

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 328**

21 Número de solicitud: 201131374

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**09.08.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**15.03.2013**

71 Solicitantes:

**ONCOMATRIX, S.L. (100.0%)  
Pque. Tecnológico de Bizkaia, Edif. 801-B, 2ª pta  
48160 Derio (Bizkaia) ES**

72 Inventor/es:

**BARNEO SERRA, Luis;  
GARCÍA PRAVIA, Carmen;  
DE LOS TOYOS GONZÁLEZ, Juan Ramón;  
GARCÍA OCAÑA, Marcos;  
VÁZQUEZ VILLA, José Fernando;  
FUENTES MARTÍNEZ, Nelson;  
DEL AMO IRIBARREN, Jokin y  
SIMON BUELA, Laureano**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **MÉTODOS Y PRODUCTOS PARA EL DIAGNÓSTICO IN VITRO, PRONÓSTICO IN VITRO Y  
DESARROLLO DE FÁRMACOS CONTRA CARCINOMAS INVASIVOS.**

57 Resumen:

Métodos y productos para el diagnóstico in vitro, pronóstico in vitro y desarrollo de fármacos contra carcinomas invasivos.

La presente invención se refiere a métodos y productos in vitro para detectar la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, para determinar y/o pronosticar el estadio y/o la invasividad de dicho carcinoma en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma basados en la expresión del gen col11a1 y de la proteína proCOL11A1. La invención también se refiere a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos. La invención también se refiere a agentes que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína proCOL11A1 y/o los efectos de esta expresión.

ES 2 398 328 A1

## DESCRIPCIÓN

Métodos y productos para el diagnóstico *in vitro*, pronóstico *in vitro* y desarrollo de fármacos contra carcinomas invasivos

5

## CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos y productos *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, para determinar y/o pronosticar el estadio y/o la invasividad de dicho carcinoma en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma. La invención también se refiere a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho carcinoma, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos. La invención también se refiere a agentes que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína proCOL11A1, y/o los efectos de esta expresión.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El Cáncer es uno de los principales problemas de salud pública a escala mundial. Según la base de datos GLOBOCAN, de la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, perteneciente a la Organización Mundial de la Salud, más de 10 millones de casos de cáncer se diagnosticaron en todo el mundo durante el año 2000, y el número de muertes debidas al cáncer el año 2.000 fue superior a 6 millones de personas.

20

A pesar de todos los avances que se han producido en los últimos 20 años, el cáncer es todavía una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Durante estos años se ha avanzado con éxito en la prevención y el tratamiento de estadios tempranos de muchas de las distintas enfermedades que se engloban en este término. Sin embargo muy pocos han sido los avances en el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico o de tratamiento de estadios avanzados e invasivos de la enfermedad.

25

Las células tumorales durante el proceso de malignización cambian su patrón de expresión génica, lo que altera procesos celulares, tales como el mantenimiento de la arquitectura celular, la adhesión, la muerte y la proliferación celular. Estas modificaciones no sólo generan cambios en las propias células, sino que hacen que algunas células del estroma reciban señales moleculares alteradas y cambien su pauta de comportamiento y su patrón de expresión génica, adquiriendo una morfología típica de miofibroblastos. Las moléculas secretadas por estos miofibroblastos en respuesta al tumor adyacente pueden a su vez contribuir de diferente manera a promover el crecimiento e invasión tumoral, de manera que se establece un bucle paracrino entre tumor y estroma. En los últimos años, se han generado evidencias científicas que apuntan cada vez con mayor precisión hacia el estroma peritumoral, como uno de los principales promotores de la invasividad tumoral, así como de fenómenos de resistencia a terapia.

30

35

Los métodos y productos para diagnóstico y terapia que los autores de la presente invención reivindican, se enmarcan en este novedoso marco de investigación, ya que se basan en la explotación del gen col11a1 y de la proteína proCOL11A1, presente en células del estroma de carcinomas invasivos, como potencial marcador y/o diana terapéutica para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos carcinomas.

40

Un carcinoma invasivo es una neoplasia maligna compuesta por células epiteliales que infiltran y destruyen los tejidos que las rodean; en general, se trata de tumores malignos que, en su crecimiento, infiltran y rompen la lámina basal dando lugar a metástasis. Ejemplos ilustrativos de carcinomas invasivos incluyen el cáncer de páncreas, el carcinoma renal, el carcinoma transicional de vejiga, el carcinoma bronquioalveolar, y el cáncer de mama, entre otros.

45

A diferencia de otros tumores, lo sorprendente del cáncer de páncreas es su homogeneidad clínica fenotípica. El comportamiento clínico del cáncer de páncreas es homogéneo y siempre infausto, sin diferencias notables en la supervivencia según el estadio. El número de pacientes con cáncer de páncreas de buen pronóstico es insignificante. Una posible explicación es que incluso en pacientes con tumores pequeños, encuadrados en el estadio I, la enfermedad está diseminada. Su diagnóstico en una fase inicial, salvo en casos fortuitos, es difícil; un 75% de los pacientes diagnosticados presentan enfermedad avanzada (Estadios III y IV). Se trata de una neoplasia muy agresiva, resistente a los tratamientos citostáticos y sólo entre un 1 y un 4% de los casos permanecen vivos a los cinco años del diagnóstico, siempre que el tumor esté localizado y haya podido ser extirpado en su totalidad (Warshaw A.L., and Fernandes.del Castillo C., N. Eng. J. Med., 1992, 326:455-465; Ahlgren J.D., Semin. Oncol. 1996, 23:241-250). El adenocarcinoma ductal de páncreas fue la causa de más de 138.000 muertes en el mundo, y de más de 2.600 en España, durante el año 2.008 (GLOBOCAN). Por todo ello, en el caso del cáncer de páncreas, tanto el desarrollo de sistemas de diagnóstico precoz como el de terapias eficaces, resultan cruciales para el control de la enfermedad (Byungwoo R., et al., Cancer Res., 2002, 62:819-826).

50

55

60

En el caso del carcinoma renal, el 50-60% de los pacientes diagnosticados desarrollan metástasis, y el 90-95% de estos pacientes que han desarrollado metástasis muere durante los 5 años siguientes al diagnóstico (Rabinovitch R.A., et al., J. Clin. Oncol., 1994, 12:206-212; Sandock, D.S., et al., J. Urol, 1995, 154:28-31). El carcinoma renal fue la causa de más de 72.000 muertes en el mundo, y de más de 1.200 en España, durante el año 2.008

65

(GLOBOCAN). Avances en el conocimiento de la Genética del cáncer de riñón han permitido la clasificación de distintos tipos de tumores renales. El subtipo más común es el carcinoma convencional de células renales, que es diferente de los subtipos papilar, cromóforo o ductal colector. El oncocitoma renal es una neoplasia benigna, indistinguible en ocasiones del carcinoma renal, que es una neoplasia maligna. Estudios previos han demostrado que todos estos subtipos histológicos son distintos genética y biológicamente, y que tanto su morfología como comportamiento están determinados por factores moleculares distintivos (Kovacs G., et al., J. Pathol., 1997, 183:131-133), pero todavía no hay ningún marcador que se haya demostrado útil en ensayos clínicos. El tratamiento del carcinoma renal es extremadamente difícil por su capacidad de extenderse sin producir síntomas, por su inherente resistencia a la quimioterapia sistémica convencional y por la incapacidad de la radioterapia para reducir los niveles de recaída tras la nefrectomía, incluso en pacientes con afectación nodal o tumores no reseccionados completamente (Kjaer M., et al., Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys., 1987, 13:665-672). Esto hace necesario el desarrollo de aproximaciones terapéuticas alternativas, para tratar los carcinomas renales con mayor eficacia.

