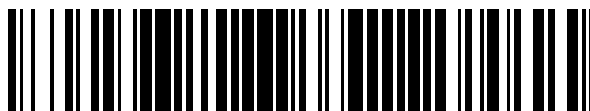


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 407**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04790451 .1**
96 Fecha de presentación: **15.10.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1676135**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.07.2006**

54 Título: **Utilización de la proteína ASC como marcador para cáncer de seno**

30 Prioridad:
15.10.2003 EP 03023507

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.03.2012

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

72 Inventor/es:
**PESTLIN, Gabriele;
ANDRES, Herbert;
BERNDT, Peter;
HAGMANN, Marie-Luise;
KARL, Johann;
LANGEN, Hanno y
ZOLG, Werner**

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 377 407 T3

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

DESCRIPCIÓN

Utilización de la proteína ASC como marcador para cáncer de seno

5 La presente invención se refiere al diagnóstico de cáncer de seno. Da a conocer la utilización de una proteína tipo mancha ("speck-like") asociada a apoptosis, que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa (= ASC) en el diagnóstico de cáncer de seno. Además, se refiere, en especial, a un método para el diagnóstico de cáncer de seno a partir de una muestra de líquido, derivada de un individuo para la medición de ASC en dicha muestra. La medición de ASC puede ser utilizada en la detección precoz o diagnóstico de cáncer de seno.

10 El cáncer sigue siendo un importante reto para la salud pública, a pesar de los avances en la detección y en la terapia. Entre los diferentes tipos de cáncer, el cáncer de seno (=BC) es uno de los cánceres más frecuentes entre las mujeres del mundo occidental.

15 Cuando más pronto se pueda detectar/diagnosticar, mejor es la tasa general de supervivencia. Esto es especialmente cierto para BC. El pronóstico en etapas avanzadas del tumor es poco satisfactorio. Más de un tercio de los pacientes morirá a pesar de la avance de la enfermedad dentro de los cinco años después del diagnóstico, correspondiendo a una tasa de supervivencia de aproximadamente 40% para cinco años. El tratamiento actual cura solamente una fracción de los pacientes y, de manera clara, tiene los mejores efectos en los pacientes diagnosticados en una etapa precoz de la enfermedad.

Con respecto a BC como problema de salud pública, es esencial que se desarrollen medidas más efectivas de detección y medidas preventivas, para el cáncer de seno.

25 Los procedimientos de detección más precoces, actualmente disponibles para el cáncer de seno comportan la utilización de exámenes clínicos de los senos y la mamografía. No obstante, debe existir un tamaño significativo del tumor antes de que pueda ser palpable o pueda ser detectado por una mamografía. La densidad de los tejidos del seno y la edad son importantes elementos de predicción de la exactitud de la mamografía. Las tasas de sensibilidad oscilan entre el 63 % en mujeres con senos extremadamente densos hasta 87 % en mujeres con senos casi enteramente grasos. La sensibilidad aumenta con la edad, desde 69% en mujeres de unos 40 años hasta 83% en mujeres de 80 años y más (Carney, P.A., y otros, Ann. Intern. Med. 138 (3) (2003) 168-175). Solamente, el 20-25% de las anomalías detectadas mamográficamente, que son objeto de biopsia, llegan a ser malignas. La visualización de lesiones precancerosas y cancerosas representa el mejor enfoque para la detección precoz, pero la mamografía es una prueba costosa que requiere gran cuidado y experiencia, tanto para llevarla a cabo como para la interpretación de los resultados (WHO, Screening for Breast Cancer, May 10, 2002; Esserman, L., y otros, J. Natl. Cancer Inst. 94 (2002) 369-375).

40 En estos últimos años, se ha informado sobre una gran cantidad de los llamados genes específicos para senos, o incluso llamados específicos para cáncer de senos. La inmensa mayoría de los documentos de investigación correspondientes o solicitudes de patentes se basan en datos obtenidos por análisis de modelos de expresión de ARN en tejidos de seno (cáncer), en comparación con un tejido distinto o a un tejido normal adyacente, respectivamente. Estos enfoques se pueden resumir como técnicas de visualización diferencial de mARN.

45 Como ejemplo de los datos disponibles de las técnicas de visualización de mARN, el documento WO 00/60076 se mencionará y se explicará. Esta solicitud de patente describe y reivindica más de doscientos polinucleótidos aislados, y los correspondientes polipéptidos así como, su utilización en la detección de BC. No obstante, es conocimiento general que las diferencias en el nivel de mARN no se reflejan por el nivel de las proteínas correspondientes. Una proteína codificada por un mARN raro puede ser encontrada en cantidades muy grandes, y una proteína codificada por un mARN abundante puede ser, no obstante, difícil de detectar y encontrar en absoluto (Chen, G., y otros, Molecular and Cellular Proteomics, 1.4 (2002) 304-313). Esta falta de correlación entre el nivel de mARN y el nivel de la proteína es debido a razones tales como la estabilidad de mARN, la eficiencia de la traducción, la estabilidad de la proteína, etc.

55 El documento WO 01/29235 da a conocer que TMS1 es un nuevo gen regulador apoptótico que es silenciado como resultado de una metilación anormal.

60 Zhang, H., y otros han analizado la expresión de la proteína de cáncer 3 amplificada en un seno (AIB3, conocida también como ASC-2, RPA250, PRIP, TRBP y (CNR) en ratones (Zhang, H., y otros, Endocrinology 144(4):1435-1443). Sus mediciones cuantitativas han revelado que las concentraciones de AIB3 mARN difieren sustancialmente en diferentes tejidos, en orden descendente de los siguientes: testículos, cerebro, timo, grasa blanca, pituitaria, ovario, glándulas adrenales, pulmón, útero, riñón, corazón, músculos esqueléticos, hígado, y glándulas mamarias vírgenes.

65 Han existido también enfoques recientes investigando las diferencias de modelos de proteína entre diferentes tejidos o entre tejidos sanos y enfermos, a efectos de identificar moléculas marcadoras candidato que puedan ser utilizadas en el diagnóstico de BC. Wulfkühle y otros. Cancer Research 62 (2002) 6740-6749 han identificado cincuenta y

siete proteínas que fueron expresadas de manera diferencial entre tejidos de BC y tejidos normales adyacentes. No se informó de datos sobre muestras de líquidos obtenidas a partir de un individuo.

5 El documento WO 02/23200 da a conocer aproximadamente doce puntos asociados con cáncer de seno, por desabsorción láser e ionización con amplificación superficial (SELDI). Estos puntos son apreciados más frecuentemente en sueros obtenidos a partir de pacientes con BC, en comparación con los sueros obtenidos a partir de controles sanos. No obstante, la identidad de la molécula o moléculas comprendidas en dicho punto, por ejemplo, su secuencia, no es conocida.

10 El líquido aspirado de los pezones (NAF) como método potencial no invasivo se ha utilizado durante muchos años, para identificar marcadores específicos para el cáncer de seno. Kuerer y otros compararon fluidos aspirados de un par de pezones, compensados bilateralmente, de mujeres con carcinoma de seno invasivo unilateral por electroforesis de gel 2D (Kuerer, H.M., y otros, Cancer 95 (2002) 2276-2282). Se detectaron de 30 a 202 puntos de diferentes proteínas en el NAF de senos afectados de carcinoma de seno y no en el NAF equilibrado de senos sanos. Estos puntos fueron detectados por el análisis de una imagen de gel. Sin embargo, la identidad de los puntos de proteína no es conocida.

20 A pesar de la larga y creciente lista de proteínas candidatas a marcadores en el sector del cáncer de seno (BC), hasta la actualidad, la utilidad clínica de diagnóstico de estas moléculas no es conocida. Para que sea utilidad clínica un nuevo marcador diagnóstico, un marcador único debe ser, como mínimo, tan satisfactorio como el mejor marcador individual conocido en la técnica. Es decir, un nuevo marcador debe conducir a un avance en la sensibilidad del diagnóstico y/o a la especificidad utilizado solo o en combinación con uno u otros varios marcadores, respectivamente. La sensibilidad al diagnóstico y/o especificidad de una prueba es mejor evaluada por sus características de receptor-operativas, que se describirán en detalle más adelante.

25 En la actualidad, solamente se disponen, para ayudar al diagnóstico en el sector BC, pruebas de sangre basadas en la detección del antígeno del cáncer 15-3 (CA 15-3), una mucina asociada al tumor, y un antígeno carcinoembrionario (CEA), una glicoproteína asociada al tumor están disponibles para ayudar al diagnóstico de BC. El CA 15-3 tiene valores habitualmente incrementados en pacientes con cáncer de seno avanzado. Los niveles de CA 15-3 son difícilmente elevados en mujeres con etapas precoces de cáncer de seno (Duffy, M.J., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38 (2001) 225-262). Los cánceres de ovario, pulmón y próstata pueden aumentar también los niveles de CA 15-3. Los niveles elevados de CA 15-3 pueden ser asociados a estados no cancerosos, tales como enfermedades benignas de senos u ovarios, endometriosis, enfermedad inflamatoria de la pelvis y la hepatitis. El embarazo y la lactancia pueden provocar también un aumento en los niveles de CA 15-3 (National Cancer Institute, Cancer Facts, Fact Sheet 5.18 (1998) 1-5). La utilización principal de CEA es el control de cáncer de colon, especialmente cuando la enfermedad ha producido metástasis. No obstante, una serie de cánceres pueden producir niveles elevados de CEA, incluyendo el cáncer de seno.

40 Debido a la falta de especificidad de órgano y tumor, ni la medición de CA 15-3, ni la medición de CEA se recomienda para la detección de BC. Estos marcadores de tumor son una herramienta útil de diagnóstico en los cuidados de seguimiento de pacientes de BC (Untch, M., y otros, J. Lab. Med. 25 (2001) 343-352).

