clonación de SCCA

25 Se prepararon ARNm de las líneas celulares Caski (cuello uterino), C-4I (cuello uterino), A549 (pulmón) y RPMI2650 (faringe) usando el kit de Purificación de ARNm Micro QuickPrep (Pharmacia) y se preparó el ADNc usando el kit de Síntesis de Primera Cadena de ADNc (Pharmacia). Un fragmento de ADN de 1218 pb que engloba la secuencia codificadora de SCCA se amplificó por PCR en una reacción de 100 µl que contiene 10 mM Tris-HCl pH 8,85, 25 mM KCl, 5 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄ (Boehringer), 0,2 mM dNTP (Pharmacia), 10 µM SCCA 1-7F (las secuencias de ADN de todos los cebadores se muestran en la Tabla 1), 10 µM SCCA 391-397B, 2 µl de ADNc y 2,5 U de polimerasa Pow (Boehringer). Después de desnaturalizar las muestras durante 5 min a 96°C, se realizó un total de 30 ciclos, 30 consistiendo cada uno en desnaturalización durante 15 segundos a 96°C, hibridación durante 15 segundos a 60°C y extensión durante 30 segundos a 72°C. La reacción de PCR se completó con una extensión final durante 10 min a 72°C.

Detección de SCCA1 y SCCA2

35 La presencia de SCCA1 en los productos de PCR se detectó por escisión con la enzima de restricción SacII, lo que resultó en dos fragmentos, 245 y 973 pb, respectivamente, o por PCR específica de SCCA1 usando los cebadores SCCA1-7F y SCCA1 323-329B en una reacción de PCR estándar (75 mM Tris-HCl pH 8,8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,01% Tween 20, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 10 µM de cada cebador, molde, y 0,025 U/µl de reacción de Polimerasa Taq; después de desnaturalizar las muestras durante 5 min a 96°C, se realizó un total de 30 ciclos, consistiendo cada uno en desnaturalización durante 15 segundos a 96°C, hibridación durante 15 segundos a la temperatura óptima de hibridación 40 y extensión durante 30 segundos a 72°C. La reacción de PCR se completó con una extensión final durante 10 min a 72°C), Ta=50°C, lo que resultó en un fragmento de 997 pb. La presencia de SCCA2 se detectó por PCR estándar usando SCCA 1-7F y un cebador específico de SCCA2, SCCa2 357-363B, Ta=60°C, lo que proporciona un fragmento de 1.090 pb.

Clonación

45 Los productos de PCR se clonaron usando el kit de clonación PCR-Script Amp (Stratagene). Los cribados de colonias se realizaron por PCR como se describe en 1.2. Los ADN plasmídicos se prepararon a partir de los clones seleccionados que contienen SCCA1 o SCCA2 usando el Sistema de Purificación de ADN Wizard Plus Minipreps (Promega).

Secuenciación del ADN

Los clones se secuenciaron usando ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing (PE Biosystems). Las muestras se corrieron en un ABI Prism 310.

Reclonación

- 5 Los clones seleccionados se reclonaron en el vector de expresión pGEX-6P-3 (Pharmacia). Los fragmentos se escindieron del vector PCR-Script Amp usando BamHI y XhoI y se ligaron en el vector de expresión en una reacción de 10 μ l que contiene 1xOPA, 1 mM ATP, 50 ng del vector escindido, inserto de SCCA correspondiente a una proporción moles de extremos vector:inserto de 1:5-1:8, y 7,5-10 U de ADN ligasa T4 (todos de Pharmacia). Los tubos de reacción se incubaron a 10°C toda la noche y se inactivaron durante 10 min a 65°C. Se transformaron 2-4 μ l de la reacción en *E. coli* JM109 (46). Los ADN plasmídicos de los clones seleccionados se transformaron en *E. coli* BL21 para la expresión de proteínas.

Mantenimiento del gen clonado

- 15 El ADN plasmídico (pGEX-6P-3 que contiene el gen de fusión SCCA1/A2) en una disolución de tampón 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) se almacena a -80°C. Para iniciar la expresión de proteínas, el ADN plasmídico se transforma en *E. coli* BL21 competentes según Sambrook et al. (p 1.82-1.84 en ref. 46). Para la preparación de más ADN plasmídico, se prefiere la transformación en *E. coli* JM109.

1.1.2 Expresión y purificación de proteínas

Expresión de Proteínas

- 20 Las condiciones de expresión se determinaron por preparaciones a pequeña escala. Para la expresión a gran escala, se inocularon cultivos de 500 ml de 2xYT y 100 μ g de ampicilina/ml con 5 ml de cultivo de toda la noche y se crecieron a 37°C. La expresión de proteínas se indujo a $DO_{600}=0,5-1,3$ mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0,1 mM.

Purificación de Proteínas

- 25 Las células se recogieron por centrifugación durante 10 min a 2.000 g, se lavaron con 50 ml de TE pH 8,0, y se disolvieron en 3 ml de TE/g de sedimento bacteriano. Se añadió lisozima a una concentración final de 800 μ g/g de sedimento y las mezclas se incubaron en hielo durante 30-60 min y se congelaron toda la noche a -70°C. Se añadieron cloruro de magnesio y ADNasa a una concentración final de 12 mM y 20 μ g/g de sedimento, respectivamente. Después de incubar en hielo durante 30 min, las muestras se centrifugaron durante 30 min a 40.000 g. A cada sobrenadante se añadieron 0,5 ml de 50% Sefarosa de Glutatión (Pharmacia) y se incubó durante 30 min-2 h a temperatura ambiente con agitación suave. La suspensión de sólidos se lavó 5-7 veces usando 1xPBS. Se eluyó la proteína de fusión GST-SCCA usando 0,5-1 ml de Glutatión Reducido (Pharmacia) y se incubó durante 30-60 min a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C, todo con agitación suave. La proteína SCCA se eluyó por escisión entre GST y SCCA. Se añadieron 0,48 ml de tampón de escisión (50 mM Tris-HCl pH 7,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) y 20 μ l de proteasa PreScission y las muestras se incubaron a 4°C con agitación suave durante 4 h o toda la noche. Las proteínas se analizaron en SDS-PAGE por Phast-system (Pharmacia).

EJEMPLO 2

Establecimiento de hibridomas y anticuerpos monoclonales

2.1 Inmunización y selección primaria de hibridomas Anti SCCA

- 40 Se obtuvieron antisueros policlonales reactivos con antígeno SCC por inmunización subcutánea de conejos con antígeno SCC recombinante y recogida de los sueros inmunes según los procedimientos estándar. La titulación de los antisueros policlonales se ensayó por determinación de la reactividad de los antisueros con SCCA2 y SCCA1 biotinilados inmovilizados en placas de estreptavidina (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia). Los SCCA2 y SCCA1 recombinantes se biotinilaron con éster caproato de Biotina-N-succinimida según los procedimientos estándar.

- 45 Los anticuerpos monoclonales reactivos con SCCA1 y SCCA2 se obtuvieron por inmunización de ratones Balb/c intraperitonealmente con 10-50 μ g de SCCA recombinante en adyuvante Ribi. Después de la inmunización y de 2-4 dosis de refuerzo durante 60-90 días se fusionaron células de bazo de los ratones inmunizados con células de mieloma P3 x 63Ag 8 como se describe.

5 Los hibridomas que producen anticuerpos que reaccionan con SCCA1 y/o SCCA2 se seleccionaron por cribado con ELISA de los sobrenadantes de hibridomas en pocillos de microtitulación recubiertos con antisuero policlonal purificado por afinidad frente a IgG + M de ratón, (Jackson Immuno Res Lab, EEUU). Los pocillos se incubaron con antígeno SCCA y, después de lavar, el antígeno unido se detectó por incubación con Anti SCC de Conejo policlonal e Ig Anti Conejo de Cerdo marcada con HRP (Dako AS, Copenhague, Dinamarca).

2.2 Reactividad de los hibridomas seleccionados con antígenos SCC

10 La reactividad de los hibridomas establecidos se ensayó en un ELISA similar al procedimiento de cribado. Brevemente, los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas se inmovilizaron en placas de microtitulación recubiertas con antisuero policlonal frente a IgG+M de ratón (Jackson Immuno Res Lab, EEUU). Los pocillos se incubaron con 50 µL de los diferentes antígenos SCC recombinantes (SCCA1, SCCA2, proteína de fusión SCCA1/A2 y SCCA2/A1) en PBS 1% BSA durante 1 h, después de lavar las placas se incubaron con 100 µL de anti-SCC de conejo diluido 1/5.000 en PBS-1% BSA y se incubaron durante 1 h adicional. El Anti-SCC de conejo unido se detectó por incubación con Ig anti Conejo de Cerdo-HRP y se visualizó con sustrato OPD y determinación de DO a 450 nm.