El carcinoma transicional de vejiga fue la causa de más de 1.120.000 muertes en el mundo, y de más de 3.400 en España, durante el año 2.008 (GLOBOCAN). Los carcinomas de vejiga se gradúan desde G1 hasta G3 según la OMS (Organización Mundial de la Salud), por estado decreciente de diferenciación celular y creciente de agresividad de la enfermedad. Respecto al estadio, o invasividad, los carcinomas de células transicionales (TCCs) de vejiga se clasifican en superficial con y sin afectación de la lámina propia (Ta y T1), infiltrante de capas profundas (T2 a T4) y el poco común Carcinoma *in situ* o tumor *in situ* (TIS). Los tumores de bajo grado (G1) están normalmente confinados a la mucosa o infiltran capas superficiales (estadio Ta y T1). Nuevos sistemas de diagnóstico precoz son necesarios dado que el 80-90% de los pacientes en estadio T2 o mayor, son diagnosticados *de novo* en ese estadio de gran agresividad y no en estadios previos (de Vere White, R.W. and Stapp, E., Oncology, 1998, 12:1717-1723). El pronóstico de los pacientes afectados de carcinoma transicional de vejiga invasivo es malo; el 50% de estos pacientes en estadio T2 o mayor, desarrolla metástasis distantes durante los 2 años posteriores al diagnóstico, y el 69% muere durante los 5 años posteriores al diagnóstico, incluso habiendo recibido tratamiento. Son necesarias aproximaciones terapéuticas alternativas para tratar el carcinoma transicional de vejiga invasivo muscular con una mayor eficiencia; también son necesarias aproximaciones terapéuticas alternativas para tratar tumores superficiales de una forma más eficiente que la cirugía, o para complementarla, con el fin de evitar la recidiva y la progresión de tumores a invasividad.

El carcinoma bronquioloalveolar (CBA), también denominado carcinoma de células acinares es un subtipo de adenocarcinoma pulmonar con características suficientemente definidas para ser separado del resto de subtipos. Según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), el CBA es un adenocarcinoma en el que las células tumorales cilíndricas crecen sobre las paredes de un alveolo preexistente. Una característica clave de esta neoplasia, es la preservación del parénquima pulmonar subyacente a la misma. A pesar de que muchos adenocarcinomas pulmonares presentan áreas con patrón de crecimiento bronquioloalveolar, el diagnóstico de CBA debe quedar restringido a aquellas neoplasias que presenten únicamente éste patrón. Los CBA están compuestos fundamentalmente por dos tipos celulares, mucinosos o no mucinosos, siendo el último más común; muchos de los CBA no mucinosos presentan una región fibrosa central o foco de distorsión que puede simular invasión. En la mayoría de estudios los CBA comprenden del 1% al 5% de adenocarcinomas pulmonares, aunque algunos estudios recientes aumentan la incidencia al 15%. El 50% suelen presentarse sin sintomatología previa, como nódulos solitarios periféricos, muchas veces como hallazgo incidental en una radiografía de torax realizada por otras razones. Algunos de los CBA crecen lentamente por varios años sin diseminarse, sin embargo, otros que inicialmente comienzan como nódulos solitarios, desarrollan rápidamente metástasis y diseminación bilateral de la enfermedad. Los adenocarcinomas que presenten un patrón bronquioloalveolar, pero muestren algún foco de invasión estromal, deben denominarse adenocarcinomas con patrón bronquioloalveolar; éstos suelen mostrar un mayor grado de atipia, principalmente en el foco de invasión. Los adenocarcinomas bronquioloalveolares plantean diversos diagnósticos diferenciales, tanto con procesos malignos como benignos. Estos pueden resultar complicados; sin embargo, uno de los que más relevancia tiene es con el adenocarcinoma ordinario de pulmón, ya que la supervivencia de los CBA a 5 años es superior a éstos. Los CBA pueden presentar invasión vascular, linfática y pleural, sin embargo, la cirugía puede resultar curativa entre la mitad y dos tercios de los casos.

El cáncer de mama es la neoplasia con mayor tasa de incidencia y mortalidad entre las mujeres, de ahí que su diagnóstico precoz y tratamiento sean de vital importancia. En los últimos años, con la introducción de la genética en la medicina (en especial en la oncología médica), se han realizado diversos descubrimientos que influyen en el pronóstico y tratamiento del cáncer de mama, que han llevado a reclasificar esta patología en cuanto a su perfil genético; los descubrimientos más significativos han sido acerca del componente epitelial de estos tumores, fundamentalmente los factores de crecimiento epidérmico (EGFr y Her-2), que se han convertido en dianas terapéuticas al igual que los receptores de estrógenos y progesterona (Perou C., Sorlie T., Eisen M., 2000, Nature, 406:747-752; Nielsen T., Hsu F., Jensen K., 2004, Clin. Cancer Res, 10:5367-5374). Además, se han desarrollado una serie de marcadores inmunohistoquímicos, de gran utilidad para diferenciar entre lesiones benignas y malignas en los casos en que las técnicas histoquímicas convencionales son insuficientes. En la mama existen lesiones benignas esclerosantes, principalmente la adenosis esclerosante y la cicatriz radial que, en ocasiones (debido a su patrón morfológico), plantean dificultad en el diagnóstico diferencial con lesiones malignas infiltrantes (tales como el carcinoma tubular y carcinoma ductal infiltrante); esta situación es aún más compleja en biopsia con aguja gruesa,

ya que al no existir una representación total de la lesión no se pueden apreciar los contornos de la misma, lo cual es una de las claves para el diagnóstico diferencial, especialmente cuando con las tinciones habituales no se pueden reconocer las células basales mioepiteliales presentes en las lesiones benignas y ausentes en las lesiones malignas infiltrantes.

5 Existen marcadores inmunohistoquímicos (como la p63, la  $\alpha$ -actina, la miosina de cadenas pesadas para músculo liso, la calponina, la proteína s100, o el CD10) que tiñen las células mioepiteliales de los conductos mamarios, ayudando a diferenciar entre este tipo de lesiones. Dentro de estos marcadores, la  $\alpha$ -actina, la miosina de cadenas pesadas para el músculo liso y la calponina, presentan una alta sensibilidad (89%) para las células basales mioepiteliales; sin embargo, no son específicas de éstas, tiñendo igualmente a las células musculares lisas vasculares y a los miofibroblastos estromales; problemas semejantes se plantean con s100 y CD10 (Lerwill, M.F., 2004, Am J Surg Path, 28:1076-1091). Werling y colaboradores (Werling, R. W., Hwang, H., Yaziji, H., 2003, Am J Surg Path, 27:82-90) estudiaron una serie de casos correspondientes a adenosis esclerosante, carcinoma ductal infiltrante, carcinoma lobulillar y carcinoma ductal *in situ*, analizando el patrón de reactividad de los anticuerpos p63, miosina de músculo liso y calponina, demostrando que todos ellos tiñeron las células mioepiteliales de los casos benignos y malignos no infiltrantes, corroborando a su vez la positividad de miosina y calponina en miofibroblastos y células musculares lisas vasculares. En ese trabajo, p63 fue el marcador que menor reactividad cruzada presentó con los fibroblastos estromales, sin teñir ninguno de ellos, lo cual reveló su alta sensibilidad y especificidad para teñir células mioepiteliales en comparación con el resto de anticuerpos estudiados; no obstante, presentó algunas desventajas como la tinción en ocasiones discontinua de las células mioepiteliales (en particular en los carcinomas *in situ*) e, igualmente, la positividad focal hasta en un 11% de los casos de las células tumorales. Meryem y colaboradores describieron, por otra parte, la positividad con p63 de 13 casos de carcinoma mamario metaplásico de un total de 14 casos (Meryem, Koker, M., Kleer, C.G., 2004, Am J Surg Path, 28:1506-1512). Actualmente p63 es uno de los marcadores más usados para el diagnóstico diferencial entre lesiones benignas esclerosantes y malignas infiltrantes de la mama; sin embargo, hasta la fecha no existe ningún marcador estromal que ayude a diferenciar entre estas lesiones (Mattia Barbareschi, M., Pecciarini L., Cangi G., 2001, Am J Surg Path, 25:1054-1060). Existe una necesidad de marcadores específicos, en casos en los que las técnicas histoquímicas convencionales son insuficientes para diferenciar entre lesiones benignas esclerosantes y malignas infiltrantes de la mama.