45 La sangre entera, suero, plasma, o líquido aspirado de pezones son las fuentes más ampliamente utilizadas de muestras en la rutina clínica. La identificación precoz de un marcador de tumor BC que permita una detección fiable de cáncer o proporcionar una información de pronóstico precoz podría conducir a un ensayo de diagnóstico que ayudaría notablemente en el diagnóstico y en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejorar el diagnóstico de BC a partir de sangre. Es especialmente importante, mejorar el diagnóstico precoz de BC, dado que para pacientes diagnosticados de modo anticipado, las probabilidades de su pervivencia son mucho más elevadas, en comparación con los diagnosticados a una etapa avanzada de la enfermedad.

50 Ha sido la tarea de la presente invención, investigar si se puede identificar un nuevo marcador que pueda ayudar en el diagnóstico de BC.

55 De manera sorprendente se ha descubierto que la utilización del marcador ASC puede superar, por lo menos parcialmente, los problemas conocidos en el estado de la técnica.

60 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un método para el diagnóstico in vitro de cáncer de seno, que comprende las etapas de: a) proporcionar una muestra de líquido obtenida a partir de un individuo, b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específico para ASC, en condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de unión y ASC, y c) correlacionar la cantidad de complejo formada en b) con el diagnóstico de cáncer de seno, de manera que un nivel elevado de ASC, en comparación con controles sanos, es indicativo de cáncer de seno. Otra realización preferente de la invención es un método para el diagnóstico de cáncer de seno, que comprende las etapas a) poner en contacto una muestra de líquido obtenida a partir de un individuo con un agente específico de unión para ASC, bajo condiciones apropiadas para la formación de un

complejo entre dicho agente de unión y ASC, y b) correlacionar la cantidad de complejo formado en a) con el diagnóstico de cáncer de seno.

5 Tal como apreciarán los expertos en la materia, cualquiera de dichos diagnósticos se realiza in vitro. La muestra del paciente es eliminada posteriormente. La muestra del paciente es utilizada solamente para el método de diagnóstico in vitro de la invención, y el material de la muestra del paciente no es devuelto al cuerpo del mismo. De manera típica, la muestra es una muestra líquida.

10 La "proteína tipo mancha ("speck-like") asociada a apoptosis, que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa" (ASC), también conocida como diana del silenciamiento 1, inducida por metilación (TMS1) (Swiss-PROT: Q9ULZ3) se caracteriza por la secuencia indicada en ID NO:1. Esta secuencia se traduce en un peso molecular teórico de 21.627 Da y en un punto isoeléctrico teórico de pH 6,29.

15 Los dominios de reclutamiento asociados a caspasa (los CARD) median la interacción entre proteínas adaptadoras, tales como APAF1 (proteína adaptadora activadora de factor 1) y la pro-forma de caspasas (por ejemplo, CASP 9) que participan en la apoptosis. La ASC es un miembro de la familia de proteínas adaptadoras que contienen CARD.

20 Por inmunorastreo de una línea celular pro-mielocítica, Masumoto y otros aislaron un cADN que codifica ASC. La proteína deducida de 195 aminoácidos contiene un dominio de terminal N similar a la pirina (PYD), y un terminal CARD-C de 87 residuos. El análisis de transferencia Western mostró la expresión de una proteína de 22 kDa e indicó que el ASC puede tener una actividad pro-apoptótica al incrementar la susceptibilidad de las líneas celulares de leucemia a estímulos apoptóticos, por medicamentos anti-cáncer (Masumoto, J., y otros, J. Biol. Chem. 274 (1999) 33835-33838).

25 Los análisis de restricción de PCR sensible a metilación y PCR (MSP) específica a metilación, por Conway y otros, indicaron que el silenciamiento de ASC se correlaciona con la hipermetilación de la isla CpG que rodea el exon1 y que la sobreexpresión DNMT 1 (ADN citosina-5-metiltransferasa-1) proporciona la hipermetilación y silenciamiento de ASC. Las líneas celulares de cáncer de seno, pero no los tejidos de seno normales, mostraron una metilación completa de ASC y no expresaron mensaje ASC. La expresión de ASC en líneas celulares de cáncer de seno inhibió el crecimiento y redujo el número de colonias supervivientes. Conway y otros llegaron a la conclusión de que ASC funciona en el fomento de apoptosis dependiente de caspasa, y que la sobreexpresión de ASC inhibe el crecimiento de las células de cáncer de seno (Conway, K.E., y otros, Cancer Research 60 (2000) 6236-6242).

35 McConnell y Vertino han demostrado que la expresión inducible de ASC inhibe la proliferación celular e induce a la fragmentación del ADN, que puede ser bloqueada por un inhibidor de caspasa. A partir de un microscopio de inmunofluorescencia se ha demostrado que la inducción de apoptosis provoca un desplazamiento dependiente de CARD de expresión citoplásmica difusa a agregados perinucleares esféricos (McConnell, B.B., y Vertino, P.M., Cancer Research 60 (2000) 6243-6247).

40 Moriani y otros observaron la metilación de un gen de ASC, no solamente en células de cáncer de seno, sino también en las de cáncer gástrico. Sugirieron un papel directo para la metilación aberrante del gen de ASC en el avance de cáncer de seno y del cáncer gástrico, comportando una regulación descendente del gen de ASC pro-apoptótico (Moriani, R., y otros, Anticancer Research 22 (2002) 4163-4168).

45 Conway y otros examinaron tejidos primarios de senos en cuanto a metilación TMS1, y compararon los resultados de la metilación de los tejidos sanos (Conway K.E., y otros, Cancer Research 60 (2000) 6236-6242). Levine y otros descubrieron que el silenciamiento de ASC no estaba correlacionado con la metilación de sitios CpG específicos, sino que estaba asociado a una metilación densa de la isla ASC CpG. Las líneas de células tumorales de seno, conteniendo exclusivamente copias de ASC metiladas, no expresan ASC, mientras que en líneas celulares parcialmente metiladas los niveles de expresión de ASC están directamente relacionados a un porcentaje de alelos de ASC metilados presentes en la población celular (Levine, J.J., y otros, Oncogene 22 (2003) 3475-3488).

55 Virmani y otros examinaron la situación de la metilación de ASC en tejidos de cáncer de pulmón y tejidos de cáncer de seno. Descubrieron que la metilación aberrante de ASC se encontraba presente en un 46% de las líneas celulares de cáncer de seno, y un 32% de los tejidos tumorales de seno. La metilación era rara en tejidos de seno benignos (7%) (Virmani, A., y otros, Int. J. Cancer 106 (2003) 198-204).

60 Shiohara y otros descubrieron que la regulación ascendente de ASC está asociada íntimamente con la inflamación y apoptosis en neutrófilos humanos (Shiohara, M., y otros, Blood 98 (2001) 229a).

65 Masumoto y otros observaron elevados niveles de ASC abundantemente expresados en células epiteliales y leucocitos (Masumoto, J., y otros, Journal of Histochemistry and Cytochemistry 49 (2001) 1269-1275).

- 5 Tal como es evidente para los técnicos en la materia, la presente invención ha de ser considerada limitada a la proteína de longitud completa ASC de SEQ ID NO: 1. La presente invención también comprende fragmentos fisiológicos o artificiales de ASC, modificaciones secundarias de ASC, así como variantes alélicas de ASC. Los fragmentos artificiales comprenden preferentemente un péptido producido sintéticamente o por técnicas recombinantes que, como mínimo comprende un epítipo de interés diagnóstico, que consiste, como mínimo, en 6 aminoácidos contiguos derivados de la secuencia dada a conocer en SEQ ID NO:1. Este fragmento puede ser utilizado ventajosamente para la generación de anticuerpos o como estándar en un inmunoensayo. De modo más preferente, el fragmento artificial comprende, como mínimo, dos epítipos de interés apropiados para disponer un inmunoensayo sándwich.
- 10 En realizaciones preferentes, el nuevo marcador ASC puede ser utilizado para el control, y también para objetivos de rastreo.
- 15 Cuando se utiliza, en el control de paciente, el método de diagnóstico, según la presente invención, puede ayudar a evaluar la carga tumoral, la eficacia de tratamiento y la recurrencia del tumor en el seguimiento de pacientes. Los niveles incrementados de ASC están correlacionados directamente a la carga tumoral. Después de quimioterapia, un corto plazo (desde pocas horas a 14 días) de incremento en ASC puede servir como indicador de muerte de células tumorales. En el seguimiento de pacientes (de 3 meses a 10 años), un incremento de ASC puede ser utilizado como indicador de recurrencia del tumor.
- 20 En una realización preferente, el método de diagnóstico, de acuerdo con la presente invención, es utilizado para objetivos de rastreo, es decir, es utilizado para evaluar individuos sin diagnóstico precoz de BC, por la medición del nivel de ASC y la correlación del nivel medido con la presencia o ausencia de BC.
- 25 La calificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión, y gravedad. Agrupa a pacientes de cáncer, de manera que se pueden realizar generalizaciones con respecto al pronóstico y la elección de terapia.
- 30 En la actualidad, el sistema TNM es la clasificación más ampliamente utilizada de la extensión anatómica de cáncer. Representa un sistema de calificación uniforme, aceptado internacionalmente. Hay tres variables básicas: T (extensión del tumor primario), N (situación de ganglios linfáticos regionales), y M (presencia o ausencia de metástasis distante). Los criterios TNM han sido publicados por la UICC (International Union Against Cancer) (Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds): TNM Classification of Malignant Tumours, fifth edition, 1997). El sistema de calificación para cáncer de seno ha sido revisado recientemente (Singleter y, S.E., y otros, Journal of Clinical Oncology 20 (2002) 3628-3636).
- 35 Lo que es especialmente importante es que el diagnóstico precoz de BC se traduce en un pronóstico mucho mejor. Por lo tanto, tienen el mejor pronóstico precoz en los pacientes, tal como en la etapa T_{is}, N0, M0 o T1-3; N0; M0, si se tratan de manera apropiada, tiene una probabilidad superior a 90% de supervivencia 5 años después de diagnóstico, en comparación con una tasa de supervivencia a los 5 años de 18% solamente para pacientes diagnosticados cuando ya se encuentran presentes metástasis distantes.
- 40 En el sentido de la presente invención, el diagnóstico precoz de BC se refiere a un diagnóstico en situación precancerosa (DCIS) o en una etapa del tumor en la que no se encuentran presente ninguna metástasis (ni proximal ni distal), es decir, T_{is}, N0, M0 o T1-4; N0; M0. T_{is} indica carcinoma *in situ*.
- 45 En una realización preferente, se utiliza ASC para diagnosticar BC en una etapa sin metástasis, es decir, que el diagnóstico es llevado a cabo en la etapa T_{is}, N0, M0 o T1-3; N0; M0 (=T_{is}-3; N0; M0).
- 50 El método de diagnóstico, de acuerdo con la presente invención, se basa en una muestra de líquido que se extrae de un individuo. A diferencia de métodos conocidos en la técnica, el ASC es medido de manera específica a partir de esta muestra de líquido por la utilización de un agente de unión específico.
- 55 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para ASC, una lectina que se une a ASC, o un anticuerpo a ASC. Un agente específico de unión tiene, como mínimo una afinidad de 10⁷ l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específico tiene preferentemente una afinidad de 10⁸ l/mol, o incluso, de manera más preferente, de 10⁹ l/mol para su molécula diana. Tal como apreciarán los expertos en la materia, el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen de manera significativa al agente de unión específico para ASC. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula objetivo tiene como resultado una afinidad de unión que es solamente del 10%, más preferentemente solo 5% de la afinidad de la molécula diana, o menos. Un agente de unión, más preferentemente específico, cumplirá ambos criterios mínimos indicados, en cuanto a afinidad y también especificidad.
- 60 Un agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo reactivo con ASC. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo mono clonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como
- 65

constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo. Cualquier fragmento de anticuerpo que retenga los anteriores criterios de un agente de unión específico, puede ser también utilizado.

Los anticuerpos son generados por procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and the theory of enzyme immunoassays 11 (1990) toda la obra, especialmente páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam). Además, los técnicos en la materia conocen métodos basados en inmunoadsorbentes que pueden ser utilizados para el aislamiento específico de anticuerpos. Por estos medios, se puede incrementar la calidad de los anticuerpos policlonales, y como consecuencia, su comportamiento en inmunoensayos. (Tijssen, P., supra, páginas 108-115).

Para los objetivos que se dan a conocer en la presente invención, se han utilizado anticuerpos monoclonales y policlonales. Los anticuerpos policlonales han sido cultivados en conejos. No obstante, es evidente también que se pueden utilizar anticuerpos policlonales procedentes de diferentes especies, por ejemplo, ratas o cobayas. Los anticuerpos monoclonales han sido producidos utilizando células de la bazo de ratones inmunizados. Dado que se pueden producir anticuerpos monoclonales en cualquier cantidad requerida con características constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para una rutina clínica. La generación y uso de anticuerpos monoclonales a ASC en un método, según la presente invención, es otra realización preferente.

Tal como apreciarán los técnicos en la materia, partiendo del hecho de que se ha identificado ASC como marcador útil en el diagnóstico de BC, se deben utilizar métodos alternativos para alcanzar un resultado comparable a los objetivos alcanzados por la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Estas estrategias comprenden, entre otros, la utilización de péptidos sintéticos que representan un epítipo de ASC para la inmunización. Preferentemente, un péptido sintético comprende una subsecuencia de SEQ ID NO: 1, que es específica para ASC, es decir, que tiene una homología comparativamente baja con respecto a otros polipéptidos relacionados. Es preferible que el péptido sintético comprenda una subsecuencia contigua consistiendo de 5 a 25 residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. De modo más preferente, el péptido comprende una subsecuencia contigua consistiendo en 10 a 15 residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Otras estrategias incluyen la utilización de una proteína de fusión SLyD-ASC, tal como se describe en el ejemplo 2 para la inmunización. Preferentemente, se utiliza una proteína de fusión de fórmula SLyD-(GGGS)₅-GGG-IEGR-ASC-GGGS-HHH-HHH, de manera que -(GGGS)₅-GGG es una primera secuencia de enlace rica en glicina, en la que IEGR es un sitio de fraccionamiento de factor Xa, de manera que GGGS es una segunda secuencia de enlace rica en glicina y HHHHHH es un marcador His.

De manera alternativa, se puede utilizar la inmunización, conocida también como vacuna de ADN.

Para la medición, la muestra de líquido obtenida a partir de un individuo es incubada con el agente de unión específico para ASC en condiciones apropiadas para la formación de un agente de unión ASC-complejo. No es necesario especificar estas condiciones, dado que los técnicos en la materia, sin ningún esfuerzo inventivo, pueden identificar fácilmente estas condiciones de incubación apropiadas.

Como etapa final, según el método dado a conocer en la presente invención, la cantidad de complejo se mide y se correlaciona al diagnóstico de BC. Tal como apreciarán los técnicos en la materia, hay numerosos métodos para medir la cantidad de agente de unión específico ASC-complejo, todos ellos descritos en detalle en obras relevantes (ver, por ejemplo, Tijssen P., supra, o Diamandis y otros, eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston).

Preferentemente, se detecta ASC en un formato de ensayo tipo sandwich. En este ensayo se utiliza un primer agente de unión específico para captar ASC por un lado, y por otro lado es utilizado un segundo agente de unión específico, que está marcado como directamente o indirectamente detectable.

Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto de modo sorprendente que se puede medir ASC a partir de una muestra de líquido obtenida de una muestra de un individuo. No son necesarios los tejidos ni muestras de biopsia para aplicar el marcador ASC en el diagnóstico de BC.

En una realización preferente, el método, según la presente invención, es practicado con suero como material de muestra líquido.

En otra realización preferente, el método, según la presente invención, es practicado con plasma como material de muestra líquido.

En otra realización preferente, se practica el método, según la presente invención, con sangre entera como material de muestra líquido.

En otra realización preferente, el método, según la presente invención, es practicado con líquido aspirado de pezones como material de muestra líquido.

Mientras que la aplicación de métodos proteómicos de rutina a muestras de tejidos conduce a la identificación de muchos candidatos a marcadores potenciales para el tejido seleccionado, los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar de modo sorprendente ASC en una muestra de fluido corporal. De modo todavía más sorprendente, han sido capaces de demostrar que la presencia de ASC en esta muestra de líquido obtenida a partir de un individuo se puede correlacionar con el diagnóstico de cáncer de seno.

Se pueden utilizar anticuerpos para ASC de manera muy ventajosa en procedimientos establecidos, por ejemplo, para detectar células de cáncer de seno in situ, en biopsias, o en procedimientos inmunohistológicos.

Preferentemente, se utiliza un anticuerpo para ASC en un inmunoensayo cualitativo (ASC presente o ausente), o cuantitativo (determinación de la cantidad de ASC).

La medición del nivel de proteína ASC se ha demostrado muy ventajosa en el campo de BC. Por lo tanto, en otra realización preferente, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína ASC como molécula marcadora en el diagnóstico de cáncer de seno, a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo, de manera que una cantidad elevada de ASC, en comparación con controles sanos, es indicativa de cáncer de seno.

El término de molécula marcadora se utiliza para indicar que un nivel incrementado del analito ASC, medido a partir de un fluido corporal de un individuo, marca la presencia de BC.

Es especialmente preferente utilizar el nuevo marcador ASC en el diagnóstico anticipado de cáncer de seno.

La utilización de la propia proteína ASC representa un avance significativo en el exigente campo del diagnóstico de BC. Combinando mediciones de ASC con otros marcadores conocidos, por ejemplo, CA15-3, CEA, proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) o con otros marcadores de BC conocidos en la actualidad o que todavía se tienen que descubrir, conducen a mejoras adicionales. Por lo tanto, en una realización adicional preferente, la presente invención se refiere a la utilización de ASC como molécula marcadora para cáncer de seno en combinación con una o más moléculas marcadoras para cáncer de seno en el diagnóstico de cáncer de seno a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo. A este respecto, la expresión "una o más" indica de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5, de modo más preferente 3. Otros marcadores de BC seleccionados preferentemente con los que se puede combinar la medición de ASC son CEA, proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y CA 15-3. De modo más preferente, se utiliza ASC como parte de un panel de marcadores que comprenden, como mínimo, ASC y CA 15-3. Por lo tanto, una realización adicionalmente preferente de la presente invención, consiste en la utilización de la proteína ASC como molécula marcadora para cáncer de seno en combinación con una o más moléculas marcadoras para cáncer de seno en el diagnóstico de cáncer de seno a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo, de manera que, como mínimo, otra molécula marcadora es proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373). Incluso, de manera más preferente, se utiliza ASC como parte de un panel de marcadores que comprende, como mínimo, ASC y proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373). Por lo tanto, una realización adicionalmente preferente de la presente invención consiste en la utilización de la proteína ASC como molécula marcadora para cáncer de seno en combinación con una o más moléculas marcadoras para cáncer de seno en el diagnóstico de cáncer de seno a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo, de manera que, como mínimo, otra molécula marcadora es proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y CA 15-3. Incluso, de modo más preferente, se utiliza ASC como parte de un panel de marcadores que comprende, como mínimo, ASC, proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y CA 15-3. Por lo tanto, otra realización preferente de la presente invención es la utilización de la proteína ASC como molécula marcadora para cáncer de seno en combinación con dos o más moléculas marcadoras para cáncer de seno en el diagnóstico de cáncer de seno a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo, de manera que las, como mínimo, otras dos moléculas marcadoras son proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y CA 15-3.

Preferentemente, el método de la invención es utilizado con muestras de pacientes de los que se sospecha que sufren cáncer de seno. Un individuo del que se sospecha que está afectado de cáncer de seno es un individuo para el que otros tipos de cánceres han sido excluidos. Otros cánceres incluyen, sin que ello sea limitativo, cáncer de colon, de pulmón, de estómago, de ovario, y de próstata. Una realización preferente de la invención es, por lo tanto, un método para el diagnóstico de cáncer de seno, que comprende las etapas a) disponer una muestra de líquido obtenida de un individuo del que se sospecha que sufre cáncer de seno, b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específico para ASC bajo condiciones apropiadas, para la formación de un complejo entre dicho agente de unión y ASC, y c) correlacionar la cantidad de complejo formado en b) con el diagnóstico de cáncer de seno.