15 En la figura 4 se muestra la reactividad de los hibridomas seleccionados. También son evidentes a partir de la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1

SCC Mab	SCCA1	SCCA2	SCCA1/A2	SCCA2/A1
SCC107	84	69	71	100
SCC113	79	72	82	100
SCC131	98	100	100	92
SCC133	99	80	87	97
SCC134	81	58	99	66
SCC136	88	89	78	79
SCC140	100	57	77	100
SCC143	97	70	68	90
SCC154	79	54	74	68
SCC162	94	62	79	81
SCC163	80	65	73	80
SCC164	85	54	82	63
SCC110	89	1	87	12
SCC111	97	0	78	15
SCC118	94	0	68	15
SCC124	100	2	88	16
SCC141	5	42	0	80
SCC161	0	43	0	45
SCC103	0	100	85	0
SCC104	0	90	85	0
SCC109	0	79	100	0

2.3 Selección de los anticuerpos monoclonales que discriminan entre SCCA libre y unido en complejo

20 Los Mab que reaccionan con epítopos expuestos en los complejos SCCA-proteasa así como los Mab que reaccionan con epítopos "escondidos" en el complejo serpina-proteasa se seleccionaron por determinación de la unión a complejo SCCA-proteasa y a SCCA "libre".

2.3.1 Establecimiento de complejos SCCA-proteasa

5 La unión de complejo de SCCA a proteasas diana se realizó mezclando 2 µg de SCCA-proteína con 0,5 µg de Catepsina G (Bioscience Int.) ó 0,5 µg de 0,9 µg Catepsina L (Calbiochem) en tampón 1xPBS en un volumen total de 4,5 µl. Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 minutos. A cada muestra, se añadieron 0,5 µl de 10xComplejo-tampón (20% SDS, 140 mM Mercaptoetanol, azul de bromofenol). Las muestras se incubaron durante 3 minutos a 95°C y se analizaron en un gel de SDS-PAGE al 12,5%.

La reactividad de la unión al complejo es evidente a partir de la Tabla 2 siguiente y de la Figura 5.

2.3.2 Reactividad con complejos SCCA-proteasa

10 Los Mab que reconocen epítomos que no interferían con la formación de complejos entre SCCA1 y Catepsina L y SCCA2 y Catepsina G, respectivamente, se detectaron por preincubación de los anticuerpos que reconocían epítomos localizados en el Exón 2-7 de SCCA1 y SCCA2 respectivamente y determinación de la formación de complejos en ensayos ELISA como se describe.

15 Tomando como base la capacidad de inhibir la formación de complejos entre SCCA1 y Catepsina L y SCCA2 y Catepsina G, respectivamente, se dedujo que varios anticuerpos reconocían epítomos que no estaban influidos por la formación de complejos entre las serpinas y las proteasas diana. En la figura 5, así como en la Tabla 2 siguiente, se muestra la reactividad de los anticuerpos con serpina-proteasas.

Tabla 2

SCC Mab	SCCA1- CatL	Cat L	SCCA2- CatG	CatG
SCC107	88	2	81	12
SCC133	86	3	75	21
SCC154	92	2	83	15
SCC162	79	4	85	16
SCC164	82	5	87	7
SCC134	94	2	39	15
SCC136	83	2	60	13
SCC113	93	5	100	17
SCC140	92	5	96	12
SCC163	78	4	70	9
SCC131	88	4	45	15
SCC143	80	5	28	12
SCC124	72	1	12	15
SCC118	77	1	12	18
SCC110	87	2	15	21
SCC111	94	3	8	12
SCC141	12	0	68	14
SCC161	15	0	56	17
SCC104	4	0	12	8
SCC109	2	0	8	17
SCC103	5	0	100	14

20 Los anticuerpos descritos en 2.3.1., que reaccionaban con epítomos localizados en el Exón 8 inhibieron la formación de complejos entre la serpina respectiva y su proteasa. Puede deducirse que estos anticuerpos reconocían epítomos "escondidos".

Los complejos con SCCA "libre" se muestran en la Tabla 3 siguiente, así como en la Figura 6.

Tabla 3

SCC Mab	SCCA1	SCCA2	SCCA1/A2	SCCA2/A1
SCC107	84	69	71	85
SCC133	99	80	87	90
SCC154	79	54	74	68
SCC162	94	62	79	81
SCC164	85	54	82	63
SCC134	81	58	99	66
SCC136	88	89	78	79
SCC113	79	72	82	89
SCC140	95	77	77	100
SCC163	80	65	73	80
SCC131	98	100	100	92
SCC143	97	70	68	90
SCC124	85	2	88	16
SCC118	94	0	68	15
SCC110	89	1	87	12
SCC111	97	0	78	5
SCC141	10	52	0	80
SCC161	0	53	0	55
SCC104	0	90	85	0
SCC109	0	79	100	0
SCC103	0	100	85	0

2.3.3 Resumen de la reactividad de Mab establecidos

5 La reactividad de los anticuerpos monoclonales establecidos frente a las diferentes formas de SCCA se resume en la Tabla 4.

Tabla 4

Grupo A Mab de VARIOS SCC					Grupo B Mab DE SCCA1		Grupo C Mab de SCCA			
A1a	A1b	A2	A3a	A3b	B1	B2	C1a	C1b	C2a	C2b
SCC 107	SCC 134	SCC 113	SCC 140	SCC 131	SCC 124	K134	SCC 141	SCC 161	SCC 103	SCC 104
SCC 119	SCC 136		SCC 163	SCC 143	SCC 118	K135				SCC 109
SCC 123					SCC 110					K122
SCC 128					SCC 111					
SCC 133										
SCC 154										
SCC 162										
SCC 164										

Los grupos A1b y A3b reaccionan preferentemente con SCC "Libre"; los Grupos C1a y C2a reconocen "SCCA2 Total", mientras que los Grupos C1b y C2b reconocen sólo "SCCA2 Libre".

5 2.4 Producción de anticuerpos monoclonales discriminatorios

Los anticuerpos monoclonales se produjeron por cultivo in vitro de los clones de hibridoma por inoculación de 10⁴ células/mL en DMEM, 5% Suero Fetal de Ternera en botellas giratorias y se dejó que crecieran durante 10-14 días. Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir del medio de cultivo por cromatografía de afinidad con Proteína A (Bioprocessing Ltd, Durham, Reino Unido) según la recomendación del fabricante.

10 EJEMPLO 3

Establecimiento de inmunoensayos

Usando los anticuerpos monoclonales establecidos y proteínas recombinantes fue posible desarrollar inmunoensayos para la determinación específica de SCCA total y SCCA "libre" total y ensayos específicos para SCCA1 total y SCCA1 "libre" así como ensayos para la determinación específica de SCCA2 total y SCCA2 "libre", respectivamente.

15 3.1. Inmunoensayos para la determinación de SCCA total

3.1.1 Inmunoensayos para la determinación de "SCCA total"

Los ensayos específicos para SCCA, es decir el total de SCCA1 "libre", SCCA2 "libre", SCCA1 en complejo y SCCA2 en complejo se diseñaron usando anticuerpos entre A1a (Tabla 1) en combinación con anticuerpos de los Grupos A2 o A3a.

En la configuración preferida, el anticuerpo SCC113 se usó como anticuerpo de captura y SCC107 como anticuerpo de detección.

5 El Mab SCC113 se biotiniló con éster caproato de BiotinaNHRS, Sigma Chemical Co, EEUU, usando procedimientos estándar y se usó como anticuerpo de captura. El Mab SCC107 se conjugó con HRP según una modificación del procedimiento de Nakone.

El Mab SCC113 biotinilado y el Mab SCC107 conjugado con HRP se usaron en un EIA de una etapa según el protocolo siguiente.

Procedimiento del ensayo:

10 1. Añadir 25 µL de antígeno SCCA recombinante (0-50 µg/L en PBS, 60 g/L BSA, pH 7,2) + 100 µL de Mab SCC113 Biotina, 1 µg/mL y HRPSCC107, 1 µg/mL en Tampón de Ensayo a placas de microtitulación recubiertas con Estreptavidina, Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia.

2. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación

3. Lavar 6 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.

4. Añadir 100 µL TMB, ELISA Technology, EEUU.

15 5. Incubar 30 min ± 5 min

6. Determinar DO 620 nm en lector ELISA.

Las curvas dosis-respuesta de los antígenos SCCA1 y SCCA2 libres y en complejo revelaron que el ensayo reconocía todas las formas de SCCA.

3.2. Ensayos para la determinación específica de SCCA1

20 3.2.1 Ensayos para SCCA1 total

Los ensayos específicos para SCCA1 total, es decir, SCCA1 Libre y en Complejo, sin reactividad significativa con SCCA2 se diseñaron usando anticuerpos del Grupo B1 en combinación con anticuerpos del Grupo A1a, A2 o A3a. En la configuración preferida, se usó el Mab SCC110 como anticuerpo de captura y SCC107 se usó como anticuerpo de detección.