30 El colágeno es el principal componente de la matriz extracelular (ECM). La correcta expresión de los genes que codifican para los distintos tipos de colágeno es necesaria para el correcto ensamblaje de la ECM durante el desarrollo embrionario y para su mantenimiento en el organismo adulto. El Colágeno XI (COL11) es un tipo de colágeno poco estudiado, pero juega un papel fundamental en la regulación de los entramados fibrilares en matrices cartilaginosa y no cartilaginosa (Li, Y., et al., Cell, 1995, 80:423-430); estos entramados de fibras están implicados en distintos procesos de morfogénesis durante el desarrollo embrionario en animales vertebrados. Se han encontrado transcritos de la cadena alpha 1 del Colágeno XI (COL11A1) durante el desarrollo fetal en tejidos cartilagosos y también en otros tejidos como hueso, riñón, piel, músculo, lengua, intestino, hígado, oído, cerebro y pulmón (Sandberg, J.M., et al., Biochem. J., 1993, 294:595-602; Yoshioka, H., et al., Dev. Dyn., 1995, 204: 41-47). La matriz extracelular tiene también un papel importante en determinados procesos biológicos, como la diferenciación, proliferación y migración celular; por tanto, la desregulación de la expresión de los genes que codifican para las proteínas que la componen, está asociada a procesos de carcinogénesis y metástasis (Boudreau, N., and Bissell, M.J., Curr. Opin. Cell Biol., 1998, 10:640-646; Stracke, M.L., et al., In vivo, 1994, 8:49-58). En el caso particular de COL11A1, se ha demostrado que los fibroblastos del estroma presentan niveles elevados de expresión del gen col11a1 en carcinomas colorrectales esporádicos, mientras que este gen no se expresa en colon sano (Fischer, H., et al., Carcinogenesis, 2001, 22:875-878). Se ha asociado también la expresión del gen col11a1 a cáncer de páncreas, mama, colon, pulmón, cabeza y cuello (Kim, H. et al., BMC Medical Genomics, 2010, 3:51; Iacobuzio-Donahue, C., Am. J. Pathology, 2002, 160(4):1239-1249; Ellsworth, R.E., et al., Clin. Exp. Metastasis, 2009, 26: 205-13; Feng, Y., et al., Breast Cancer Res. Treat., 2007, 103(3):319-329; J.Gast.Liv.dis., 2008; Fischer, H., et al., BMC Cancer, 2001, 1:17-18; Fischer, H., et al., Carcinogenesis, 2001, 22:875-878; Suceveanu, A.I., et al., J. Gastrointestin. Liver Dis, 2009, 18(1):33-38; Chong, IW, et al., Oncol Rep, 2006, 16(5):981-988; Whan, K., Oncogene, 2002, 21:7598-7604; **OncolRep**, 2007; Schmalbach., C.E., et al., Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 2004, 130(3):295-302) y vejiga (WO 2005/011619) y la expresión de la proteína COL11A1 a cáncer de páncreas y de colon (Pilarsky, C., et al., J. Cel. Mol. Med., 2008, 12(6B):2823-35; Erkan, M., et al., Mol. Cancer, 2010, 9:88-103; Bowen, K.B., et al., J. Hist. Cyt., 2008, 56(3):275-283); pero no se ha asociado la expresión del gen o la proteína COL11A1 a otros tipos de cáncer (por ejemplo, cáncer de riñón) y tampoco se ha asociado la expresión de la proteína COL11A1 al cáncer de mama, pulmón o cabeza y cuello (la expresión diferencial de un gen no infiere necesariamente la expresión diferencial de la proteína que codifica).

60 Aunque se dispone de algunos marcadores para diagnosticar diferentes tipos de cáncer y carcinomas, sigue existiendo la necesidad de identificar nuevos marcadores que permitan diferenciar entre diferentes tipos de cánceres y carcinomas cuyo pronóstico es muy diferente, por ejemplo, entre carcinomas renales y oncocitomas benignos renales, entre carcinoma transicional invasivo de vejiga y carcinomas transicionales superficiales de vejiga, entre adenocarcinomas infiltrantes de mama y adenosis esclerosantes de mama, y entre adenocarcinomas ductales de páncreas, pancreatitis y carcinomas de la ampolla de Vater (ampulomas), los cuales tienen mucho mejor pronóstico (21-61% de los pacientes sobreviven 5 años después del diagnóstico, frente al 1-5% de los adenocarcinomas

ductales) (Takao S., et al., 1998, Am. J. Surg., 176:467-470; Warshaw A.L. and Fernández-del Castillo, 1992, N. Eng. J. Med., 326:455-465).

Por otra parte, los colágenos son componentes de la matriz extracelular que se sintetizan como procolágenos. Estos procolágenos tienen un dominio central triple-hélice con una estructura en forma de bastón. Este dominio está flanqueado por propéptidos no colagénicos en los extremos N- y C- terminal; estos propéptidos son eliminados por peptidasas específicas al ser secretados al exterior de la célula, donde trímeros de colágeno se ensamblan para formar fibras. Los Procolágenos  $\alpha 1$  de los tipos V y XI (proCOL5A1 y proCOL11A1, respectivamente) están codificados por los genes col5a1 y col11a1, respectivamente. Presentan una homología de secuencia de aminoácidos del 75% aproximadamente. El subdominio VAR, en el propéptido N-terminal, presenta la mayor variación de secuencia entre colágenos. No obstante, los anticuerpos, algunos de ellos disponibles comercialmente, que se han utilizado hasta la actualidad para estudiar la expresión la proteína COL11A1, son anticuerpos policlonales que han sido desarrollados contra el dominio central triple-hélice, que está muy conservado entre distintos colágenos, por lo que no discriminan específicamente la expresión de COL11A1 de otros colágenos de similar secuencia aminoacídica, cuya expresión no varía necesariamente durante el proceso tumoral, por lo que pueden conducir a graves errores si se utilizan para el desarrollo de métodos y productos de diagnóstico y pronóstico de carcinomas. Este es el caso por ejemplo del anticuerpo anti-Col11A1 comercializado por la empresa Calbiochem, que presenta reactividad cruzada con la proteína COL9 (Colágeno IX), que no se expresa diferencialmente en carcinomas invasivos.

Recientemente se ha descrito el empleo de la proteína proCOL11A1 como marcador diferencial entre carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y patologías benignas de cabeza y cuello (García-Ocaña et al., Póster "Immunohistochemical validation of procollagen COL11A1 as a desmoplastic tumor stroma marker", 18 de noviembre de 2010, III Simposio Internacional del IUOPA, Oviedo); como marcador diferencial entre adenocarcinoma ductal infiltrante de mama y adenosis esclerosante (García Pravia et al., Abstract ESSR2009/218, "Anti-proCOL11A1, a new marker of infiltrating breast cancer", British J. Surgery, 2009, 96 (S5):11 ; García-Ocaña et al., Póster "Immunohistochemical validation of procollagen COL11A1 as a desmoplastic tumor stroma marker", 18 de noviembre de 2010, citado *supra*); y como marcador diferencial entre adenocarcinoma ductal pancreático y pancreatitis crónica [García Pravia et al., Abstract ESSR2009/272, "ProCOL11A1 is an efficient marker of pancreatic cancer" Bristish J. Surgery, 2009, 96 (S5):17; García-Ocaña et al., Póster "Immunohistochemical validation of procollagen COL11A1 as a desmoplastic tumor stroma marker", 18 de noviembre de 2010, citado *supra*].

No obstante, los anticuerpos disponibles hasta la fecha no permiten detectar específicamente la proteína proCOL11A1, por lo que el potencial empleo de dicha proteína como marcador diferencial entre distintas patologías, por ejemplo, entre patologías malignas y benignas, no puede ser puesto en práctica de forma fiable en toda su extensión.

Existe, por tanto, la necesidad de desarrollar anticuerpos que permitan detectar específicamente proCOL11A1. Dichos anticuerpos podrían ser utilizados para diferenciar entre diferentes patologías.

## COMPENDIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto, tras laboriosa investigación y empleando diferentes técnicas (DNA-chips y PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión génica), que la expresión del gen col11a1:

- muy elevada en carcinomas renales, pero no en oncocitomas benignos renales,
- muy elevada en carcinoma transicional invasivo de vejiga, pero no en carcinomas transicionales superficiales de vejiga,
- muy elevada en adenocarcinomas infiltrantes de mama, pero no en adenosis esclerosantes de mama, y
- muy elevada en adenocarcinomas ductales de páncreas, pero no en pancreatitis, ni en carcinomas de la ampolla de Vater (ampulomas).

Por otra parte, los autores de la presente invención han desarrollado anticuerpos policlonales y monoclonales específicamente frente al subdominio VAR, en el propéptido N-terminal de proCOL11A1, que presenta la mayor variación de secuencia entre colágenos, generando así anticuerpos que detectan específicamente proCOL11A1, discriminándolo específicamente de otros colágenos cuya expresión no varía durante el proceso tumoral. Los autores, utilizando estos anticuerpos específicos de proCOL11A1 en técnicas de western-blot y/o inmunohistoquímica, han descubierto que la concentración de la proteína proCOL11A1:

- está aumentada en carcinomas renales, pero no en oncocitomas benignos renales;
- está aumentada en carcinoma transicional invasivo de vejiga, pero no en carcinomas transicionales superficiales de vejiga;
- está aumentada en adenocarcinomas infiltrantes de mama, pero no en adenosis esclerosantes de mama;
- está aumentada en adenocarcinomas pulmonares con patrón bronquioalveolar, pero no en adenocarcinomas bronquioalveolares;

- está aumentada en carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello, pero no en otras patologías benignas de cabeza y cuello; está aumentada en adenocarcinomas de colon, pero no en otras patologías benignas de colon;
- está aumentada en adenocarcinomas ductales de páncreas, pero no en pancreatitis ni en ampulomas; y
- está aumentada en carcinomatosis peritoneales.

Estas evidencias convierten a dichos anticuerpos específicos de proCOL11A1 en los anticuerpos idóneos para el desarrollo de nuevos métodos y productos *in vitro* de diagnóstico y pronóstico de dichos carcinomas invasivos, y para el desarrollo de compuestos específicos para terapia de carcinomas, particularmente de carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello y/o carcinomatosis peritoneales.

La presente invención proporciona, por tanto, métodos y productos para detectar *in vitro*, con alta sensibilidad y especificidad, la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, para determinar o pronosticar el estadio o la severidad de dicho carcinoma en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, basado en la detección y/o cuantificación de la proteína proCol11A1, del mRNA del gen col11a1 o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo. Asimismo, la presente invención proporciona dianas o herramientas para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para la terapia de un carcinoma invasivo. La invención también proporciona agentes inhibidores de la expresión y/o actividad de la proteína proCOL11A1 para el tratamiento de un carcinoma invasivo. En una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello, y carcinomatosis peritoneales.

Por tanto, en un aspecto, la presente invención se relaciona con unos métodos y unos productos para detectar *in vitro*, con alta sensibilidad y especificidad, la presencia de carcinomas invasivos, para determinar o pronosticar el estadio o la severidad de dichos carcinomas en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dichos carcinomas, basados en la expresión del gen col11a1 y/o en la proteína proCOL11A1. En una realización dichos carcinomas invasivos se seleccionan entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello, y carcinomatosis peritoneales.

En otro aspecto, la invención se relaciona con unos métodos y unos productos para buscar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de compuestos para la terapia de carcinomas invasivos, basados en la expresión del gen col11a1 y/o en la proteína proCOL11A1. En una realización dichos carcinomas invasivos se seleccionan entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello, y carcinomatosis peritoneales.

En otro aspecto, la invención se relaciona con unos inhibidores de la expresión y/o actividad de la proteína proCOL11A1, o con unos inhibidores de la inducción de la expresión de la proteína proCOL11A1, o de sus efectos carcinogénicos, para su empleo en el tratamiento de carcinomas invasivos. En una realización particular, dichos carcinomas invasivos se seleccionan entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello, y carcinomatosis peritoneales. En otra realización particular, dicho inhibidor es el anticuerpo monoclonal identificado como 1E8.33 o una variante funcional del mismo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende al menos un agente inhibidor de la expresión y/o actividad de la proteína proCOL11A1, o un agente inhibidor de la inducción de la expresión de la proteína proCOL11A1, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Estos y otros aspectos inventivos y realizaciones particulares se describirán con mayor detalle en la descripción que sigue y en las reivindicaciones que la acompañan.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** Salida del programa Multalin v5.4.1. Alineamiento múltiple de las secuencias aminoacídicas de los colágenos tipo I-XXVII. Se muestra la región de máxima homología (aa 2.400-2.500).

**Figura 2:** Salida del programa Lalin v2.0. Comparación de las secuencias aminoacídicas de los colágenos tipo XI alfa 1 (COL11A1) y V alfa 1 (COL5A1). La región más divergente, seleccionada como candidata para sintetizar el inmunógeno, aparece sombreada.

**Figura 3:** Gráfico de hidrofobicidad de la proteína COL11A1. En color negro (más oscuro) aparece la región utilizada para diseñar el inmunógeno.

5 **Figura 4:** **A)** Visualización del producto de LCR-PCR; se observa amplificación del fragmento de proCOL11A1-T esperado de 444 nucleótidos de longitud. **B)** Resultado del *screening* de las colonias transformantes; las colonias 1-7 resultaron contener el fragmento proCOL11A1-T.

10 **Figura 5:** Confirmación por Western-blotting con anti-GST-COL11A1 de la identidad de las proteínas de fusión expresadas.

15 **Figura 6:** Verificación de la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal (AcM) 1E8.33 con el colágeno V. Calle 1: proCOL5A1 recombinante. Calle 2: pro-COL11A1-T. **A)** Gel teñido con azul de coomassie como control de carga de ambas proteínas. **B)** Western-Blot (WB) con el AcM 1E8.33; se observa una correcta detección de proCOL11A1 y ninguna detección de COL5A1.

20 **Figura 7:** Ensayos de inmunocitoquímica para comprobar la especificidad del AcM 1E8.33 para proCOL11A1 y la ausencia de reactividad cruzada con proCOL5A1. **A y B)** células de rhabdomyosarcoma A204, que expresan mayoritariamente proCOL11A1. **C y D)** Células de osteosarcoma SAOS-2, que expresan mayoritariamente proCOL5A1. **A y C)** detección mediante el AcM 1E8.33 (1E8.33 mAb). B y D) detección mediante el policlonal de conejo anti-proCOL5A1. Se observa tinción intensa de proCOL11A1 en células A204, pero no en células SAOS-2. El anticuerpo frente a proCOL5A1 mostró el patrón inverso.

25 **Figura 8:** Test de bloqueo del AcM 1E8.33, para localización del epítipo, realizado mediante western blot de células A204. La detección se realizó con una mezcla del anticuerpo y diferentes péptidos. Calle 1: control negativo sin anticuerpo. Calle 2: FQEYNYG. Calle 3: YNYGTMES. Calle 4: FQEYNYGTMES. Calle 5: YNYGTMESYQTE. Calle 6: YNYGTMESYQTEAPR. Calle 7: control positivo con el AcM 1E8.33 sin bloquear. Solo se observó bloqueo completo en la calle 6.

30 **Figura 9:** Detección inmunohistoquímica de la proteína proCOL11A1 en cortes histológicos de biopsias de páncreas procedentes de individuos con adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC). **(A)** Panorámica del adenocarcinoma ductal de páncreas infiltrante, 25X. **(B, C y D)** Detalle del tumor y estroma. Se observa tinción citoplasmática de los fibroblastos del estroma desmoplásico. 200X, 200X y 400X.

35 **Figura 10:** Detección inmunohistoquímica de la proteína proCOL11A1 en cortes histológicos de biopsias de páncreas procedentes de individuos con ampuloma **(A)** y de individuos con pancreatitis crónica **(B)**.

40 **Figura 11:** Detección inmunohistoquímica de proCOL11A1 en fibroblastos asociados a adenocarcinoma ductal de páncreas. Tinción con el AcM frente a proCOL11A1 (clon 1E8.33) (X400).