Los reactivos de diagnóstico en el campo de los ensayos de unión específicos, tales como inmunoensayos, se facilitan usualmente en forma de un kit que comprende el agente de unión específico y los reactivos auxiliares requeridos para llevar a cabo el ensayo. Por lo tanto, la presente invención se refiere, asimismo, al kit inmunológico que comprende, como mínimo, un agente de unión específico para ASC y reactivos auxiliares para la medición de ASC. También, es preferible un kit inmunológico que comprenda, como mínimo, un agente de unión específico para ASC, como mínimo, un agente de unión específico para CA 15-3 y reactivos auxiliares para la medición de

5 ASC y CA 15-3. También es preferible un kit inmunológico que comprenda, como mínimo, un agente de unión específico para ASC, como mínimo, un agente de unión específico para la proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y reactivos auxiliares para la medición de ASC y proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373). También es preferible un kit inmunológico que comprenda, como mínimo, un agente de unión específico para ASC, como mínimo, un agente de unión específico para la proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373), como mínimo, un agente de unión específico para CA 15-3 y reactivos auxiliares para la medición de ASC, CA 15-3 y proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373).

10 La exactitud de una prueba se describe mejor por sus características operativas del receptor (ROC) (ver, especialmente, Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es un gráfico de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación continua del umbral de decisión con respecto a la totalidad del rango de los datos observados.

15 El comportamiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica o de la facilidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de la prueba de distinguir correctamente dos estados distintos de los sujetos investigados. Estos estados son, por ejemplo, salud y enfermedad, o enfermedad benigna con respecto a enfermedad maligna.

20 En cada caso, el gráfico ROC indica el solape entre las dos distribuciones al representar la sensibilidad con respecto a la especificidad por el rango completo de umbrales de decisión. En el eje y se representa la sensibilidad o la fracción positiva real [definida como (número de los resultados de pruebas positivas) (número de resultados de pruebas reales + número de pruebas de falso negativo)]. Se ha hecho referencia a ello, asimismo, como positividad en presencia de una enfermedad o estado de salud. Se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x, se encuentra la fracción falsa positiva o 1 - especificidad [definida como (número de resultados falsos-positivos) / (número de resultados negativos reales + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado. Dado que las fracciones verdadero positivo y falso positivo se calculan de manera completamente separada utilizan los resultados de prueba de dos subgrupos diferentes, el gráfico ROC es independiente de la prevalencia de enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico ROC representa un par de sensibilidad/ - especificidad que corresponde a un umbral de decisión específico. Una prueba con discriminación perfecta (sin solape en las dos distribuciones de resultados) tiene un gráfico ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, en la que la fracción positivo verdadero es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción falso positivo es 0 (perfecta especificidad). El gráfico teórico para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayor parte de gráficos se encuentran entre estos dos extremos. (Si el gráfico ROC se encuentra por completo o por debajo de la diagonal a 45°, esto se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio para "positividad" desde "mayor que" a "menor que", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más cerca se encuentre el gráfico respecto a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global de la prueba.

40 Una meta veniente para cuantificar la exactitud de diagnóstico de una prueba de laboratorio consiste en expresar su comportamiento por un solo número. La medida global más común es el área por debajo del gráfico ROC. De modo convencional esta área es siempre $\geq 0,5$ (si no lo es, se puede invertir la norma de decisión para que lo sea). Los valores varían entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia aparente de distribución entre los dos grupos de valores de prueba). El área no depende solamente de una parte particular de gráfico tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad para el 90% de especificidad, sino del gráfico completo. Esto es una expresión cuantitativa, descriptiva, de la proximidad a la que el gráfico ROC se encuentra del perfecto (área = 1,0).

50 La utilidad clínica del nuevo marcador ASC ha sido evaluada en comparación con el marcador establecido CA 15-3, y en combinación con el mismo, utilizando análisis de curva de operador receptor (ROC; Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). Este análisis se ha basado en grupos bien definidos de pacientes, consistiendo en 50 muestras procedentes de pacientes con carcinoma invasivo ductal o lobular en T1-3; N0; M0, tumor más avanzado, es decir, T4 y/o varias gravedades de metástasis (N+ y/o M+), carcinoma medular, papilar, mucinoso y tubular, carcinoma ductal in situ, y controles sanos, respectivamente.

Los siguientes ejemplos, referencias, listas de secuencias, y cifras, se facilitan para ayudar a la comprensión de la presente invención, cuyo ámbito real es definido en las reivindicaciones adjuntas.

60 Descripción de las figuras

Figura 1 La figura muestra un ejemplo típico de un gel 2D, al que se ha cargado una muestra de tumor (lado izquierdo), y un gel, al que se ha cargado una muestra de control correspondiente (lado derecho). El círculo de la sección a mayor escala de estos geles indica la posición para la proteína ASC. Utilizando el mismo método, esta proteína no ha sido detectada en tejidos sanos. El ASC emigra en el gel 2D

correspondiente a un punto isoeléctrico de aproximadamente pH 6 y un peso molecular aparente aproximado de 22 kDa.

- 5 Figura 2 La figura muestra curvas ROC para CA 15-3: cáncer de seno con respecto a controles sanos (línea trazada; ROC: 57%) y cáncer de seno con respecto a controles sanos y controles con enfermedad (línea seguida; ROC: 57%). El eje x indica el valor calculado, sustrayendo de 1 el valor de la especificidad. El eje y indica sensibilidad. En ambos casos, el valor de 1 corresponde al 100%. Cáncer de seno: 174 muestras. Controles sanos: 234 muestras. Controles con enfermedad: 86 muestras.
- 10 Figura 3 La figura muestra curvas ROC para CEA: Cáncer de seno con respecto a controles sanos (línea trazada; ROC: 69%) y cáncer de seno con respecto a controles sanos y controles con enfermedad (línea continua; ROC: 67%). El eje x indica el valor calculado restando de 1 el valor de especificidad. El eje y indica sensibilidad. En ambos casos, el valor de 1 corresponde al 100%. Cáncer de seno: 174 muestras. Controles sanos: 234 muestras. Controles con enfermedad: 86 muestras.
- 15 Figura 4 La figura muestra curvas ROC para ASC: Cáncer de seno con respecto a controles sanos (línea trazada; ROC: 80%) y cáncer de seno con respecto a controles sanos y controles con enfermedad (línea continua; ROC: 72%). El eje x indica el valor calculado restando de 1 el valor de especificidad. El eje y indica sensibilidad. En ambos casos, el valor de 1 corresponde al 100%. Cáncer de seno: 174 muestras. Controles sanos: 234 muestras. Controles con enfermedad: 86 muestras.
- 20

Abreviaturas

25	ABTS	2,2'-Azino-di-[3-etilbenzotiazolin sulfonato (6)] sal de diamonio.
	BSA	siero albúmina bovina
	cDNA	ADN complementario
	CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)-dimetilammonio]-1-propano-sulfonato)
	DMSO	dimetil sulfoxido
	DTT	ditiotreitól
30	EDTA	etileno diamina de ácido tetraacético
	ELISA	ensayo inmunoabsorbente enlazado con enzima
	HRP h	peroxidasa de rábano
	IAA	iodoacetamida
	IgG	immunoglobulina G
35	IEF	enfoque isoeléctrico
	IPG	gradiente pH inmovilizado
	LDS	dodecil sulfato de litio
	MALDI-TOF	tiempo de desabsorción para la ionización por láser con asistencia matricial de espectrometría de masas
40	MES	mesitil, 2,4,6-trimetilfenilo
	OD	densidad óptica
	PAGE	electroforesis de gel de poliacrilamida
	PBS	solución salina tamponada con fosfato
	PI	punto isoeléctrico
45	RTS	sistema de traducción rápida
	SDS	dodecil sulfato sódico
	UICC	Unión Internacional Contra el Cáncer

Ejemplo 1

Identificación de ASC como potente marcador de cáncer de seno

Fuentes de tejidos

55 Con el objetivo de identificar proteínas específicas de tumor como marcadores potenciales de diagnóstico para cáncer de seno, se llevó a cabo el análisis de dos tipos distintos de tejidos, utilizando métodos proteómicos.

60 En total, se analizaron muestras de tejidos de 14 pacientes afectados de cáncer de seno. De cada paciente, se recogieron dos tipos diferentes de tejidos, a partir de resecciones terapéuticas: tejido tumoral (> 80% tumor) (T), y tejidos sanos adyacentes (N). El último tipo de tejidos sirve como muestra de control sano correspondiente. Los tejidos son congelados inmediatamente después de la resección, y almacenados a -80°C antes del proceso. Los tumores son diagnosticados por criterios histopatológicos.

Preparación de tejidos

Se colocan 0,8-1,2g de tejidos congelados en un mortero y son completamente congelados por nitrógeno líquido. El tejido es pulverizado en el mortero, disuelto en un volumen 10 veces (peso/volumen) de tampón de lisis (40 mM Na-citrato, 5 mM MgCl₂, 1 % Genapol X-080, 0,02% N a-azida, libre de Complete® EDTA [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Cat. No. 1873 580]) y homogeneizado posteriormente en un homogeneizador de cristal Wheaton® (20 x acoplamiento libre, 20 x acoplamiento ajustado). 3 ml del homogeneizado son sometidos a centrifugación de la densidad de sacarosa (10-60% sacarosa) durante 1 hora a 4.500 g. Después de esta etapa de centrifugación, se obtienen tres fracciones. La fracción superior del gradiente contiene las proteínas solubles y es utilizada para otros análisis.