25 El Mab SCC111 se biotiniló con éster caproato BiotinaNHRS (Sigma Chemical Co, EEUU) usando procedimientos estándar y se usó como anticuerpo de captura. El Mab SCC107 se conjugó con HRP, Tipo V (Sigma Chemical Co, EEUU), según una modificación del procedimiento de Nakone.

El Mab SCC111 biotinilado y el Mab SCC107 conjugado con HRP se usaron en EIA de dos sitios según el protocolo siguiente.

30 Procedimiento del ensayo:

1. Añadir 50 µL de antígeno SCCA recombinante (0-100 µg/L en PBS, 60 g/L BSA, pH 7,2) + 100 µL de Mab SCC111 Biotina, 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo a placas de microtitulación recubiertas con Estreptavidina, Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia).

2. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación

35 3. Lavar 3 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.

4. Añadir 100 µL Mab SCC107 HRP 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo.

5. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación.

6. Lavar 6 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.

7. Añadir 100 µL TMB, ELISA Technology, EEUU.

40 8. Incubar 30 min ± 5 min

9. Determinar DO 620 nm en lector ELISA.

Tomando como base las curvas dosis-respuesta para SCCA1 y SCCA2 se concluyó que el ensayo según el ejemplo 3.2.1 reconocía todas las formas de SCCA1 con una reacción cruzada de <5% para SCCA2.

3.2.2 Ensayos para SCCA1 "libre"

5 Los ensayos específicos para SCCA1 "libre", es decir, específicos para SCCA1 sin formar complejo sin reactividad significativa con SCCA1 en complejo o SCCA2 se diseñaron usando anticuerpos del Grupo B2 en combinación con anticuerpos del Grupo A1a. En la configuración preferida, el Mab SCCK134 se usó como anticuerpo de captura y el SCC107 se usó como anticuerpo de detección.

10 El Mab SCCK134 se biotiniló con éster caproato BiotinaNHRS (Sigma Chemical Co, EEUU) usando procedimientos estándar y se usó como anticuerpo de captura. El Mab SCC107 se conjugó con HRP, Tipo V (Sigma Chemical Co, EEUU), según una modificación del procedimiento de Nakone.

El Mab SCCK134 biotinilado y el Mab SCC107 conjugado con HRP se usaron en EIA de dos sitios según el protocolo siguiente.

Procedimiento del ensayo:

15 1. Añadir 50 µL de antígeno SCC recombinante (0-100 µg/L en PBS, 60 g/L BSA, pH 7,2) + 100 µL de Mab SCCK134 Biotina, 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo a placas de microtitulación recubiertas con Estreptavidina (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia).

2. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación

3. Lavar 3 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.

20 4. Añadir 100 µL Mab SCC107 HRP 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo.

5. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación.

6. Lavar 6 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.

7. Añadir 100 µL TMB, ELISA Technology, EEUU.

8. Incubar 30 min ± 5 min

25 9. Determinar DO 620 nm en lector ELISA.

Tomando como base las curvas dosis-respuesta para SCCA1 y SCCA2 se concluyó que el ensayo según el ejemplo 3.2.2 reconocía sólo SCCA1 "LIBRE" con una reacción cruzada de <5% para SCCA1 en complejo o SCCA2.

3.3 Ensayos para la determinación específica de SCCA2

3.3.1 Ensayos para la determinación de SCCA2 Total

30 Los ensayos específicos para SCCA2 total, es decir, SCCA2 libre y en complejo, sin reactividad significativa con SCCA1 se diseñaron usando anticuerpos de los Grupos C1a o C2a en combinación con anticuerpos del Grupo A1a. En la configuración preferida, se usó Mab SCC103 como anticuerpo de captura y SCC107 se usó como anticuerpo de detección.

35 El Mab SCC103 se biotiniló con éster caproato BiotinaNHRS (Sigma Chemical Co, EEUU) usando procedimientos estándar y se usó como anticuerpo de captura. El Mab SCC107 se conjugó con HRP, Tipo V (Sigma Chemical Co, EEUU), según una modificación del procedimiento de Nakone.

El Mab SCC103 biotinilado y el Mab SCC107 conjugado con HRP se usaron en EIA de dos sitios según el protocolo siguiente.

Procedimiento del ensayo:

40 1. Añadir 50 µL de antígeno SCC recombinante (0-100 µg/L en PBS, 60 g/L BSA, pH 7,2) + 100 µL de Mab SCC103 Biotina, 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo a placas de microtitulación recubiertas con Estreptavidina (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia).

2. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación
 3. Lavar 3 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.
 4. Añadir 100 µL Mab SCC107 HRP 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo.
 5. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación.
 - 5 6. Lavar 6 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.
 7. Añadir 100 µL TMB, ELISA Technology, EEUU.
 8. Incubar 30 min ± 5 min
 9. Determinar DO 620 nm en lector ELISA.
- Tomando como base las curvas dosis-respuesta para SCCA1 y SCCA2 se concluyó que el ensayo según el ejemplo 3.3.1 reconocía todas las formas de SCCA2 con una reacción cruzada de <5% para SCCA2.
- 3.3.2 Ensayos para SCCA2 "libre"
- Los ensayos específicos para SCCA2 "libre", es decir, SCCA2 sin formar complejo, sin reactividad significativa con complejo SCCA2-proteasa o SCCA1 se diseñaron usando anticuerpos del Grupo C2b en combinación con anticuerpos del Grupo A1a. En la configuración preferida, el Mab SCC104 se usó como anticuerpo de captura y el SCC107 se usó como anticuerpo de detección.
- 15 El Mab SCC104 se biotiniló con éster caproato BiotinaNHRS (Sigma Chemical Co, EEUU) usando procedimientos estándar y se usó como anticuerpo de captura. El Mab SCC107 se conjugó con HRP, Tipo V (Sigma Chemical Co, EEUU), según una modificación del procedimiento de Nakone.
- 20 El Mab SCC104 biotinilado y el Mab SCC107 conjugado con HRP se usaron en EIA de dos sitios según el protocolo siguiente.
- Procedimiento del ensayo:
1. Añadir 50 µL de antígeno SCC recombinante (0-100 µg/L en PBS, 60 g/L BSA, pH 7,2) + 100 µL de Mab SCC104 Biotina, 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo a placas de microtitulación recubiertas con Estreptavidina (Labsystems Oy, Helsinki, Finlandia).
 - 25 2. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación
 3. Lavar 3 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.
 4. Añadir 100 µL Mab SCC107 HRP 2 µg/mL, en Tampón de Ensayo.
 5. Incubar durante 1 h ± 10 min con agitación.
 6. Lavar 6 veces con tampón 5 mM Tris, 0,05% Tween 40, pH 7,75.
 - 30 7. Añadir 100 µL TMB, ELISA Technology, EEUU.
 8. Incubar 30 min ± 5 min
 9. DO 620 nm en lector ELISA.
- Tomando como base las curvas dosis-respuesta para SCCA1 y SCCA2 puede concluirse que el inmunoensayo según 3.3.2 reconocía sólo SCCA2 "libre" con una reacción cruzada de <5% para SCCA2 en complejo o SCCA1.
- 35 EJEMPLO 4
- Diagnóstico de cáncer usando inmunoensayos discriminatorios para SCCA "libre".
- Los inmunoensayos según el Ejemplo 3 se usaron para determinar diferentes formas de SCCA en individuos sanos y en pacientes con carcinoma de células escamosas.

Todos los ensayos mostraron discriminación entre los individuos sanos y los pacientes con cáncer como se esperaba. Sin embargo, la proporción discriminatoria entre los sujetos sanos y con cáncer fue mayor para los ensayos que determinan SCCA2, lo que se mejoró más por determinación de la proporción entre SCCA2 libre y en complejo y entre SCCA2 y SCCA1.

- 5 Las isoformas de SCCA se determinaron en 50 donantes de sangre y en 50 sujetos sanos con edades entre 50 y 65 años con el fin de determinar el nivel normal superior. Las isoformas de SCCA también se determinaron en los ensayos según el Ejemplo 3 en 94 muestras de mujeres diagnosticadas con cáncer del cuello del útero y en 20 individuos con cáncer de células escamosas de pulmón.

Ejemplo 4.1.

- 10 Los resultados para cáncer de células escamosas de pulmón se muestran en la Figura 2. SCCA1 estaba por encima del nivel normal superior en 14 pacientes mientras que SCCA2 estaba elevado en 18 pacientes. El nivel de SCCA2 también era relativamente mayor comparado con SCCA1 y así se mejora la discriminación entre sujetos sanos e individuos con enfermedad maligna.