45 **Figura 12:** Inmunotinción de proCOL11A1 con el AcM 1E8.33 de tejido de mama con un tumor infiltrante **(A)** y de tejido de mama con adenosis esclerosante y sin presencia de tumor **(B)**. Se observa una clara tinción en el tejido tumoral, y no en el tejido benigno.

50 **Figura 13:** Tinción de un tejido de mama con un carcinoma ductal infiltrante **(A, C, E)** y de un tejido de mama con adenosis esclerosante y sin ningún tumor **(B, D, F)**, con hematoxilina-eosina **(A, B)**, con anticuerpo anti proCOL11A1 1E8.33 **(C, D)** y con anticuerpo anti p63, que es un marcador de mal pronóstico empleado actualmente en la caracterización de los tumores mamarios **(E, F)**. Se observa un patrón inverso entre la tinción de proCOL11A1 y la de p63, demostrando que proCOL11A1 resulta un indicador de agresividad tumoral.

55 **Figura 14:** Tinción de fibroblastos procedentes de cortes histológicos de biopsias de colon, procedentes de individuos con carcinoma de colon. Tinción con Eosina-Hematoxilina y AcM 1E8.33 frente a proCOL11A1.

**Figura 15:** Detección inmunohistoquímica de proCOL11A1 en fibroblastos procedentes de cortes histológicos de biopsias de laringe, procedentes de individuos con carcinoma de laringe. Tinción con el AcM anti proCOL11A1 (clon 1E8.33) (X400).

**Figura 16:** Tinción de fibroblastos procedentes de cortes histológicos de biopsias del estroma tumoral desmoplásico de implantes peritoneales, procedentes de individuos con adenocarcinomas de origen endometrial. Tinción con Eosina-Hematoxilina y con el AcM anti proCOL11A1 (clon 1E8.33).

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**Definiciones

- 5 Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, a continuación se expone el significado de algunos términos y expresiones tal y como se utilizan dentro del contexto de la presente invención.
- 10 El término “antagonista” se refiere a cualquier molécula que inhiba la actividad biológica de la molécula agonizada. Ejemplos de moléculas antagonistas incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos naturales y pequeñas moléculas orgánicas (de peso molecular inferior a 500 daltons).
- 15 El término “anticuerpo” se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina “antígeno”. El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio o “determinante” antigénico. Los “anticuerpos policlonales” incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.
- 20 El término “cáncer” o “carcinoma” se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.
- 25 El término “cáncer de cabeza y cuello” o “carcinoma de cabeza y cuello” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células de la cabeza o el cuello.
- El término “cáncer de colon” o “adenocarcinoma de colon” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células del colon.
- 30 El término “cáncer de mama” o “adenocarcinoma de mama” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células de la mama.
- El término “cáncer de páncreas” o “adenocarcinoma de páncreas” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células ductales del páncreas.
- 35 El término “cáncer de riñón” o “carcinoma renal” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células del riñón.
- El término “carcinoma transicional de vejiga” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células del epitelio transicional de vejiga.
- 40 El término “cDNA” se refiere a una secuencia de nucleótidos, complementaria de una secuencia de mRNA.
- El término “diana terapéutica” se refiere a secuencias nucleotídicas o peptídicas, contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un fármaco o compuesto terapéutico.
- 45 El término “DNA” se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de DNA es una secuencia de desoxirribonucleótidos.
- El término “epítipo”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.
- 50 El término “especificidad” se refiere a la detección de falsos positivos (diagnóstico positivo de carcinoma, cuando el paciente no está afectado de carcinoma); una especificidad del 100% significa que no hay falsos positivos.
- 55 El término “fase sólida”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos de materiales para fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos, por ejemplo agarosa, poli(acrilamida), poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Ejemplos de formas de fase sólida son el pocillo de una placa de ensayo o una columna de purificación.
- El término “gen” se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos, que codifica una proteína.
- 60 El término gen “col11a1” se refiere al gen que codifica un componente del colágeno XI denominado “cadena pro- $\alpha$ 1(XI)” que se combina con otras dos cadenas de colágeno (pro- $\alpha$ 2(XI) y pro- $\alpha$ 1(II)) para formar una molécula de procolágeno (proCOL11A1) que es procesada enzimáticamente en las células para formar las fibras de colágeno XI. El gen col11a1 humano (también conocido como COLL6 o STL2), cuya secuencia génica de referencia es NG\_008033.1, ocupa unas 150 kilobases (kb), contiene 68 exones, se localiza en el

- 5 cromosoma 1 (1p21) entre los pares de bases 103342023 y 103574052, y codifica una proteína de 1806 aminoácidos (según la isoforma) y 181 KDa que contiene un péptido-señal (aminoácidos 1-36). Este gen está conservado en humanos, chimpancé, vaca, pollo, ratón, rata y pez cebra. Mutaciones en este gen se han asociado a los síndromes Stickler II y Marshall. Polimorfismos de un nucleótido en este gen se han asociado a susceptibilidad de padecer hernia discal lumbar. Se han descrito varios transcritos que se diferencian principalmente en la transcripción de las variantes del exón 6, por ejemplo, uno de 7,2 kb, que codifica la isoforma A (NM\_001854.3 (GI:98985806), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011) de 1.806 aminoácidos, otro de 7,3 kb, que codifica la isoforma B (NM\_080629.2 base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011) de 1806 aminoácidos (GI:98985810), otro de 6,9 kb, que codifica la isoforma C (NM\_080630.3 (GI:299523252), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011) de 1690 aminoácidos (GI:299523253), otro de 7,2kb que codifica la isoforma E (NM\_001190709.1, base de datos NCBI a 1 de agosto de 2011) de 1767 aminoácidos (GI:299523257), etc. El término “col11a1”, tal y como se usa en la presente descripción, no se refiere únicamente al gen humano sino también a los ortólogos de otras especies. Se observa expresión baja y homogénea del gen col11a1 en todos los tejidos analizados excepto en adipocitos donde es notablemente más elevada (BioGPS: Gene Atlas U133A). En líneas celulares, se detecta expresión elevada en células UASMC (células de músculo liso de arteria umbilical), HN\_NP (precursores neuronales), HN\_Os (osteoblastos), Panc-1 (células de cáncer de páncreas), H522 (células de cáncer de pulmón) y U251 (células de glioma) (RefExA), A-204 (células de rhabdomyosarcoma de corazón), SAOS-2 (células de osteosarcoma de médula ósea) y SK-MEL28 (células de cáncer de piel) (GeneCards).
- 10
- 15
- 20 Los términos “individuo” o “sujeto” se refieren a miembros de especies de animales mamíferos, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.
- 25 El término “mRNA” se refiere al ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del RNA total que se traduce a proteínas.
- La expresión “mRNA transcrito de” se refiere a la transcripción del gen (DNA) en mRNA, como primer paso para que el gen se exprese y traduzca a proteína.
- 30 La expresión “niveles elevados” significa que los niveles medidos en pacientes afectados de un carcinoma invasivo, por ejemplo, carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga o adenocarcinoma ductal de páncreas, etc., son superiores a los niveles medidos en una población control de sujetos sin historial de dicho carcinoma invasivo.
- 35 El término “oligonucleótido cebador” o “cebador” se refiere a una secuencia nucleotídica, que es complementaria de una secuencia nucleotídica del gen col11a1. Cada cebador hibrida con su secuencia nucleotídica diana y actúa como un sitio de inicio para la polimerización del DNA.
- 40 Los términos “péptido” y “polipéptido” se refieren a un fragmento proteico. Los términos “proteína”, “péptido” y “polipéptido” se usan indistintamente en esta descripción.
- 45 El término “proCOL11A1” se refiere a la cadena  $\alpha 1$  del colágeno XI, cuyo procesamiento da lugar al colágeno XI  $\alpha 1$  (COL11A1). El proCOL11A1 tiene un dominio central triple-hélice con una estructura en forma de bastón, el cual está flanqueado por propéptidos no colagénicos en los extremos N- y C- terminal; estos propéptidos pueden ser eliminados por peptidasas específicas al ser secretados al exterior de la célula generando el COL11A1 maduro, donde cadenas  $\alpha 1$  de colágeno XI se ensamblan entre sí y con cadenas  $\alpha 2$  y/o  $\alpha 3$  para formar fibras de colágeno XI. El proCOL11A1 es codificado por el gen col11a1. Se han descrito varias isoformas de proCOL11A1 humano, por ejemplo, la isoforma A [NM\_001854.3 (GI:98985806), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011] de 1.806 aminoácidos, la isoforma B [NP\_542196.2 (GI:98985810), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011], la isoforma C [NM\_080630.3 (GI:299523252), base de datos NCBI a fecha 21 de julio de 2011], etc. El término “proCOL11A1”, tal y como se usa en la presente descripción, no se refiere únicamente a la proteína proCOL11A1 humana sino también a los ortólogos de otras especies.
- 50
- 55 El gen COL11A1 codifica una proteína de 1806 aminoácidos, que presenta su región triple helicoidal entre los aminoácidos 529 y 1542. Posee dos dominios que no siempre están presentes en la proteína madura, el C-terminal (aminoácidos 1564-1806) y el N-terminal (aminoácidos 37-511). Forma parte del colágeno tipo XI, que en el cartílago está formado por tres cadenas que forman una triple hélice, la  $\alpha 1(XI)$ , la  $\alpha 2(XI)$  (codificada por el gen COL11A2) y la  $\alpha 3(XI)$  (generada por sobreglicosilación de  $\alpha 1(II)$ ) que puede ser sustituida por la  $\alpha 1(V)$ . Es un componente de la matriz extracelular del cartílago hialino, aunque también se expresa en tejidos no cartilaginosos y en líneas celulares tumorales o transformadas por virus, pero en este caso no siempre se coexpresan las tres cadenas del colágeno tipo XI, lo que podría significar que las fibras presentarían una composición de cadenas diferente a la del cartílago, homotrimérica o heterotípica en estas localizaciones (Yoshioka, H., J Biol Chem, 1990; 265(11):6423-6426; Lui, LCH, Biochem J, 1995; 311:511-516). Se cree que participa en la fibrillogénesis, regulando el crecimiento lateral de las fibras de colágeno II, sirviendo de soporte para éstas, y situándose en el interior de la fibra formada (Weis, MA., J Biol Chem 2010; 285(4):2580-2590). Se sintetiza como procolágeno, que es proteolíticamente procesado tras la secreción, eliminándose los péptidos N (37-511) y C (1564-1806) terminales (Halsted, KC., Mod Pathol 2008;
- 65