Inmovilización de albúmina antihumana de anticuerpo monoclonal sobre sefarosa 4B activada por CNBr

Sefarosa 4B activada por CNBr, liofilizada (Amersham Biosciences, 17-0430-01) es humedecida nuevamente y lavada de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El anticuerpo monoclonal dirigido contra albúmina humana es disuelto en 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3, 0,5 M NaCl, 10 mg/ml. 1 ml de solución de anticuerpo es mezclada con 1 ml de sefarosa 4B activada por CNBr rehumedecida. El tiempo de reacción es de 1 hora. El bloqueo del resto de grupos activos y el lavado del gel es llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Agotamiento de suero albúmina

Se equilibran 7 ml de gel anti-albúmina en un tampón de lisis sin Genapol-X-080. 7 ml de la fracción superior de la centrifugación de densidad de sacarosa (ver anterior, la preparación de tejidos) se aplican a la columna y se lavan con un tampón de lisis sin Genapol-X-080. El efluente combinado es utilizado para los experimentos de enfoque isoelectrónico.

Enfoque isoelectrónico (IEF) y SDS-PAGE

Para IEF, 3 ml de la preparación de tejido agotada de HSA, se mezclan con 12 ml de un tampón de muestra (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 0,4% IPG tampón pH 4-7, 0,5% DTT) y se incuban durante 1 hora. Las muestras son concentradas en un dispositivo Amicon® Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y la concentración de la proteína es determinada utilizando el ensayo de proteína BioRad® Cat. No. 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) siguiendo las instrucciones de la manual del su ministrador. A un volumen correspondiente a 1,5 mg de un tampón de muestra de proteína se añade hasta un volumen final de 350 µl. Esta solución es utilizada para rehidratar tiras IPG pH 4-7 (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) durante una noche. El IEF es llevado a cabo utilizando el siguiente protocolo de gradiente: (1.) 1 minuto a 500 V; (2.) 2 horas a 3500 V; (3.) 2 2 horas a 3500 V constante, dando lugar a 82 kVh. Después de IEF, las tiras son almacenadas a -80°C o utilizadas directamente para SDS-PAGE.

Antes de SDS-PAGE, las tiras son incubadas en un tampón de equilibrio (6 M urea, 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 30% glicerol, 2% SDS), se añaden, para su reducción, DTT (15 min, + 50 mg DTT/10 ml), y para alquilación IAA (15 min, + 235 mg iodacetamida/10 ml). Las tiras son colocadas sobre geles de poliacridamida al 12,5% y sometidas a electroforesis a 1 W/gel y, posteriormente, 1 hora a 17 W/gel. A continuación, los geles son fijados (50% metanol, 10% acetato) y sometidos a tinción durante una noche con Novex™ Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, Cat No. LC6025, 45-7101).

Detección de ASC como marcador potencial para cáncer de seno

Cada uno de los pacientes es analizado separadamente por análisis de imagen con un software ProteomeWeaver® (Definiens AG, Alemania, Munich). Además, todos los puntos del gel son extraídos mediante un robot de recogida, y las proteínas presentes en dichos puntos son identificadas mediante espectrometría de masas MALDI-T OF (Ultraflex™ ToF/ToF, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente, se compararon 4 geles de la muestra del tumor con 4 geles procedentes, cada uno de ellos, de un tejido adyacente, y se analizaron en cuanto a puntos distintivos correspondientes a proteínas expresadas diferencialmente. Por estos medios, la proteína ASC se ha encontrado que es expresada específicamente o sobrexpresada fuertemente en tejidos de tumor y no detectable en tejidos de control sanos. Por lo tanto, entre muchas otras proteínas, se califica como marcador candidato para su utilización en el diagnóstico de cáncer de seno.

Ejemplo 2

60

Generación de anticuerpos para la proteína marcadora de cáncer ASC

Se genera un anticuerpo policlonal para la proteína marcadora de cáncer de pecho ASC para el uso adicional del anticuerpo en la medición de suero y plasma y niveles de sangre de ASC por ensayos de inmunodetección, por ejemplo, Western Blotting y ELISA.

65

Expresión y purificación recombinante de la proteína

Para generar anticuerpos para ASC, se lleva a cabo una expresión recombinante de la proteína para obtener inmunógenos. La expresión se lleva a cabo aplicando una combinación del sistema de expresión RTS 100 y E. coli. En una primera etapa, se analiza la secuencia de ADN y se obtienen recomendaciones para variantes mutacionales silentes de cADN de alto rendimiento y sus correspondientes secuencias de cebador de PCR utilizando el sistema "ProteoExpert RTS E.coli HY". Este es un servicio comercial basado en la web (www.proteoexpert.com). Utilizando los pares de cebadores recomendados. Se utiliza el sistema "RTS 100 E. coli Linear Template Generation Set, His-tag" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Cat. No. 31862-37) para generar plantillas lineales de PCR a partir de cADN para la transcripción in vitro y expresión de la secuencia de nucleótido que codifica para la proteína ASC. Para la detección por transferencia Western y purificación posterior, la proteína expresada contiene una etiqueta His. Se identifica la variante de mejor expresión. Todas las etapas, desde PCR a expresión y detección son llevadas a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El respectivo producto PCR que contiene todas las regiones reguladoras T7 necesarias (promotor, sitio de unión ribosomal y terminador T7) es clonado en el vector pBAD TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, Cat. No. K4300/01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la expresión utilizando las secuencias reguladoras T7, el constructo es transformado en E. coli BL 21 (DE 3) (Studier, F.W., y otros, Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89) y las bacterias transformadas son cultivadas en lote de 1 litro para la expresión de la proteína.

La purificación de la proteína de fusión His-ASC se lleva a cabo siguiendo unos procedimientos estándar en una columna de Ni-quelato. De forma breve, un litro de cultivo de bacterias conteniendo el vector de expresión para la proteína de fusión His-ASC es compactado por centrifugación. La pastilla de células es resuspendida en un tampón de lisis, obteniendo fosfato. pH 8,0, cloruro de guanidinio 7 M, imidazol y tioglicerol, seguido de la homogeneización utilizando un Ultra-Turrax®. El material insoluble es aglomerado por centrifugación a alta velocidad, y el sobrenadante es aplicado a una columna cromatográfica de Ni-quelato. La columna es lavada con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis seguido de lavados con tampón de fosfato, pH 8,0 y urea. Finalmente, el antígeno unido es eluido utilizando un tampón de fosfato conteniendo SDS en condiciones ácidas.

Síntesis de conjugados hemocianina-péptido para la generación de anticuerpos

La síntesis es llevada a cabo utilizando química heterobifuncional (química maleimida/SH). Cisteínas seleccionadas conteniendo péptidos de ASC son acopladas a hemocianina activada por 3-maleimidohexanoil-N-hidroxisuccinimidester (MHS) procedente de Concholepas concholepas (Sigma, B-8556).

La hemocianina es llevada a 10 mg/ml en 100 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,2. Por cada ml de hemocianina se añaden 100 µl MHS (12,3 mg en DMSO) y se incuban durante 1 hora. La muestra es dializada durante una noche contra 100 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 6,5 y se ajusta a 6 mg/ml con tampón de dialisis. Se disuelve una cisteína seleccionada conteniendo péptido de ASC en DMSO (5 mg/ml para un péptido de 15 00 Dalton). Por cada ml de hemocianina activada por MHS (6 mg/ml), se añaden 20 µl de 100 mM EDTA, pH 7,0 y 100 µl de la cisteína seleccionada conteniendo un péptido de ASC. Después de 1 hora, los grupos maleimida restantes son bloqueados por adición de 10 µl 0,5 M cisteína/HCl por cada ml de mezcla de reacción. Esta preparación es utilizada para la inmunización sin purificación adicional.

Expresión recombinante y purificación de proteína de fusión

Para generar anticuerpos para ASC se lleva a cabo una expresión recombinante de una proteína de fusión SlyD-ASC para obtener inmunógenos. Por lo tanto, se construye un vector de expresión que contiene un gen que codifica SlyD-(GGGS)₅-GGG-IEGR-ASC-GGGS-HHHHHH. Para la purificación y detección por transferencia Western, el constructo contiene un carboxi terminal His-Tag (HHHHH). Un enlace adicional GS ((GGGS)₅-GGG) y un sitio de fraccionamiento para el factor Xa (IEGR) es insertado entre SlyD y ASC. La expresión es llevada a cabo en E. coli bajo control del promotor T5.

En una primera etapa, se realiza PCR utilizando el vector pSO60 (pET24 que lleva un cassette de expresión que codifica SlyD-(GGGS)₅-GGG-SlyD) como plantilla. Mediante la utilización del cebador 1 (SEQ ID NO: 2) y del cebador 2 (SEQ ID NO: 3), se obtiene un monoSlyD llevando un sitio EcoRI y un sitio de unión ribosomal en el terminal 5' y un sitio BamHI, la secuencia que codifica IEGR y un sitio SacI en el extremo 2', respectivamente. El producto PCR generado es clonado como fragmento EcoRI/SacI en pQE80L (Qiagen, Hilden) proporcionando pQE80-SlyD.

En segundo lugar, se amplifica ASC a partir de pBC14 (pET24 que lleva ASC) como plantilla. Por utilización del cebador 3 (SEQ ID NO: 4) y del cebador 4 (SEQ ID NO: 5), se insertan un lugar BamHI y una secuencia que codifica IEGR en el extremo 5', así como la secuencia de codificación GGGS-HHHHHH y un sitio HindIII en el extremo 3'.

El producto PCR es clonado como fragmento BamHI/HindIII en pQE80-SlyD resultando, en el constructo final de expresión, (pQE80-SI yD-ASC). Todas las etapas PCR y de clonado son llevadas a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 Para una expresión bajo control del promotor T5, se transforman células *E. coli* C600 (Stratagene, Heidelberg) con el constructo final. Las cepas de expresión son cultivadas en un lote de 1l para la producción de proteína.

10 La purificación de la proteína de fusión His-SlyD-ASC es llevada a cabo siguiendo procesos estándar en una columna de Ni-quelato. De modo breve, un litro de cultivo de bacterias conteniendo el vector de expresión para la proteína de fusión SI yD-ASC-His es aglomerado por centrifugación. La pastilla de células es resuspendida en un tampón de lisis, que contiene Tris/HCl, pH 8, CHAPS, EDTA y lisozima, seguido de la homogeneización utilizando un Ultra-Turrax®. Se degrada enzimáticamente AND por la adición de cloruro de magnesio y DNasa. Los cuerpos de inclusión son aglomerados por centrifugación. La pastilla es disuelta en un tampón de fosfato, pH 8,0, cloruro de guanidinio 7 M y cargada en una columna de Ni-quelato. La columna es lavada con varios volúmenes de lecho de fosfato pH 8,0, cloruro de guanidinio 7 M. A continuación, el tampón de fosfato, pH 8,0, cloruro de guanidinio 7 M es sustituido por un tampón de fosfato, pH 8,0, NaCl, para inducir el repliegado de la proteína unida a la matriz. La proteína de fusión repliegada es eluida mediante un tampón de fosfato, pH 8,0, NaCl, imidazol.