Ejemplo 4.2. SCCA en cáncer del cuello del útero.

- 15 Los niveles de SCCA1 y SCCA2 en muestras preterapia de mujeres con cáncer del cuello del útero se muestran en las Figuras 7-10. SCCA2 estaba relativamente más elevado en la mayor parte de los casos comparado con SCCA1. Incrementando así la discriminación entre sujetos sanos e individuos con cáncer del cuello del útero.

Ejemplo 4.3 SCCA1 y SCCA2 en la monitorización de terapia de cáncer del cuello del útero.

- 20 SCCA1 y SCCA2 se determinaron usando los ensayos según el Ejemplo 3 en 6 pacientes durante la monitorización de la terapia. Tanto SCCA1 como SCCA2 siguieron el curso clínico de la enfermedad y detectaron enfermedad recurrente antes de la manifestación clínica de la enfermedad en 4/4 pacientes. Sin embargo, en los pacientes los incrementos relativos de SCCA2 fueron mayores comparados con SCCA1 proporcionando así una señal temprana de enfermedad recurrente. En el paciente con NED tanto SCCA1 como SCCA2 se normalizaron después de la terapia.

- 25 La enfermedad recurrente se detectó en el paciente 53 18 meses después de la terapia. La recurrencia se indicó por SCCA1 y SCCA2 elevados, pero SCCA2 respondió antes y mostró un nivel mayor como indicación de la recurrencia comparado con SCCA1.

En el paciente 29 la recurrencia se detectó clínicamente 16 meses después de la terapia, lo que se indicó por SCCA2 elevado desde los 8 meses después de la terapia, que fue 2-3 meses antes que SCCA1.

- 30 El paciente 83 mostró enfermedad progresiva 7 meses después de la terapia inicial. SCCA2 no se normalizó nunca, mientras que SCCA1 se normalizó 3 meses después de la terapia inicial y permaneció elevado marginalmente en el momento del diagnóstico clínico de enfermedad progresiva.

- 35 La enfermedad recurrente se diagnosticó clínicamente en el paciente 70 después de 13 meses. SCCA2 empezó a incrementarse entre 5-6 meses después de la terapia. SCCA1 también estaba ligeramente elevado 9 meses después de la terapia y después siguió el curso clínico. Sin embargo, SCCA2 indicó más claramente la enfermedad recurrente 5-7 meses antes del diagnóstico clínico.

Los niveles de SCCA2 nunca se normalizaron en el paciente 48 lo que sugiere la recurrencia y enfermedad progresiva ya 2 meses después de la terapia. SCCA1 estaba en el nivel normal superior hasta 5 meses después de la terapia antes de incrementarse.

- 40 El paciente 45 respondió al tratamiento y no se observó ninguna evidencia de enfermedad después de la terapia. Esto se indicó tanto por SCCA1 como SCCA2 ya que los niveles se normalizaron y permanecieron en el intervalo normal.

Tanto SCCA1 como SCCA2 siguieron el curso clínico de la enfermedad. Sin embargo, SCCA2 proporcionó una respuesta más temprana y más definida de enfermedad recurrente comparado con SCCA1.

Leyendas de las Figuras

FIG.1 En los seres humanos las serpinas se localizan en uno de dos grupos cromosómicos. *PI6*, *PI9* y *ELNAH2* se localizan en 6p25, mientras que *PI8*, *Bomapina*, *PAI2*, *SCCA1*, *SCCA2*, *Headpin* y *Maspina* se localizan en 18q21.3

FIG. 2-3 muestran los bucles de sitio reactivo de *SCCA1* y *SCCA2*

5 FIG.4 muestra la reactividad relativa de los Mab de SCC

FIG. 5 muestra la reactividad relativa de los Mab de SCC unidos en complejo

FIG. 6 muestra la reactividad relativa de los Mab de SCC "libres"

FIG. 7 muestra *SCCA1* y *SCCA2* en 20 muestras de cáncer de Células Escamosas de Pulmón, enfermedad limitada.

Las barras indican el nivel de referencia superior de *SCCA1* y *SCCA2* respectivamente.

10 FIG. 8. *SCCA1* y *SCCA2* en cáncer del cuello del útero de Estadío I.

Las barras indican el nivel de referencia superior de *SCCA1* y *SCCA2* respectivamente.

FIG. 9. *SCCA1* y *SCCA2* en cáncer del cuello del útero de Estadío II.

Las barras indican el nivel de referencia superior de *SCCA1* y *SCCA2* respectivamente.

FIG. 10. *SCCA1* y *SCCA2* en cáncer del cuello del útero de Estadío III-IV.

15 Las barras indican los niveles normales superiores.

REFERENCIAS

1. Kato, H. (1992) en *Serological Cancer Markers*, ed. Sell, S. (The Humana Press, Totowa, NJ), p. 437-451.
2. Yamawaki, T., Takeshima, N., Shimizu, Y., Teshima, H. & Hasumi, K. (1996) *J Obstet Gynaecol Res* **22**, 341-6.
3. Kato, H. & Torigoe, T. (1977) *Cancer* **40**, 1621-8.
4. Kato, H., Nagaya, T. & Torigoe, T. (1984) *Gann* **75**, 433-5.
5. Suminami, Y., Nawata, S. & Kato, H. (1998) *Tumour Biol* **19**, 488-93.
6. Suminami, Y., Kishi, F., Sekiguchi, K. & Kato, H. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **181**, 51-8.
7. Schneider, S. S., Schick, C., Fish, K. E., Miller, E., Pena, J. C., Treter, S. D., Hui, S. M. & Silverman, G. A. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3147-51.
8. Bartuski, A. J., Kamachi, Y., Schick, C., Overhauser, J. & Silverman, G. A. (1997) *Genomics* **43**, 321-8.
9. Scott, F. L., Eyre, H. J., Lioumi, M., Ragoussis, J., Irving, J. A., Sutherland, G. A. & Bird, P. I. (1999) *Genomics* **62**, 490-9.
10. Abts, H. F., Welss, T., Mirmohammadsadegh, A., Kohrer, K., Michel, G. & Ruzicka, T. (1999) *J Mol Biol* **293**, 29-39.
11. Spring, P., Nakashima, T., Frederick, M., Henderson, Y. & Clayman, G. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* **264**, 299-304.
12. Nakashimaa, T., Pakb, S. C., Silvermanb, G. A., Springa, P. M., Fredericka, M. J. & Claymana, G. L. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1492**, 441-446.
13. Silverman, G. A., Bartuski, A. J., Cataltepe, S., Gornstein, E. R., Kamachi, Y., Schick, C. & Uemura, Y. (1998) *Tumour Biol* **19**, 480-7.
14. Katz, S. G., Schneider, S. S., Bartuski, A., Trask, B. J., Massa, H., Overhauser, J., Lalande, M., Lansdorp, P. M. & Silverman, G. A. (1999) *Hum Mol Genet* **8**, 87-92.
15. Gotte, K., Riedel, F., Coy, J. F., Spahn, V. & Hormann, K. (2000) *Oral Oncol* **36**, 360-364.
16. Takebayashi, S., Ogawa, T., Jung, K. Y., Muallem, A., Mineta, H., Fisher, S. G., Grenman, R. & Carey, T. E. (2000) *Cancer Res* **60**, 3397-403.
17. Carrell, R. W. & Evans, D. L. I. (1992) *Current Opinion in Structural Biology* **2**, 438-446.
18. Potempa, J., Korzus, E. & Travis, J. (1994) *J Biol Chem* **269**, 15957-60.
19. Wright, H. T. (1996) *Bioessays* **18**, 453-64.
20. Bird, P. I. (1998) *Results Probl Cell Differ* **24**, 63-89.