21(10):1246-1254). Dentro del péptido amino terminal (NTD) está contenida una región Npp (amino propeptide) o TSP (38-229), que aparece también en otros 7 tipos de colágenos, en la laminina y en la trombospondina, y contiene un sitio de procesamiento para BMP-1 (Warner, L., J Biol Chem 2006; 281(51):39507-39515, Gregory, KE., J Biol Chem 2000; 275(15): 11498-11506). En el caso de  $\alpha 1(XI)$ , esta región no siempre es eliminada, quedando en ocasiones expuesta en la superficie de las fibras de colágeno por largo tiempo (Fallahi, A., Prot Sci 2005; 14:1526-1537). Esta región es muy similar a los dominios LNS, presentando sitios de unión potenciales para heparina y calcio, lo que podría significar una actividad de comunicación célula-ME por unión a los proteoglicanos de heparán sulfato (Warner, L., J Biol Chem 2006; 281(51):39507-39515, Fallahi, A., Prot Sci 2005; 14:1526-1537), incluso después de ser proteolizada del dominio helicoidal. Además, el NTD abarca una región variable, que presenta secuencias y características diferentes según el splicing alternativo, combinando los exones 6-7-8 del gen. Estas variantes presentan especificidad tisular y temporal (Warner, L., J Biol Chem 2006; 281(51):39507-39515), e influyen en el tiempo de procesamiento del Npp.

El término “proteína” se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, con una actividad biológica. El término incluye todas las formas de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación o acetilación.

El término “RNA” se refiere al ácido ribonucleico. Una secuencia de RNA es una secuencia de ribonucleótidos.

El término “secuencia de nucleótidos” o “secuencia nucleotídica” se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (RNA) o de desoxirribonucleótidos (DNA).

El término “sensibilidad” se refiere a la detección de falsos negativos (diagnóstico negativo de carcinoma, cuando el paciente está afectado de carcinoma); una sensibilidad del 100% significa que no hay falsos negativos.

El término “sonda” se refiere a una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica derivada del gen col11a1, que se puede utilizar para detectar esa secuencia nucleotídica derivada del gen col11a1.

El término “tumor” se refiere a cualquier masa anormal de tejido producto de un proceso neoplásico, benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

#### Métodos de diagnóstico/pronóstico

La presente invención se basa, entre otras cuestiones, en el descubrimiento de que tanto la expresión génica del gen col11a1, como la concentración de la proteína proCOL11A1 se ven incrementadas en carcinomas invasivos, en particular, en carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinomas escamosos infiltrantes de cabeza y cuello, y carcinomatosis peritoneales.

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, para determinar o pronosticar la malignidad, la invasividad, el estadio y/o la severidad de dicho carcinoma en un individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo; y
- b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control; y
- c) correlacionar el resultado obtenido con la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, la determinación o pronóstico de la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo, o la monitorización del efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo;

con la condición de que dicho carcinoma invasivo no es adenocarcinoma ductal infiltrante de mama ni adenocarcinoma ductal pancreático;

o, alternativamente

- a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo; y
- b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control; y

- c) correlacionar el resultado obtenido con la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, la determinación o pronóstico de la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo, o la monitorización del efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo;

con la condición de que dicho carcinoma invasivo no es carcinoma de vejiga y de que dicho carcinoma cuya invasividad se desea conocer no es cáncer de mama, colon, pulmón u ovario.

En una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona del grupo formado por carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

El primer método de la presente invención es un método de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de un carcinoma invasivo, presentan niveles elevados de mRNA transcrito del gen col11a1 ("niveles elevados de expresión del gen col11a1"), o concentraciones elevadas de la proteína codificada por el gen col11a1 ("proteína proCOL11A1"), en términos absolutos o en comparación con los correspondientes niveles en muestras control, procedentes de sujetos sin historial clínico de estos carcinomas o bien de cultivos de células que no expresan el gen col11a1 y/o no expresan la proteína proCOL11A1 (controles negativos).

Para la puesta en práctica del primer método de la invención, se obtiene una muestra, tal como una muestra biológica, del individuo a estudiar. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichas muestras incluyen distintos tipos de fluidos biológicos, tales como bilis, exudado de flujo gástrico, heces, orina, plasma, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido peritoneal, líquido pleural, líquido sinovial, orina, saliva, sangre, semen, suero, etc. Estas muestras de fluidos biológicos pueden ser obtenidas por cualquier método convencional conocido por los técnicos en la materia. Alternativamente, dicha muestra también puede ser una muestra de tejido del órgano afectado, por ejemplo páncreas, vejiga, riñón, etc., que puede obtenerse por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante biopsia, cistoscopia, resección quirúrgica, etc.

Las muestras a analizar pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de un determinado tipo de carcinoma invasivo; o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra un carcinoma invasivo, en particular contra ese determinado tipo de carcinoma.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende detectar y/o cuantificar de la proteína proCOL11A1, en una muestra de dicho individuo y su comparación con el de una muestra control, en donde la detección o un incremento en la cantidad (concentración o nivel) de dicha proteína con respecto a la cantidad de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra control es indicativo de carcinoma invasivo.

La cantidad de proteína proCOL11A1 presente en dichas muestras puede ser cuantificada mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dicha proteína en las muestras a analizar. En este caso, el primer método de la invención incluye la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener un extracto proteico que contenga dicha proteína, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar la cantidad de proCOL11A1. A modo ilustrativo, no limitativo, la cantidad de dicha proteína puede ser cuantificada mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a proCOL11A1 y posterior cuantificación de los complejos formados. En una realización particular, el primer método de la invención comprende poner en contacto el extracto de proteínas de la muestra con una composición que comprende uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína proCOL11A1, y , posteriormente detectar y/o cuantificar los complejos formados por dichos anticuerpos y la proteína COL11A1.