20 **Producción de anticuerpos monoclonales contra ASC**

25 **a) Inmunización de ratones**

25 Ratones A/J de doce semanas de edad son inmunizados inicialmente por vía intraperitoneal con 100 µg de ASC, proteína de fusión o conjugado hemocianina-péptido (ver anterior). Esta operación es seguida después de 6 semanas, por otras dos inmunizaciones intraperitoneales a intervalos mensuales. En este proceso, cada ratón recibe 100 µg de ASC o conjugado de hemocianina-péptido adsorbido en hidróxido de aluminio y 10⁹ gérmenes de *Bordetella pertussis*. A continuación, las dos últimas inmunizaciones son llevadas a cabo por vía intravenosa en el tercer y segundo días antes de la fusión, utilizando 100 µg de ASC o conjugado de hemocianina-péptido en un tampón de PBS para cada uno.

30 **b) Fusión y clonado**

35 Las células del bazo de los ratones inmunizados, de acuerdo con a), son fusionadas con células de mieloma, de acuerdo con Galfre, G., y Milstein, C., *Methods in Enzymology* 73 (1981) 3-46. En este proceso, aproximadamente 1 x 10⁸ células del bazo del ratón inmunizado son mezcladas con 2 x 10⁷ de mieloma (P3X63-Ag8-653, ATCC CRL1580) y centrifugadas (10 minutos a 300 x g y 4°C). Las células son seguidamente lavadas una vez con el medio RPMI 1640 sin suero fetal de vaca (FCS) y centrifugadas nuevamente a 400 x g en un tubo cónico de 50 ml. El sobrenadante es eliminado, el sedimentado de células es liberado suavemente por percusión, se añade 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcla por pipeteado. Después de 1 minuto en un baño de agua a 37°C, se añaden gota a gota, a temperatura ambiente, durante un periodo de 4-5 minutos, 5 ml de RPMI 1640 sin FCS. Después de ello, se añaden gota a gota, al cabo de 1 minuto aproximadamente, mezclados de manera completa, 5 ml de RPMI 1640 conteniendo un 10% de FCS, llenando hasta 50 ml con el medio (RPMI 1640 + 10% FCS) y centrifugando, a continuación, durante 10 minutos, a 400 x g y 4°C. Las células sedimentadas son recogidas en el medio RPMI 1640 conteniendo un 10% de FCS y sembradas en un medio de selección de hipoxantina-azaserina (100 mmol/l hipoxantina, 1 µg/ml azaserina en RPMI 1640 + 10% FCS). Se añade Interleukina 6 a 100 U/ml al medio como factor de crecimiento.

50 Después de unos 10 días, los cultivos primarios son comprobados para el anticuerpo específico. Los cultivos primarios positivos de ASC son clonados en placas de cultivo de células de 96 pocillos por medio de un clasificador de células activadas por fluorescencia. En este proceso, se añade nuevamente Interleukina 6 a 100 U/ml al medio como aditivo de crecimiento.

55 **c) Aislamiento de inmunoglobulina a partir de los sobrenadantes del cultivo de células**

55 Las células de hibridoma obtenidas son sembradas a una densidad de 1 x 10⁵ por ml en el medio RPMI 1640, conteniendo 10% de FCS y con proliferación durante 7 días en un fermentador (Thermodux Co., Wertheim/Main, Modelo MCS-104XL, Order No. 144-050). Como promedio, se obtienen concentraciones de 100 µg de anticuerpo monoclonal por ml en el sobrenadante del cultivo. La purificación de este anticuerpo a partir del sobrenadante del cultivo es llevada a cabo por métodos convencionales de la química de proteínas (por ejemplo, de acuerdo con Bruck, C., y otros, *Methods in Enzymology* 121 (1986) 587-695).

Generación de anticuerpos policlonales**a) Inmunización**

5 Para la inmunización, se prepara una emulsión acuosa de la solución de proteína (100 µg/ml ASC, proteína de fusión o conjugado de hemocianina-péptido) y coadyuvante completo de Freund's con una proporción 1:1. Cada uno de los conejos es inmunizado con 1 ml de la emulsión en los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrae la sangre, y el suero anti-ASC resultante es usado para otros experimentos, tal como se describe en los ejemplos 3 y 4.

10 b) purificación de IgG (inmunoglobulina G) de suero de conejo por precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico

15 Se diluye un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes de tampón de acetato (60 mM, pH 4,). El pH es ajustado a 4,5 con Tris-base 2 M. Se añade ácido caprílico (25 µl/ml de muestra diluida) gota a gota con agitación vigorosa. Después de 30 minutos, la muestra es centrifugada (13.000 x g, 30 min, 4°C), el sedimento es eliminado y el sobrenadante es recogido. El pH del sobrenadante es ajustado a 7,5 por adición de Tris-base 2 M y es filtrado (0,2 µm).

20 La inmunoglobulina del sobrenadante es precipitada por la agitación vigorosa por la adición gota a gota de una solución de sulfato amónico 4 M, hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas son recogidas por centrifugación (8.000 x g, 15 min, 4°C).

25 El sobrenadante es eliminado. El sedimento es disuelto en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl y dializado de manera exhaustiva. El dializado es centrifugado (13.000 x g, 15 min, 4°C) y filtrado (0,2 µm).

Biotinilación de IgG policlona de conejo

30 IgG policlona de conejo es llevada a 10 mg/ml en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH pH 7,5, 30 mM NaCl. Se añaden, por cada ml de solución de IgG, 50 µl de Biotina-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra es cromatografiada sobre Superdex 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH pH 7,5, 30 mM NaCl). La fracción que contiene IgG biotinilada es recogida. Los anticuerpos monoclonales son biotinilados, de acuerdo con el mismo procedimiento.

Digoxigenilación de IgG policlona de conejo

35 IgG policlona de conejo es llevada a 10 mg/ml en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, 30 mM NaCl, pH 7,5. Por cada ml de solución de IgG se añaden 50 µl de digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-ácido aminocaprílico-N-hidroxisuccinimida éster (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, Cat. No. 1333054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra es cromatografiada sobre Superdex® 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl). Las fracciones que contienen IgG digoxigenilada son recogidas. Los anticuerpos monoclonales son marcados con digoxigenina, de acuerdo con el mismo procedimiento.

Ejemplo 3**45 Transferencia Western para la detección de ASC en muestras de suero y plasma humanos**

50 Se llevan a cabo SDS-PAGE y Western Blotting utilizando reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Las muestras de plasma humano son diluidas 1:20 en tampón de muestra LDS reductor NuPAGE® (Invitrogen) y se calienta durante 5 minutos a 95°C. Se hacen pasar partes alícuotas de 10 µl sobre geles 4-12% NuPAGE® (Bis-Tris) en el sistema de tampón MES. La mezcla de proteína separada del gel es transferida sobre membranas de nitrocelulosa utilizando el módulo de transferencia Invitrogen XCell II™ (Invitrogen) y el sistema de tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas son lavadas 3 veces en PBS/0,05% Tween-20 y bloqueadas con un tampón de bloqueo SuperBlock (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA). El anticuerpo primario biotinilado es diluido en un tampón de bloqueo SuperBlock (0,01-0,2 µg/ml) e incubado con la membrana durante 1 hora. Las membranas son lavadas 3 veces en PBS/0,05% Tween-20. El anticuerpo primario biotinilado, específicamente unido, es marcado con un conjugado de estreptavidina-HRP (20 mUAB TS/ml en un tampón de bloqueo SuperBlock). Después de la incubación durante 1 hora, las membranas son lavadas 3 veces en PBS/0,05% Tween-20. El conjugado unido de estreptavidina-HRP es detectado utilizando un sustrato quimioluminiscente (SuperSignal West Femto Substrate, Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA) y una película autorradiográfica. Los tiempos de exposición varían de 10 minutos a una noche.

Ejemplo 4**Ensayo ELISA para la medición de ASC en muestras de suero y plasma humanos**

5 Para la detección de ASC en suero o plasma humano, se desarrolló un sandwich ELISA utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos con recubrimiento de estreptavidina.

Una parte alícuota de 20 μ l de una muestra de suero o plasma humano, o una dilución seriada de la proteína de fusión recombinante SlyD-ASC-His- como antígeno estándar, fueron incubadas con 100 μ l de anticuerpo biotinilado policlonal anti-ASC (1 μ g/ml) y con un anticuerpo digoxigenilado policlonal anti-ASC (1 μ g/ml) en 10 mM de fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween-20. Después de la incubación durante 90 minutos a 30°C, las placas fueron lavadas 3 veces con 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20. Para la detección de complejos antígeno-anticuerpo, 150 μ l de un conjugado monoclonal anti-digoxigenina peroxidasa en 10 mM de fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween-20 fueron añadidos e incubados durante 30 minutos a 30°C. El exceso de conjugado fue eliminado por el lavado de las placas, 3 veces, con 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20. La cantidad de conjugado unido fue detectada por incubación, con una solución de 200 μ l TMB (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania, No. de catálogo. 1203 4425) durante 15 minutos. La reacción enzimática fue interrumpida por la adición de 50 μ l 1 M H₂SO₄. El desarrollo de color fue cuantificado a 450 nm utilizando un lector ELISA. La concentración de ASC en una muestra de suero o plasma se calculó a partir de la curva estándar utilizando una dilución serial de proteína de fusión recombinante SlyD-ASC-His.