21. Bird, C. H., Sutton, V. R., Sun, J., Hirst, C. E., Novak, A., Kumar, S., Trapani, J. A. & Bird, P. I. (1998) *Mol Cell Biol* **18**, 6387-98.
22. Van Patten, S. M., Hanson, E., Bernasconi, R., Zhang, K., Manavalan, P., Cole, E. S., McPherson, J. M. & Edmunds, T. (1999) *J Biol Chem* **274**, 10268-76.
23. Worrall, D. M., Blacque, O. E. & Barnes, R. C. (1999) *Biochem Soc Trans* **27**, 746-50.
24. Sim, R. B. & Laich, A. (2000) *Biochem Soc Trans* **28**, 545-550.
25. Takeda, A., Yamamoto, T., Nakamura, Y., Takahashi, T. & Hibino, T. (1995) *FEBS Lett* **359**, 78-80.
26. Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A. J., Gornstein, E. R., Bromme, D., Chapman, H. A. & Silverman, G. A. (1998) *Biochemistry* **37**, 5258-66.
27. Schick, C., Kamachi, Y., Bartuski, A. J., Cataltepe, S., Schechter, N. M., Pemberton, P. A. & Silverman, G. A. (1997) *J Biol Chem* **272**, 1849-55.
28. Schick, C., Bromme, D., Bartuski, A. J., Uemura, Y., Schechter, N. M. & Silverman, G. A. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13465-70.
29. Luke, C., Schick, C., Tsu, C., Whisstock, J. C., Irving, J. A., Bromme, D., Juliano, L., Shi, G. P., Chapman, H. A. & Silverman, G. A. (2000) *Biochemistry* **39**, 7081-91.
30. Suminami, Y., Nagashima, S., Vujanovic, N. L., Hirabayashi, K., Kato, H. & Whiteside, T. L. (2000) *Br J Cancer* **82**, 981-9.
31. Cataltepe, S., Gornstein, E. R., Schick, C., Kamachi, Y., Chatson, K., Fries, J., Silverman, G. A. & Upton, M. P. (2000) *J Histochem Cytochem* **48**, 113-22.
32. Kato, H., Suehiro, Y., Morioka, H., Torigoe, T., Myoga, A., Sekiguchi, K. & Ikeda, I. (1987) *Jpn J Cancer Res* **78**, 1246-50.
33. Cataltepe, S., Schick, C., Luke, C. J., Pak, S. C., Goldfarb, D., Chen, P., Tanasiyevic, M. J., Posner, M. R. & Silverman, G. A. (2000) *Clin Chim Acta* **295**, 107-27.
34. Uemura, Y., Pak, S. C., Luke, C., Cataltepe, S., Tsu, C., Schick, C., Kamachi, Y., Pomeroy, S. L., Perlmutter, D. H. & Silverman, G. A. (2000) *Int J Cancer* **89**, 368-77.
35. Murakami, A., Suminami, Y., Sakaguchi, Y., Nawata, S., Numa, F., Kishi, F. & Kato, H. (2000) *Tumour Biol* **21**, 224-34.
36. Hamakawa, H., Fukizumi, M., Bao, Y., Sumida, T., Onishi, A., Tanioka, H., Sato, H. & Yumoto, E. (1999) *Clin Exp Metastasis* **17**, 593-9.
37. Stenman, J., Lintula, S., Hotakainen, K., Vartiainen, J., Lehvaslaiho, H. & Stenman, U. H. (1997) *Int J Cancer* **74**, 75-80.
38. Crombach, G., Scharl, A., Vierbuchen, M., Wurz, H. & Bolte, A. (1989) *Cancer* **63**, 1337-42.
39. Brioschi, P. A., Bischof, P., Delafosse, C. & Krauer, F. (1991) *Int J Cancer* **47**, 376-9.

40. Duk, J. M., Groenier, K. H., de Bruijn, H. W., Hollema, H., ten Hoor, K. A., van der Zee, A. G. & Aalders, J. G. (1996) *J Clin Oncol* **14**, 111-8.
41. de Bruijn, H. W., Duk, J. M., van der Zee, A. G., Pras, E., Willemse, P. H., Boonstra, H., Hollema, H., Mourits, M. J., de Vries, E. G. & Aalders, J. G. (1998) *Tumour Biol* **19**, 505-16.
42. Tabata, T., Takeshima, N., Tanaka, N., Hirai, Y. & Hasumi, K. (2000) *Tumour Biol* **21**, 375-80.
43. Gaarenstroom, K. N., Kenter, G. G., Bonfrer, J. M., Korse, C. M., Van de Vijver, M. J., Fleuren, G. J. & Trimbos, J. B. (2000) *Gynecol Oncol* **77**, 164-70.
44. Mino, N., Iio, A. & Hamamoto, K. (1988) *Cancer* **62**, 730-4.
45. Snyderman, C. H., D'Amico, F., Wagner, R. & Eibling, D. E. (1995) *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **121**, 1294-7.
46. Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
47. Lindholm, L., Holmgren, J., Svennerholm, L., Fredman, P., Nilsson, O., Persson, B., Myrvold, H. & Lagergard, T. (1983) *Int Arch Allergy Appl Immunol* **71**, 178-81.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal **caracterizado porque** se une selectivamente sólo a moléculas del antígeno 2 de carcinoma de células escamosas (SCCA2), excluyendo las moléculas de SCCA2 en complejo, con una reactividad cruzada de <5% para SCCA2 en complejo o moléculas del antígeno 1 de carcinoma de células escamosas (SCCA1), para uso en la detección de carcinoma de células escamosas o enfermedad recurrente de carcinoma de células escamosas.
2. Un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se ha producido por células de hibridoma, obteniéndose dichas células de hibridoma de células del bazo de un mamífero que se han fusionado con células de mieloma.
- 10 3. Un método *in vitro* para detectar moléculas de SCCA2 en una muestra, **caracterizado porque**
- anticuerpos monoclonales según las reivindicaciones 1 y/o 2 que se unen selectivamente sólo a moléculas de SCCA2 libres se ponen en contacto en una muestra; y
 - se compara el nivel de unión de dichos anticuerpos monoclonales en dicha muestra con el nivel de unión de los mismos anticuerpos monoclonales en una muestra normal; y
- 15 - un nivel incrementado de unión de los anticuerpos monoclonales en la muestra comparado con el nivel de unión de los mismos anticuerpos monoclonales en la muestra normal indica una presencia de cáncer de células escamosas o cáncer recurrente de células escamosas en la muestra.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que el cáncer de células escamosas es cáncer de células escamosas del cuello del útero.
- 20 5. Un método según la reivindicación 3, en el que el cáncer de células escamosas es cáncer de células escamosas de pulmón.
6. Un método según la reivindicación 3, en el que el cáncer de células escamosas es cáncer de células escamosas del útero.
- 25 7. Un método según la reivindicación 3, en el que el cáncer de células escamosas es cáncer de células escamosas del esófago.
8. Un método según la reivindicación 3, en el que el cáncer de células escamosas es cáncer de células escamosas de cabeza y cuello.
9. Un método según la reivindicación 3, en el que el cáncer de células escamosas es cáncer de células escamosas de la vulva.
- 30 10. Uso del anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1 y/o 2 para la detección *in vitro* de moléculas de SCCA2 en una muestra.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que la muestra es cáncer de células escamosas del cuello del útero.
12. Uso según la reivindicación 10, en el que la muestra es cáncer de células escamosas de pulmón.
13. Uso según la reivindicación 10, en el que la muestra es cáncer de células escamosas del útero.
- 35 14. Uso según la reivindicación 10, en el que la muestra es cáncer de células escamosas del esófago.
15. Uso según la reivindicación 10, en el que la muestra es cáncer de células escamosas de cabeza y cuello.
16. Uso según la reivindicación 10, en el que la muestra es cáncer de células escamosas de la vulva.
17. Uso del anticuerpo monoclonal según las reivindicaciones 1-2 para la preparación de un agente de diagnóstico para la detección *in vitro* de moléculas de SCCA2 en una muestra.

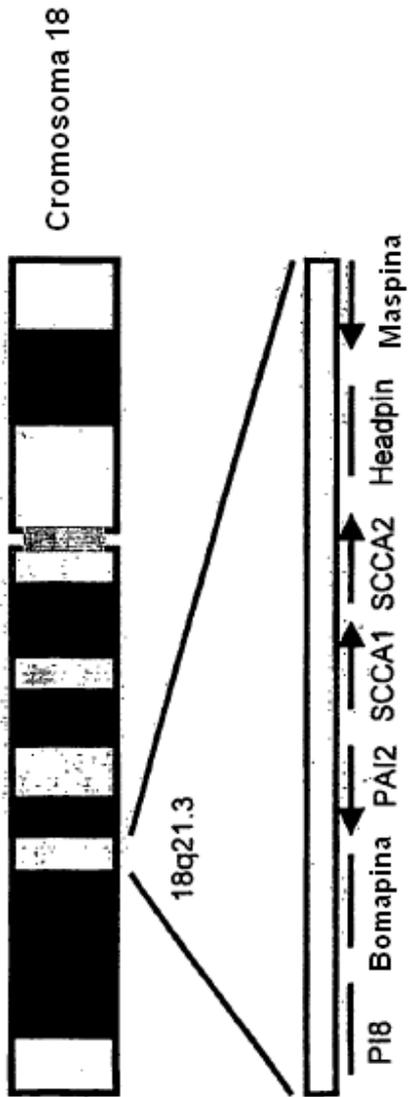


Fig.1

SCCA1 11-ATGAATTCAC TCAGTGAAGC CAACACCAAG TTCATGTTCC ACCTGTTCCA ACAGTTCAGA
 SCCA2 11-ATGAATTCAC TCAGTGAAGC CAACACCAAG TTCATGTTCC ATCTGTTCCA ACAGTTCAGA