Existe una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y/o cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo; numerosos ensayos de unión de proteínas, competitivos y no competitivos, han sido previamente descritos, y un gran número de estos ensayos está disponible comercialmente. Así, la proteína proCOL11A1 se puede cuantificar con anticuerpos como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína proCOL11A1; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano. Existen anticuerpos que se unen a la proteína proCOL11A1, que están disponibles comercialmente o han sido descritos en la literatura científica; sin embargo, estos anticuerpos están desarrollados contra el dominio central triple-hélice de COL11A1, que está muy conservado entre distintos colágenos, por lo que no discriminan específicamente la expresión de COL11A1 de otros colágenos de similar secuencia aminoacídica, cuya expresión no varía necesariamente durante el proceso tumoral, por lo que pueden conducir a graves errores si se utilizan para el desarrollo de métodos y productos de diagnóstico y pronóstico de carcinomas. Los autores de la presente invención han desarrollado anticuerpos policlonales y monoclonales específicamente contra el subdominio VAR, en el

propéptido N-terminal de proCOL11A1, que presenta la mayor variación de secuencia entre colágenos, generando así anticuerpos que detectan específicamente proCOL11A1, discriminándolo específicamente de otros colágenos cuya expresión no varía durante el proceso tumoral. En una realización particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal identificado como 1E8.33, cuyas características se describen más adelante.

Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no; los anticuerpos no marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos. Las moléculas marcadoras que se pueden utilizar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleótidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados.

Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioimmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Competitive enzyme immunoassay o Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (Double antibody sandwich-ELISA o ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas de detección multiplex, basadas en el empleo de microsferas, biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos, o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como *dipsticks*. Otras maneras para detectar y cuantificar la proteína proCOL11A1, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

El primer método de la invención también comprende la etapa de comparar la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1, determinada en la muestra del individuo objeto de estudio, con la cantidad de proteína proCOL11 de la muestra control (valor de referencia). En una realización particular, la muestra control es una muestra procedente de individuos sin historial clínico de carcinoma invasivo, en cuyo caso, los resultados obtenidos podrían tener valor diagnóstico o pronóstico de malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma en el individuo. En otra realización particular, dicha muestra control es una muestra procedente del mismo individuo pero sometido a tratamiento, en cuyo caso, los resultados obtenidos podrían tener valor para monitorizar el efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma. Adicionalmente, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa la proteína proCOL11A1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa la proteína proCOL11A1.

Adicionalmente, el primer método de la invención comprende la etapa de correlacionar el resultado obtenido al comparar la presencia y/o cantidad de la proteína proCOL11A1, determinada en la muestra del individuo objeto de estudio, con la cantidad de proteína proCOL11 de la muestra control, con la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, la determinación o pronóstico de la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo, o la monitorización del efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo.

De acuerdo con el primer método de la invención, la detección o un incremento en la cantidad de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de dicha proteína proCOL11A1 en dicha muestra control es indicativa de carcinoma invasivo. Dicha información también puede ser utilizada para determinar o evaluar o pronosticar la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo; en este sentido, el experto en la materia, a la vista de la experiencia que hay ido adquiriendo, podrá correlacionar la cantidad de proteína proCOL11A1 determinada en la muestra del individuo bajo estudio con la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo. Asimismo, cuando la muestra control es una muestra del propio individuo diagnosticado de un carcinoma invasivo, analizada antes o durante la administración de una terapia para tratar dicho carcinoma invasivo, la información relativa a la detección o a la variación en la cantidad de dicha proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo en un momento dado, posterior a la administración de dicha terapia, puede servir para monitorizar o evaluar el efecto o eficacia de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo y, en caso de que dicha terapia no sea eficaz, evaluar la posibilidad de cambiarla.

Esta realización particular del primer método de la invención es útil para la detección de carcinomas invasivos, con la condición de que dicho carcinoma no es adenocarcinoma ductal infiltrante de mama ni adenocarcinoma ductal pancreático.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende cuantificar el nivel de expresión del gen col11a1 en una muestra de dicho individuo y su comparación con el de una muestra control, en donde un incremento en el nivel de expresión de dicho gen respecto al nivel de dicho gen col11a1 en la muestra control es indicativo de un carcinoma invasivo.

El nivel de expresión de un gen puede ser cuantificado mediante la cuantificación del nivel de mRNA codificante de dicho gen (col11a1), o, alternativamente, del nivel del DNA complementario (cDNA) a dicho mRNA. En este caso, el

método de la invención incluye la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener el RNA total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532; Molina, M.A., et al., Cancer Res., 1999, 59: 4356-4362).

5 Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y/o cuantificar los niveles de mRNA del gen col11a1 o de su correspondiente cDNA. A modo ilustrativo, no limitativo, el nivel del mRNA del gen col11a1 puede ser cuantificado mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del mRNA y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho mRNA, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Southern blot y empleo de sondas apropiadas, Northern blot y empleo de sondas específicas del mRNA del gen col11a1 o de cDNA correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-LCR, hibridación, microarrays, etc. En una realización particular la amplificación y cuantificación del mRNA correspondiente al gen col11a1 se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR). Análogamente, el nivel del cDNA correspondiente a dicho mRNA del gen col11a1 también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente cDNA mediante transcripción inversa (RT) del mRNA correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho cDNA. En una realización particular, la amplificación se lleva a cabo de manera cualitativa o cuantitativa, mediante una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, PCR o RT-PCT, usando oligonucleótidos cebadores que amplifican específicamente una región del gen col11a1; en una realización particular, dicha RT-PCR se lleva a cabo en presencia de la pareja de oligonucleótidos cebadores cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 1 (5'-TGGTGATCAGAATCAGAAGTTCG-3') y SEQ ID NO: 2 (5'-AGGAGAGTTGAGAATTGGGAATC-3').

El primer método de la invención también comprende la etapa de comparar la presencia y/o cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control. En una realización particular, la muestra control es una muestra procedente de individuos sin historial clínico de carcinoma invasivo, en cuyo caso, los resultados obtenidos podrían tener valor diagnóstico o pronóstico de malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma en el individuo. En otra realización particular, dicha muestra control es una muestra procedente del mismo individuo pero sometido a tratamiento, en cuyo caso, los resultados obtenidos podrían tener valor para monitorizar el efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma. Adicionalmente, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

Adicionalmente, el primer método de la invención comprende la etapa de correlacionar el resultado obtenido al comparar la presencia y/o cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control, con la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, la determinación o pronóstico de la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo, o la monitorización del efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo.

De acuerdo con el primer método de la invención, la detección o un incremento en la cantidad de dicho mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma invasivo. Dicha información también puede ser utilizada para determinar o evaluar o pronosticar la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo; en este sentido, el experto en la materia, a la vista de la experiencia que hay ido adquiriendo, podrá correlacionar la cantidad de mRNA del gen col11a1 o la cantidad del correspondiente cDNA determinada en la muestra del individuo bajo estudio con la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo. Asimismo, cuando la muestra control es una muestra del propio individuo diagnosticado de un carcinoma invasivo, analizada antes o durante la administración de una terapia para tratar dicho carcinoma invasivo, la información relativa a la detección o a la variación en la cantidad de dicho mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en la muestra de dicho individuo en un momento dado, posterior a la administración de dicha terapia, puede servir para monitorizar o evaluar el efecto o eficacia de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo y, en caso de que dicha terapia no sea eficaz, evaluar la posibilidad de cambiarla.