Ejemplo 5**Evaluación de marcador, sensibilidad y especificidad.**

25

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

La exactitud es evaluada al analizar muestras líquidas de individuos, obtenidas a partir de grupos de pacientes bien caracterizados. El colectivo de control (ver Tabla 1) contiene 234 hembras consistentes en 172 donantes de sangre y 62 pacientes que habían pasado por una mamografía. Estos 62 pacientes fueron hallados negativos en la mamografía, y no se detectaron síntomas de otras enfermedades de senos.

Los 174 pacientes de cáncer de seno fueron reunidos de pacientes afectados por carcinomas ductal, lobular, tubular, medular, y mucinoso de diferentes etapas. Debido al objetivo de diagnosticar un cáncer de seno en etapas precoces, la proporción de UICC I and UICC II era de 80%. Para analizar la especificidad con respecto a otras enfermedades no malignas de seno, se incluyeron 77 enfermedades distintas de senos, no malignas, y 9 enfermedades ginecológicas no malignas. El grupo se resume en la tabla 1.

Se midieron CA 15-3 y CEA mediante ensayos disponibles comercialmente (ensayo Roche Diagnostics, CA 15-3: Cat. No. 0 304 5838 y ensayo CEA: Cat. No. 1731629) para el analizador de inmunoensayos Elecsys® Systems y se midió ASC, tal como se ha descrito en lo anterior, en una parte alícuota de suero obtenida de cada uno de estos individuos.

Tabla 1: Conjunto de Pacientes

Pacientes sanos Σ		234
	Donantes de sangre femeninos (sin mamografía)	172
	Hembras sanas (mamografía negativa)	62
Cáncer de seno Σ	Etapa	174
	UICCI	71
	UICC II	68
	UICC III	25
	UICC IV	6
	Sin calificación	4
Controles de enfermedad Σ		86
	Fibroadenoma	20
	Papilloma	6
	Papillomatose	3
	LCIS (lobular carcinoma in situ)	2
	Mastitis	9
	Microcalcificación	8
	Enfermedades Fibrocísticas	23
	Quistes	4
	Otras enfermedades de los senos	2
	Controles de enfermedades ginecológicas	9

5 El corte se define con respecto al percentil de 95% del grupo de control sano, igualando el 95% de especificidad. De este modo, en la presente serie de experimentos el valor de corte para ASC es ajustado a 0,60 ng/ml.

10 Atendiendo al grupo de control de enfermedad, la especificidad de la mamografía es muy baja (18,2%). La ventaja de un marcador de cáncer de seno es la mayor especificidad en comparación con la mamografía. Utilizando el corte de 0,6 ng/ml, la especificidad de ASC en el grupo de control de enfermedad, fue determinada en 68,6%, que es inferior que para CA 15-3 ó CEA. Debido al mayor nivel de ASC en el grupo de control de enfermedad, en comparación con los controles sanos, existe la necesidad de incluir controles de enfermedad en la determinación de la concentración de corte. Sin embargo, utilizando este valor de corte en las muestras de cáncer de seno, se consiguió una sensibilidad de 30,5%, que es superior a la de los, bien conocidos, marcadores CA 15-3 y CEA. Hay también una buena tasa de detección en las etapas precoces (ver Tabla 2).

15 Los datos que resumen la sensibilidad y especificidad de ASC en comparación con los marcadores CEA y CA 15-3 se indican en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2: Sensibilidad

Número de resultados positivos	Número de muestras	ASC	CA 15-3	CEA
UICCI	71	18	8	12
UICC II	68	23	14	11
UICC III	25	9	12	8
UICC IV	6	2	2	3
Sin calificación	4	1	1	1
Total	174	53	37	35
Sensibilidad	-	30.5%	21.3%	20.1%

Tabla 3: Especificidad

Valores indicados en [%]	ASC	CA 15-3	CEA
Controles sanos	94.4	91.0	92.3
Controles con enfermedad	68.6	87.2	90.7

5

10

Para observar la potencia de diferenciación de un nuevo marcador, sin consideración de un valor de corte, se llevó a cabo un análisis ROC, de acuerdo con Zweig, M. H., y Campbell, antes indicados. La potencia discriminatoria para la diferenciación de pacientes en el grupo de cáncer de seno con respecto al grupo de control "sano" medido por el área situada por debajo de la curva, fue de 80% para ASC y superior en comparación con los marcadores establecidos CA 15-3 (57%) y CEA (69%), respectivamente. Si los controles con enfermedad se incluyeron en el grupo de "control", el área situada debajo de la curva bajó a 72%, pero siempre fue superior que la de CA 15-3 y CEA.

15

Tabla 4: Valores ROC

Valores indicados en [%]	ASC	CA 15-3	CEA
Cáncer de seno / controles sanos	80	57	69
Cáncer de seno/controles sanos + controles enfermedad	72	57	67

20

25

Dado que la sensibilidad y especificidad de un marcador se puede cambiar fácilmente desplazando el valor de corte, la mejor herramienta para analizar la potencia de diferenciación de un nuevo marcador es el análisis ROC. Utilizando esta herramienta, ASC tiene la mayor potencia de discriminación entre pacientes con cáncer de seno y muestras de control, incluyendo otras enfermedades de seno en comparación con los, bien conocidos, marcadores CA 15-3 y CEA. Además, la ASC es capaz de detectar más tumores en etapas precoces. Utilizando todas las muestras de control, incluyendo controles con enfermedad, la potencia de discriminación de ASC (72%) es superior a la de CA 15-3 (57%) y CEA (67%). Los datos indican que ASC puede ser de gran interés en el diagnóstico de cáncer de seno o en el seguimiento de pacientes después de cirugía.

30

En algunas de las muestras de pacientes de BC, tanto los niveles de ASC como los de CA 15-3 son elevados. Además, uno de ASC o CA 15-3 es positivo en muestras individuales obtenidas a partir de diferentes pacientes con cáncer de seno. Esto conduce a una mayor sensibilidad si ambos marcadores son medidos en una muestra de paciente. Si una muestra de paciente es clasificada como positiva en caso de que uno de los marcadores ASC o CA 15-3 es positivo, entonces se puede conseguir una elevada sensibilidad.

35

Datos preliminares indican que ASC puede ser también muy interesante en el seguimiento de pacientes después de cirugía.

Lista de referencias

- Bruck, C., y Chen, G., y otros, *Methods Enzymol.* 121 (1986) 587-695
- Carney, P.A., y otros, *Ann. Intern. Med.* 138 (2003) 168-175
- 5 Chen, G., y otros, *Molecular and Cellular Proteomics* 1.4 (2002) 304-313
- Conway, K.E., y otros, *Cancer Research* 60 (2000) 6236-6242
- Diamandis y otros, eds. (1996) *Immunoassay*, Academic Press, Boston
- Duffy, M.J., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38 (2001) 225-262 Essermann, L., y otros, *J. Natl. Cancer Inst.* 94 (2002) 369-375
- 10 Galfre, G., and Milstein, C., *Methods Enzymol.* 73 (1981) 3-46
- Kuerer, H.M., y otros, *Cancer* 95 (2002) 2276-2282
- Levine, J.J., y otros, *Oncogene* 22 (2003) 3475-3488
- Masumoto, J, y otros, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33835-33838
- Masumoto, J., y otros, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49 (2001) 1269-1275
- 15 McConnell, B.B., y Vertino, P.M., *Cancer Research* 60 (2000) 6243-6247
- Moriani, R., y otros, *Anticancer Research* 22 (2002) 4163-4168
- National Cancer Institute, *Cancer Facts, Fact Sheet* 5.18 (1998) 1-5
- Shiohara, M., y otros, *Blood* 98 (2001) 229a
- Singletery, S.E., y otros, *Journal of Clinical Oncology* 20 (2002) 3628-3636
- 20 Studier, F.W., y otros, *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89
- Tijssen, P., *Practice and the ory of enzyme immunoassays* 11 (1990) libro completo, especialmente páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam
- UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. eds), *TNM Classification of Malignant Tumours*, fifth edition, 1997
- 25 Untch, M., y otros, *J. Lab. Med.* 25 (2001) 343-352
- Virmani, A., y otros, *Int. J. Cancer* 106 (2003) 198-204
- WHO, *Screening for Breast Cancer*, May 10, 2002
 WO 00/60076
 WO 02/23200
- 30 Wulfkuhle, J.D., y otros, *Cancer Research* 62 (2002) 6740-6749
- Zweig, M. H., and Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Utilización de la proteína ASC como marcador para el cáncer de seno

<130> 22237

<150> EP 03023507.1

<151> 2003-10-15

<160> 5

<170> Versión Patentin 3.2

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Proteína tipo mancha ("speck-like") que contiene una CARD, asociada a
(ASC)

<400> 1

ES 2 377 407 T3

Met Gly Arg Ala Arg Asp Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu Asn Leu Thr
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Leu Lys Lys Phe Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Pro Leu
 20 25 30

Arg Glu Gly Tyr Gly Arg Ile Pro Arg Gly Ala Leu Leu Ser Met Asp
 35 40 45

Ala Leu Asp Leu Thr Asp Lys Leu Val Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Tyr
 50 55 60

Gly Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val Leu Arg Asp Met Gly Leu Gln Glu
 65 70 75 80

Met Ala Gly Gln Leu Gln Ala Ala Thr His Gln Gly Ser Gly Ala Ala
 85 90 95

Pro Ala Gly Ile Gln Ala Pro Pro Gln Ser Ala Ala Lys Pro Gly Leu
 100 105 110

His Phe Ile Asp Gln His Arg Ala Ala Leu Ile Ala Arg Val Thr Asn
 115 120 125

Val Glu Trp Leu Leu Asp Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Thr Asp Glu
 130 135 140

Gln Tyr Gln Ala Val Arg Ala Glu Pro Thr Asn Pro Ser Lys Met Arg
 145 150 155 160

Lys Leu Phe Ser Phe Thr Pro Ala Trp Asn Trp Thr Cys Lys Asp Leu
 165 170 175

Leu Leu Gln Ala Leu Arg Glu Ser Gln Ser Tyr Leu Val Glu Asp Leu
 180 185 190

Glu Arg Ser
 195

<210> 2
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial

<220>

ES 2 377 407 T3

<223> cebador 1 al que se hace referencia en el Ejemplo 2

<400> 2

atgcgaattc attaaagagg agaaattaac tatgaaagta gcaaaaagacc tgg 53

<210> 3

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 2 al que se hace referencia en el Ejemplo 2