 AAATCAAAG AGAACAACAT CTTCTATTCC CCTATCAGCA TCACATCAGC ATTAGGGATG
 AAATCAAAG AGAACAACAT CTTCTATTCC CCTATCAGCA TCACATCAGC ATTAGGGATG

 GTCCTCTTAG GAGCCAAAGA CAACACTGCA CAACAGATTA AGAAG-12-GTTCT TCACTTTGAT
 GTCCTCTTAG GAGCCAAAGA CAACACTGCA CAACAAATTA GCAAG-12-GTTCT TCACTTTGAT

 CAAGTCACAG AGAACACCAC AGGAAAAGCT GCAACATATC AT-13-GTTGATAG GTCAGGAAAT
 CAAGTCACAG AGAACACCAC AGGAAAAGCT GCAACATATC AT-13-GTTGATAG GTCAGGAAAT

 GTTCATCACC AGTTTCAAAA GCTTCTGACT GAATTCACCA AATCCACTGA TGCATATGAG
 GTTCATCACC AGTTTCAAAA GCTTCTGACT GAATTCACCA AATCCACTGA TGCATATGAG

 CTGAAGATCG CCAACAAGCT CTTCCGAGAA AAACCGTATC TATTTTTACA G-14-GAATATTTA
 CTGAAGATCG CCAACAAGCT CTTCCGAGAA AAACCGTATC TATTTTTACA G-14-GAATATTTA

 GATGCCATCA AGAAATTTTA CCAGACCAGT GTGGAATCTG TTGATTTTGC AAATGCTCCA
 GATGCCATCA AGAAATTTTA CCAGACCAGT GTGGAATCTA CTGATTTTGC AAATGCTCCA

 GAAGAAAGTC GAAAGAAGAT TAACCTCTGG GTGGAAAGTC AAACGAATG-15-AAAAAATTAA
 GAAGAAAGTC GAAAGAAGAT TAACCTCTGG GTGGAAAGTC AAACGAATG-15-AAAAAATTAA

 AACCTAATTC CTGAAGGTAA TATTGGCAGC AATACCACAT TGGTCTTGT GAACGCAATC
 AACCTAATTC CTGATGGGAC TATTGGCAAT GATACGACAC TGGTCTTGT GAACGCAATC

 TATTTCAAAG GGCAGTGGGA GAAGAAATTT AATAAAGAAG AACTAAAGA GGAAAAATTT
 TATTTCAAAG GGCAGTGGGA GAATAAATTT AAAAAAGAAA AACTAAAGA GGAAAAATTT

 TGGCCAAACA AG-16-AATACATA CAAGTCCATA CAGATGATGA GGCARTACAC ATCTTTTCAT
 TGGCCAAACA AG-16-AATACATA CAATCTGTA CAGATGATGA GGCARTACAA TTCCTTTAAT

 TTTGCCTCGC TGGAGGATGT ACAGGCCAAG GTCTTGAAA TACCATACAA AGGCAAAGAT
 TTTGCCTTGC TGGAGGATGT ACAGGCCAAG GTCTTGAAA TACCATACAA AGGCAAAGAT

 CTAAGCATGA TTGTGTGCT GCCAAATGAA ATCGATGGTC TCAGAG-17-CTGAAGAGAAA
 CTAAGCATGA TTGTGCTGCT GCCAAATGAA ATCGATGGTC TCAGAG-17-CTGAAGAGAAA

 CTCACTGCTG AGAAATTGAT GGAATGGACA AGTTTGAGA ATATGAGAGA GACACGTGTC
 CTCACTGCTG AGAAATTGAT GGAATGGACA AGTTTGAGA ATATGAGAGA GACATGTGTC

 GATTTACACT TACCTCGGTT CAAAGTGGAA GAGAGCTATG ACCTCAAGGA CACGTTGAGA
 GATTTACACT TACCTCGGTT CAAATGGAA GAGAGCTATG ACCTCAAGGA CACGTTGAGA

 ACCATGGGAA TGGTGAATAT CTTCAATGGG GATGCAGACC TCTCAGGCAT GACCTGGAGC
 ACCATGGGAA TGGTGAATAT CTTCAATGGG GATGCAGACC TCTCAGGCAT GACCTGGAGC

 CGCGGTCTCG TGCTATCTGG AGTCCTACAC AAGGCCTTTG TGGAGGTAC AGAGGAGGGA
 CACGGTCTCT CAGTATCTAA AGTCCTACAC AAGGCCTTTG TGGAGGTAC TGAGGAGGGA

~~GCAGAAGCTG CAGCTGCCAC CCCTGTAGTA GATTCGGAT CATCAGCTAC TTCAACTAAT~~
~~GTGGAAGCTG CAGCTGCCAC CCCTGTAGTA GATTCGGAT TATCATCTCC TTCAACTAAT~~

Fig.2

SCCA1 MNSLSEANTK FMFDLFOQFR KSKENNIFYS PISITSALGM VLLGAKDNTA
 SCCA2 MNSLSEANTK FMFDLFOQFR KSKENNIFYS PISITSALGM VLLGAKDNTA