<400> 3

gcatgagctc acggccttca ataccgccac cagagccacc gccggaaccg ccaccggatc 60

c

61

<210> 4

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 3 al que se hace referencia en el Ejemplo 2

<400> 4

atgcgatcc ggtggcgggt cggcggtgg ctctggtggc ggtattgaag gccgtgggcg 60

cgcgcgcgac gc

72

<210> 5

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador 4 al que se hace referencia en el Ejemplo 2

<400> 5

gcataagctt tcattagtgatggtgatggatgatgggaacc gccaccgctc cgctccaggt 60

cctcc

65

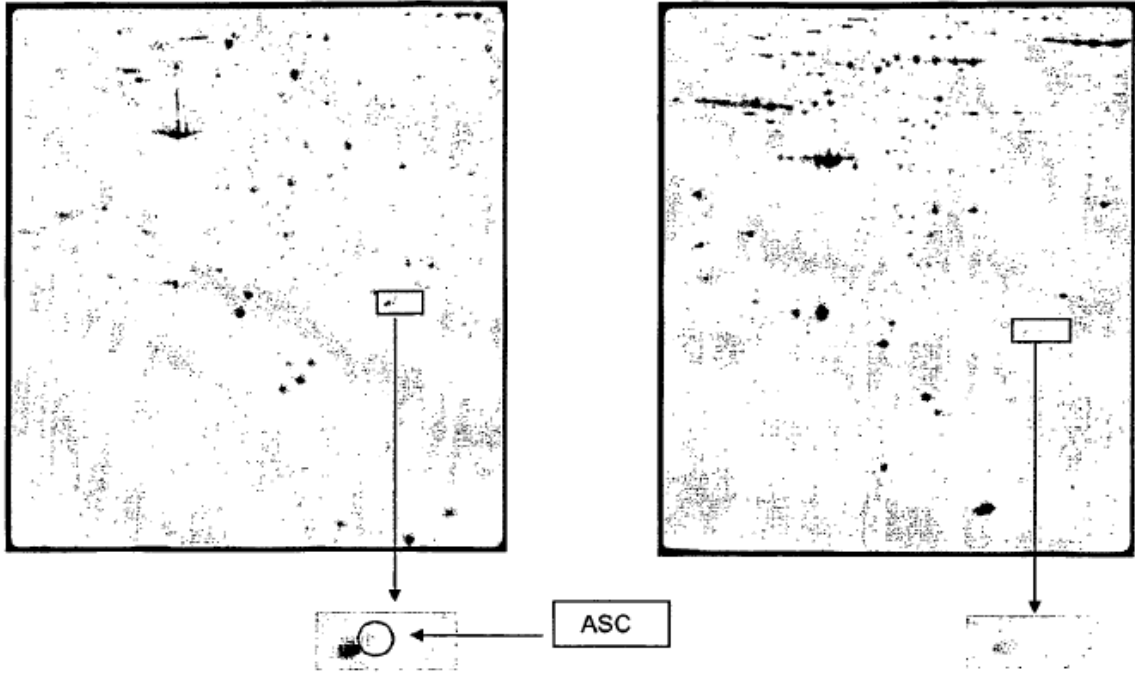
REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico in vitro de cáncer de seno, que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) preparar una muestra líquida obtenida de un individuo,
- b) establecer contacto de dicha muestra con un agente de unión específico para la proteína tipo mancha ("speck-like"), que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa (ASC), bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de unión y ASC, y
- 10 c) correlacionar la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico de cáncer de seno, de manera que un nivel elevado de ASC en comparación con controles sanos es indicativo de cáncer de seno.
2. Método, según la reivindicación 1, caracterizado, además, porque dicha muestra es suero.
- 15 3. Método, según la reivindicación 1, caracterizado, además, porque dicha muestra es plasma.
4. Método, según la reivindicación 1, caracterizado, además, porque dicha muestra es sangre entera.
- 20 5. Método, según la reivindicación 1, caracterizado, además, porque dicha muestra es líquido aspirado de pezones.
6. Utilización in vitro de la proteína ASC en el diagnóstico de cáncer de seno a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo, en el que un nivel elevado de ASC, en comparación con controles sanos, es indicativo de cáncer de seno.
- 25 7. Utilización in vitro de la proteína ASC en el diagnóstico precoz de cáncer de seno a partir de una muestra de líquido obtenida de un individuo, en el que un nivel elevado de ASC, en comparación con controles sanos, es indicativo de cáncer de seno.
- 30 8. Utilización in vitro de la proteína ASC en combinación con una o más moléculas marcadoras de cáncer de seno en el diagnóstico de cáncer de seno, a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo, en el que un nivel elevado de ASC, en comparación con controles sanos, es indicativo de cáncer de seno.
- 35 9. Utilización, según la reivindicación 8, en la que, como mínimo, otra molécula marcadora es CA 15-3.
10. Utilización, según la reivindicación 8, en la que, como mínimo, otra molécula marcadora es proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373).
- 40 11. Utilización, según la reivindicación 8, en la que, como mínimo, dos moléculas marcadoras son proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y CA 15-3.
12. Kit inmunológico que comprende, como mínimo, un agente de unión específico para ASC, como mínimo, un agente de unión específico para CA 15-3, y reactivos auxiliares para la medición de ASC y CA 15-3.
- 45 13. Kit inmunológico que comprende, como mínimo, un agente de unión específico para ASC, como mínimo, un agente de unión específico para la proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373) y reactivos auxiliares para la medición de ASC y proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373).
- 50 14. Kit inmunológico que comprende, como mínimo, un agente de unión específico para ASC, como mínimo, un agente de unión específico para la proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373), como mínimo, un agente de unión específico para CA 15-3, y reactivos auxiliares para la medición de ASC, CA 15-3 y proteína celular II de unión a ácido retinoico (Swiss-PROT: P29373).

Figura 1

Muestra de tumor

Muestra de control correspondiente



ampliación de zona

Figura 2

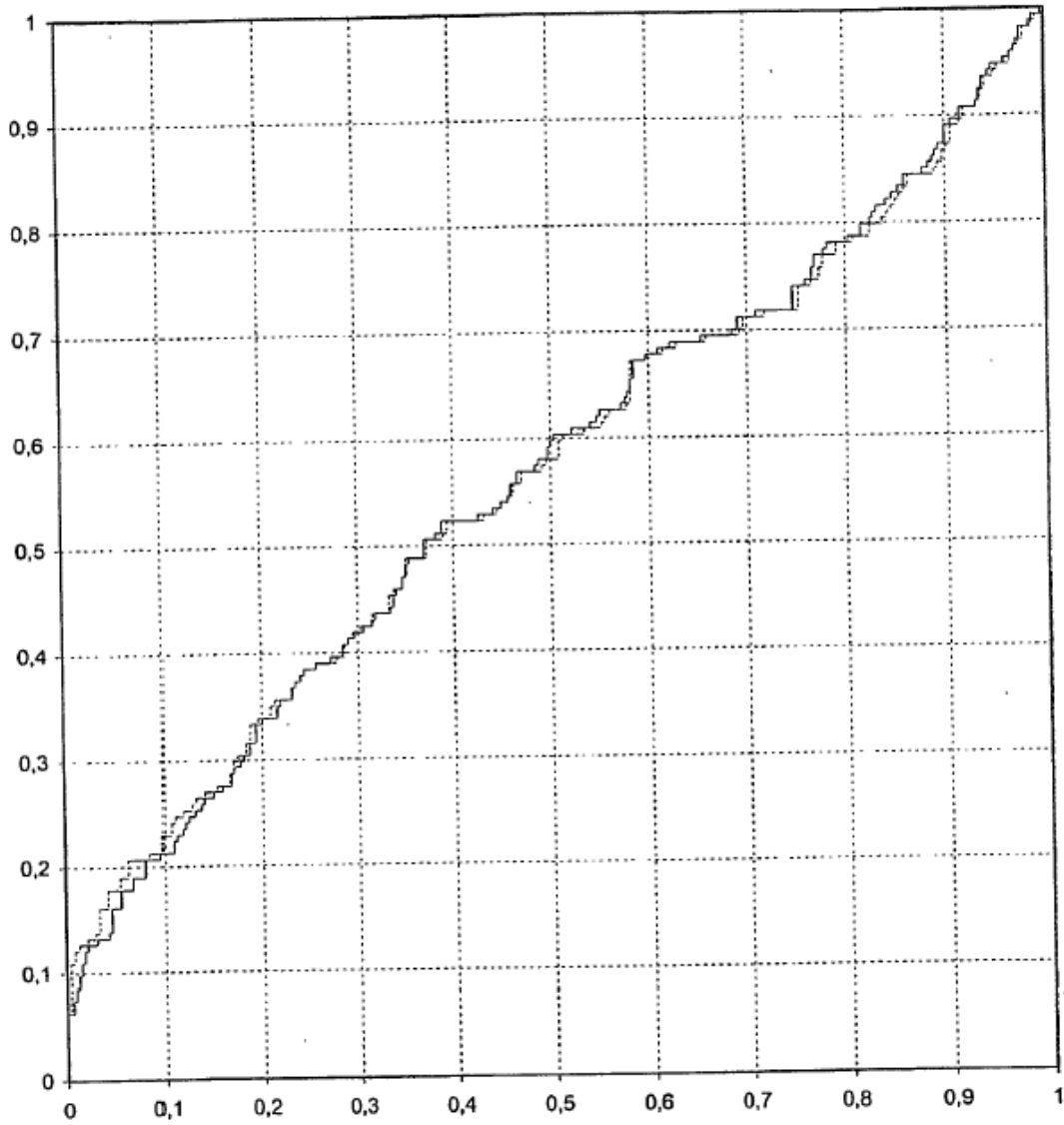


Figura 3



Figura 4