 QQIKKVLHFD QVTENTTGKA ATYHVDRSGN VHHQFQKLLT EFNKSTDAYE
 QQISKVLHFD QVTENTTEKA ATYHVDRSGN VHHQFQKLLT EFNKSTDAYE

 LKIANKLFGE KTYLFLQEYL DAIKKFYQTS VESVDFANAP EESRKKINSW
 LKIANKLFGE KTYQFLQEYL DAIKKFYQTS VESTDFANAP EESRKKINSW

 VESQTNKIK NLIPEGNIGS NITLVLVNAI YFKGQWKKF NKEDTKEEKF
 VESQTNKIK NLFPDGTIGN DITLVLVNAI YFKGQWKKF KKENTKEEKF

 WPNKNTYKSI QMMRQYTSFH FASLEDVQAK VLEIPYKGD LSMIVLLPNE
 WPNKNTYKSV QMMRQYNSFN FALLEDVQAK VLEIPYKGD LSMIVLLPNE

 IDGLQKLEEK LTAEKLMWNT SLQNMRETRV DLHLPRFKVE ESYDLKDTLR
 IDGLQKLEEK LTAEKLMWNT SLQNMRETCV DLHLPRFKME ESYDLKDTLR

 TMGMVDIFNG DADLSGMTGS RGLVLSGVLH KAFVEVTEEG AEAATAATAVY
 TMGMVNIFNG DADLSGMTWS HGLSVSKVLH KAFVEVTEEG VEATAATAVY

GFGSSPASIN EEFECNHPFL FFIRQNKINS ILFYGRFSSP
VVELSSPSIN EEFCCNHPFL FFIRQNKINS ILFYGRFSSP

Fig.3

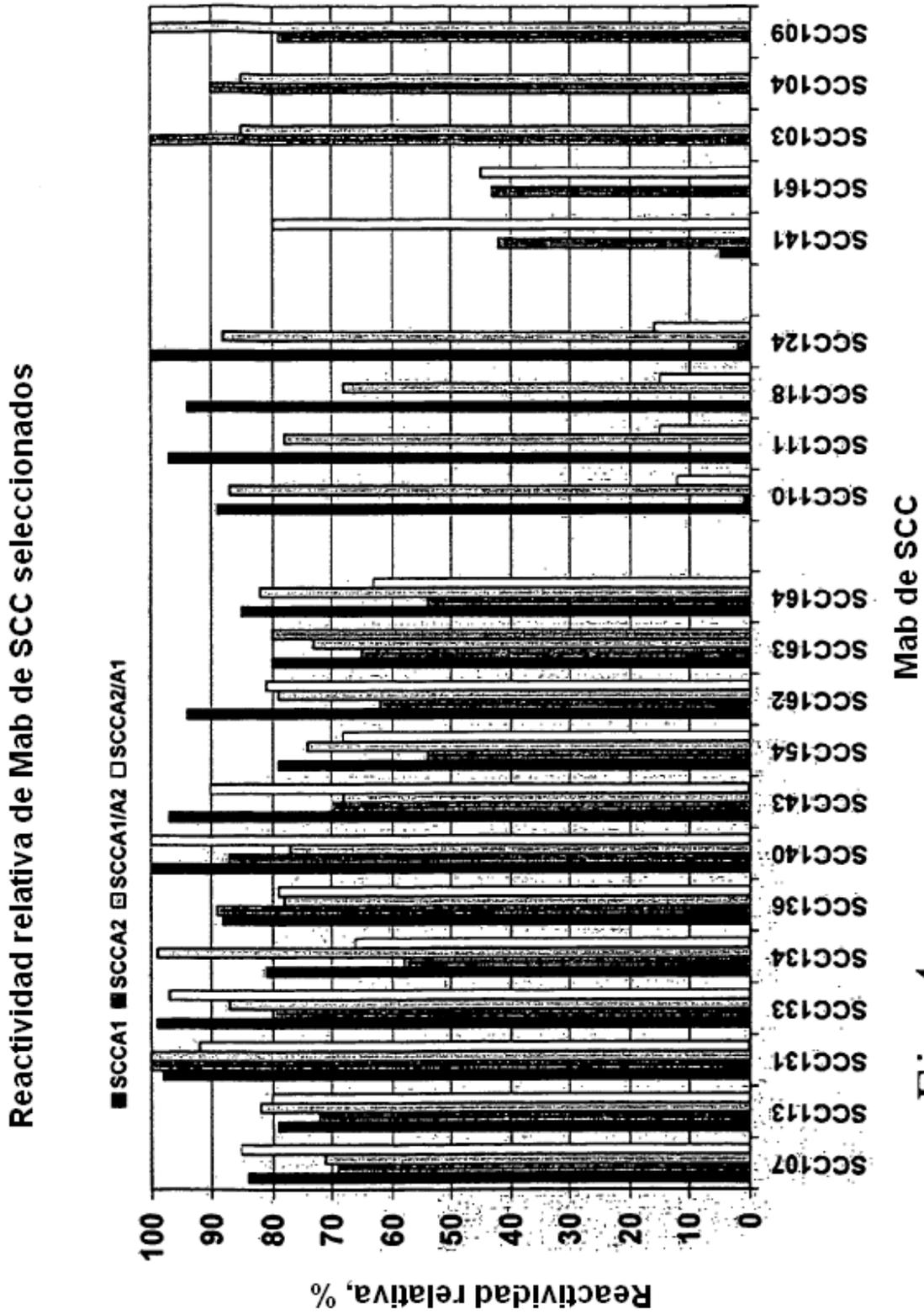


Fig.4

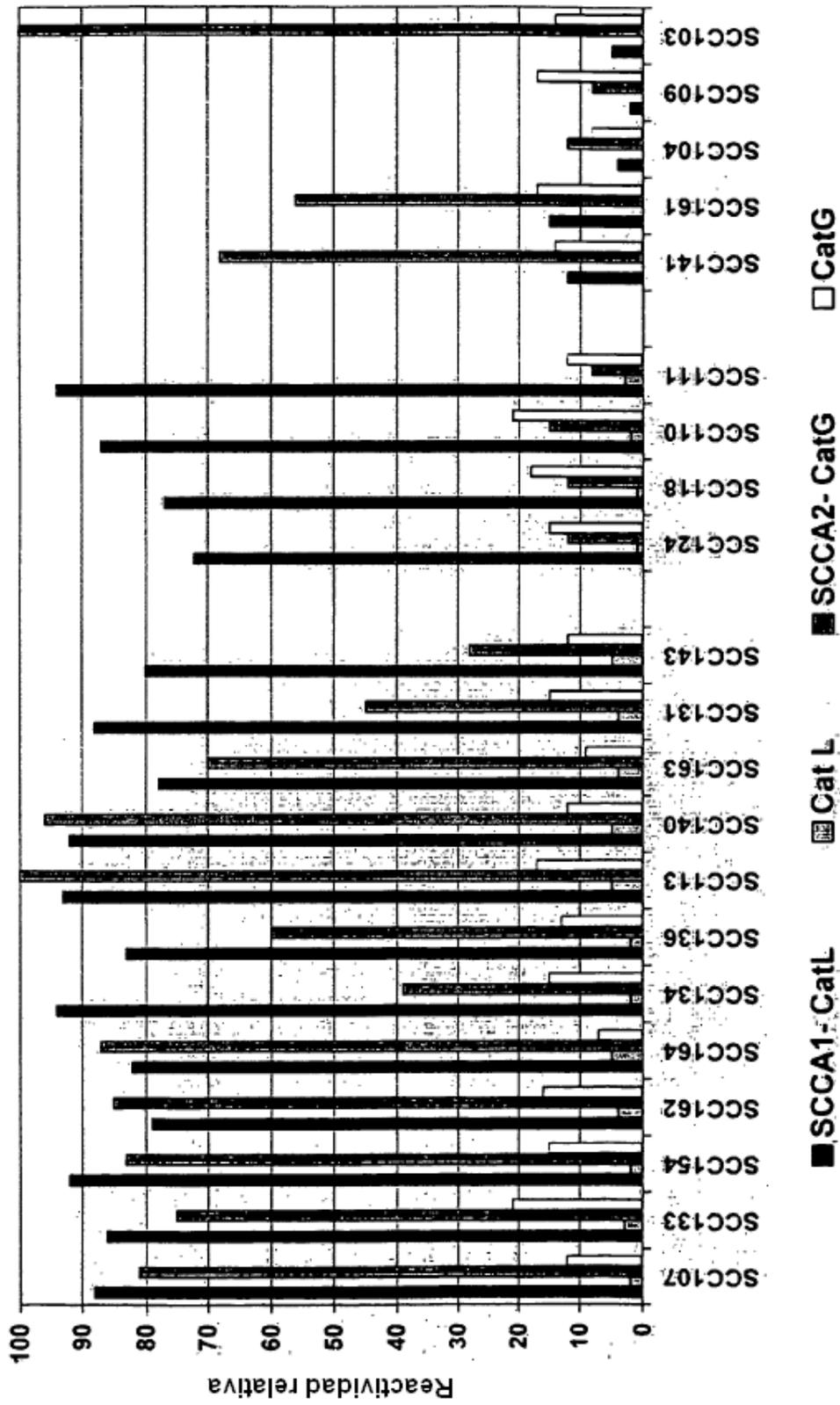


Fig.5

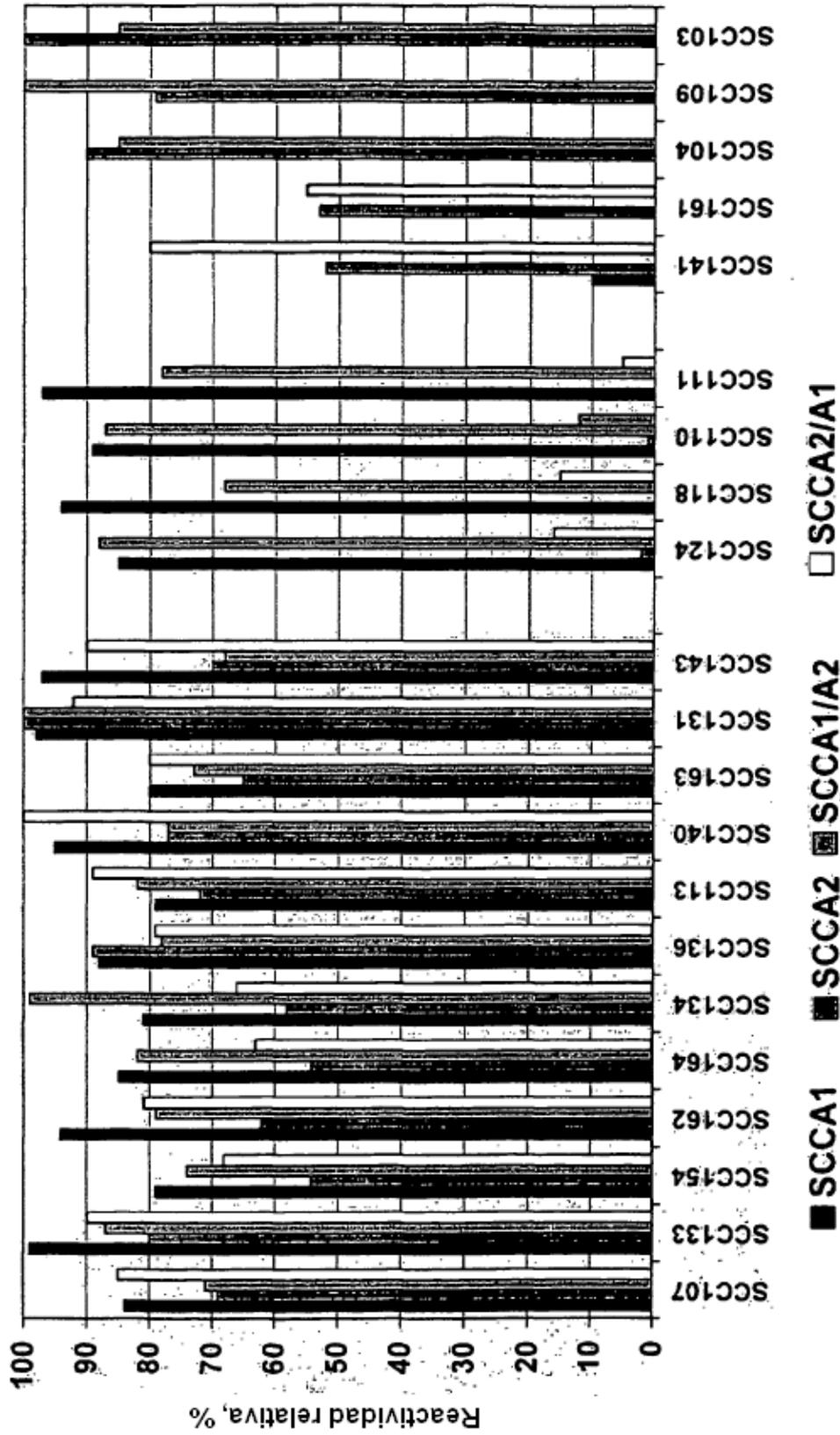
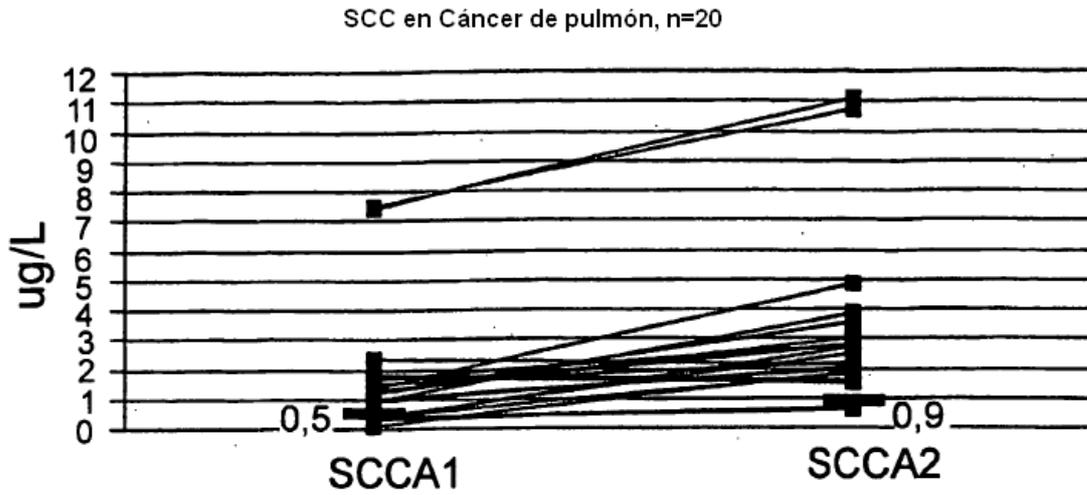
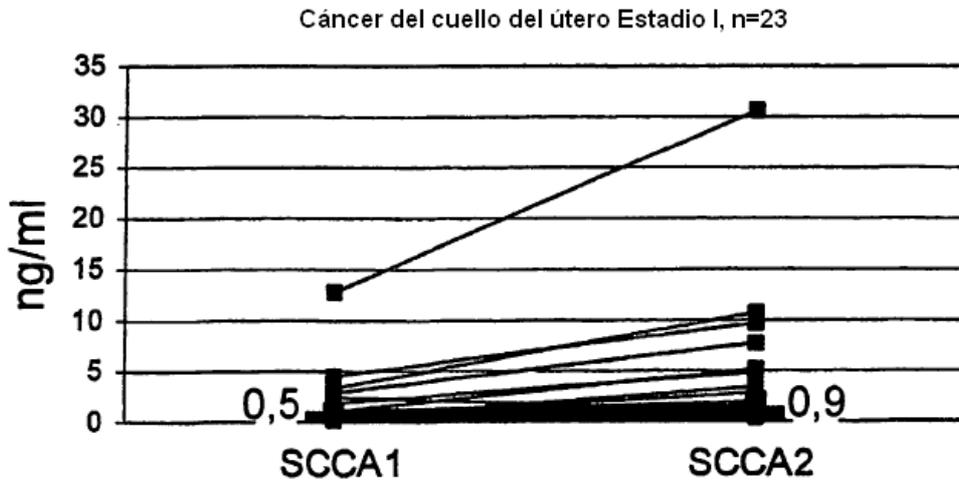


Fig.6



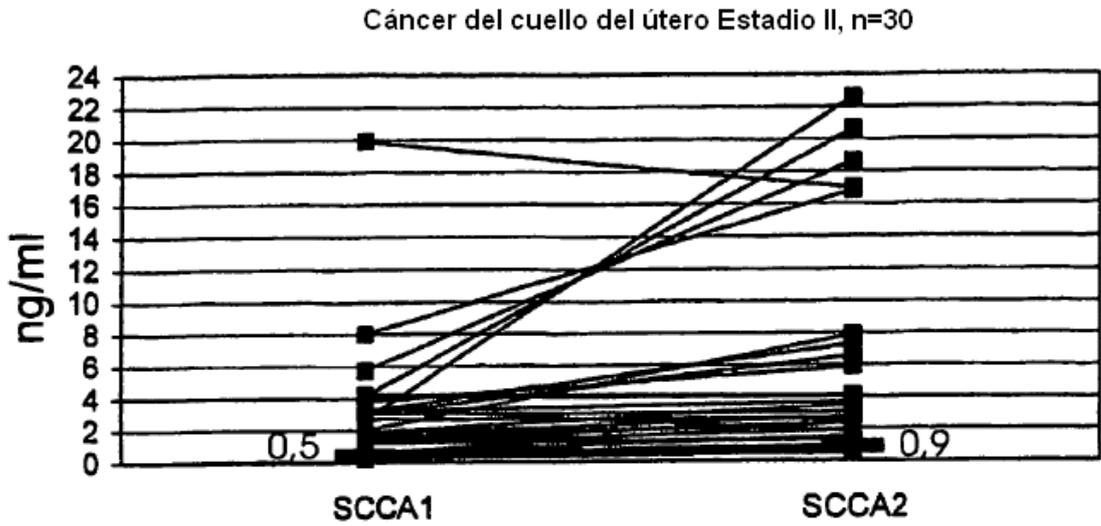
SCCA1 y SCCA2 en 20 muestras de cáncer de Células Escamosas de Pulmón, enfermedad limitada. Las barras indican el nivel de referencia superior de SCCA1 y SCCA2 respectivamente.

Fig.7



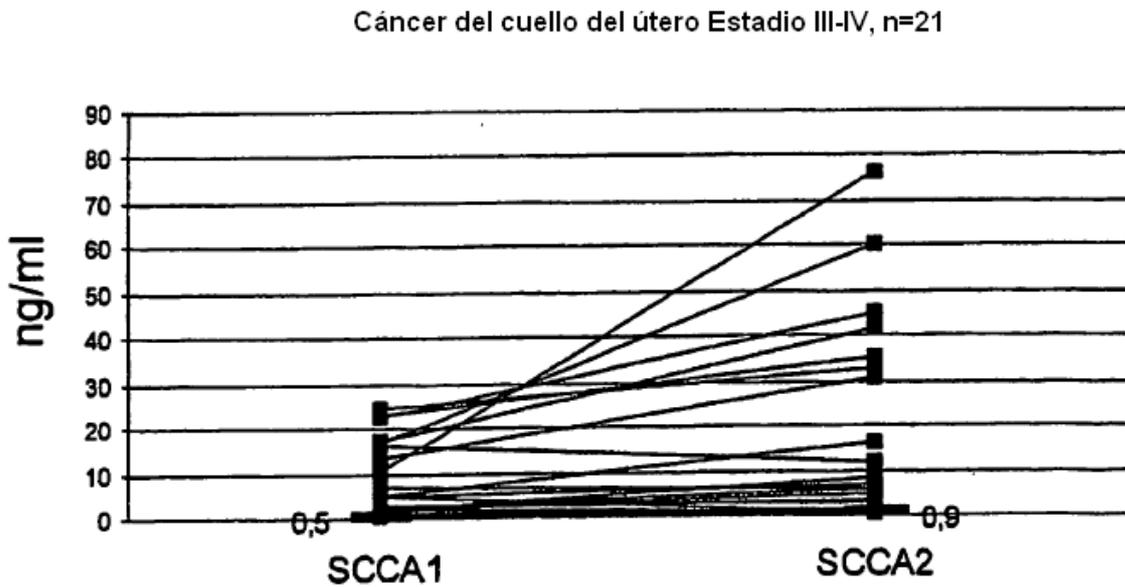
SCCA1 y SCCA2 en cáncer del cuello del útero Estadio I. Las barras indican el nivel de referencia superior de SCCA1 y SCCA2 respectivamente.

Fig.8



SCCA1 y SCCA2 en cáncer del cuello del útero Estadio II. Las barras indican el nivel de referencia superior de SCCA1 y SCCA2 respectivamente.

Fig.9



SCCA1 y SCCA2 en cáncer del cuello del útero Estadio III. Las barras indican los niveles normales superiores.

Fig.10