Esta realización particular del primer método de la invención puede ser utilizada para detectar un carcinoma invasivo, con la condición de que dicho carcinoma invasivo no es carcinoma de vejiga y de que dicho carcinoma cuya invasividad se desea conocer no es cáncer de mama, colon, pulmón u ovario.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar diferencialmente un carcinoma transicional de vejiga invasivo frente a un carcinoma transicional de vejiga superficial, en un individuo, en adelante "segundo método de la invención", que comprende:

65

- 5
- a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo, y
  - b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control,
- en donde la detección o un incremento en la cantidad de proteína proCOL11A1 en dicha muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en dicha muestra control es indicativa de carcinoma transicional de vejiga invasivo;

10 o, alternativamente

- a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y
  - b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control,
- 20 en donde un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma transicional de vejiga invasivo.

25 Las características de la muestra del individuo, su obtención y preparación para obtener un extracto de proteínas sobre el que detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, o para obtener un extracto de ácidos nucleicos (e.g., RNA total, etc.) sobre el que detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

30 Asimismo, los métodos para detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, y para detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

35 La muestra control, en una realización particular, es una muestra procedente de uno o de un pool de individuos sanos o diagnosticados fidedignamente como individuos que padecen carcinoma transicional de vejiga superficial. Asimismo, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

40 De acuerdo con el segundo método de la invención, tras la comparación de los resultados obtenidos en la muestra del individuo bajo estudio con los resultados de la muestra control (o valor de referencia), la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en la muestra control es indicativa de carcinoma transicional de vejiga invasivo, o alternativamente, un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma transicional de vejiga invasivo.

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar diferencialmente un carcinoma renal frente a un oncocitoma, en un individuo, en adelante "tercer método de la invención", que comprende:

- 50
- a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo, y
  - b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control,
- 55 en donde la detección o un incremento en la cantidad de proteína proCOL11A1 en dicha muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en dicha muestra control es indicativa de carcinoma renal;

o, alternativamente

- a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y
  - b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control,
- 65

en donde un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma renal.

5 Las características de la muestra del individuo, su obtención y preparación para obtener un extracto de proteínas sobre el que detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, o para obtener un extracto de ácidos nucleicos (e.g., RNA total, etc.) sobre el que detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

10 Asimismo, los métodos para detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, y para detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

15 La muestra control, en una realización particular, es una muestra procedente de uno o de un pool de individuos sanos o diagnosticados fidedignamente como individuos que padecen oncocitoma. Asimismo, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

20 De acuerdo con el tercer método de la invención, tras la comparación de los resultados obtenidos en la muestra del individuo bajo estudio con los resultados de la muestra control (o valor de referencia), la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en la muestra control es indicativa de carcinoma renal, o alternativamente, un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma renal.

25 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar diferencialmente un adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar frente a un adenocarcinoma bronquioalveolar, en un individuo, "cuarto método de la invención", que comprende:

- 30 a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo, y  
 b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control,

35 en donde la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en dicha muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquiolo-alveolar;

40 o, alternativamente

- a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y  
 45 b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control,

50 en donde un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar.

55 Las características de la muestra del individuo, su obtención y preparación para obtener un extracto de proteínas sobre el que detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, o para obtener un extracto de ácidos nucleicos (e.g., RNA total, etc.) sobre el que detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

60 Asimismo, los métodos para detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, y para detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

La muestra control, en una realización particular, es una muestra procedente de uno o de un pool de individuos sanos o diagnosticados fidedignamente como individuos que padecen adenocarcinoma bronquioalveolar. Asimismo,

si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

5 De acuerdo con el cuarto método de la invención, tras la comparación de los resultados obtenidos en la muestra del individuo bajo estudio con los resultados de la muestra control (o valor de referencia), la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra control es indicativa de adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar, o alternativamente, un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar diferencialmente un adenocarcinoma de colon frente a una fibrosis benigna, en adelante "quinto método de la invención", que comprende:

15 a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo, y  
b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control,

20 en donde la detección o un incremento en la cantidad de proteína proCOL11A1 en dicha muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A1 en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma de colon;

25 o, alternativamente

a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

30 b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control,

35 en donde un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma de colon.

40 Las características de la muestra del individuo, su obtención y preparación para obtener un extracto de proteínas sobre el que detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, o para obtener un extracto de ácidos nucleicos (e.g., RNA total, etc.) sobre el que detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

45 Asimismo, los métodos para detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, y para detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

50 La muestra control, en una realización particular, es una muestra procedente de uno o de un pool de individuos sanos o diagnosticados fidedignamente como individuos que padecen fibrosis benigna. Asimismo, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

55 De acuerdo con el quinto método de la invención, tras la comparación de los resultados obtenidos en la muestra del individuo bajo estudio con los resultados de la muestra control (o valor de referencia), la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra control es indicativa de adenocarcinoma de colon, o alternativamente, un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma de colon.

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar diferencialmente un carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello frente a una patología benigna de cabeza y cuello, en un individuo, en adelante "sexto método de la invención", que comprende:

65 a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo, y

- b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control,

5 en donde la detección o un incremento en la cantidad de proteína proCOL11A1 en dicha muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en dicha muestra control es indicativa de carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello;

10 o, alternativamente

- a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

15 b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control,

20 en donde un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello.

25 Las características de la muestra del individuo, su obtención y preparación para obtener un extracto de proteínas sobre el que detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, o para obtener un extracto de ácidos nucleicos (e.g., RNA total, etc.) sobre el que detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

30 Asimismo, los métodos para detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, y para detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

35 La muestra control, en una realización particular, es una muestra procedente de uno o de un pool de individuos sanos o diagnosticados fidedignamente como individuos que padecen una patología benigna de cabeza y cuello como inflamación, úlcera, hiperplasia, leucoqueratosis, liquen erosivo o fibrosis. Asimismo, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

40 De acuerdo con el sexto método de la invención, tras la comparación de los resultados obtenidos en la muestra del individuo bajo estudio con los resultados de la muestra control (o valor de referencia), la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en la muestra control es indicativa de carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello, o alternativamente, un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello.

45 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar diferencialmente un adenocarcinoma ductal de páncreas frente a un ampuloma, en un individuo, que comprende:

- 50 a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo, y

- b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control,

55 en donde la detección o un incremento en la cantidad de proteína proCOL11A1 en dicha muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma ductal de páncreas;

o, alternativamente

- 60 a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

65 b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control,

en donde un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma ductal de páncreas.

5 Las características de la muestra del individuo, su obtención y preparación para obtener un extracto de proteínas sobre el que detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, o para obtener un extracto de ácidos nucleicos (e.g., RNA total, etc.) sobre el que detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

10 Asimismo, los métodos para detectar y/o cuantificar la proteína proCOL11A1, y para detectar y/o cuantificar el mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA ya han sido mencionados en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

15 La muestra control, en una realización particular, es una muestra procedente de uno o de un pool de individuos sanos o diagnosticados fidedignamente como individuos que padecen pancreatitis crónica o ampuloma. Asimismo, si se desea, se pueden usar un control positivo, por ejemplo, una línea celular que expresa el gen col11a1, y/o un control negativo, por ejemplo, una línea celular que no expresa el gen col11a1.

20 De acuerdo con el séptimo método de la invención, tras la comparación de los resultados obtenidos en la muestra del individuo bajo estudio con los resultados de la muestra control (o valor de referencia), la detección o un incremento en el nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra de dicho individuo con respecto al nivel de proteína proCOL11A1 en la muestra control es indicativa de adenocarcinoma ductal de páncreas, o alternativamente, un incremento en la cantidad de mRNA del gen col11a1 o en la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra de dicho individuo con respecto a la cantidad de mRNA del gen col11a1 o a la cantidad del correspondiente cDNA en dicha muestra control es indicativa de adenocarcinoma ductal de páncreas.

#### Métodos de screening

30 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de un compuesto para terapia de un carcinoma invasivo, que comprende:

- a) poner en contacto un cultivo de células tumorales con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,
- 35 b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen col11a1 o de la proteína proCOL11A1, y
- c) comparar dichos niveles de expresión con los niveles de expresión de dicho gen col11a1 o de dicha proteína proCOL11A1 en un cultivo control de células tumorales sin tratar con dicho compuesto candidato.

40 Las células tumorales pueden proceder de cualquier carcinoma invasivo; no obstante, en una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

45 La cuantificación de los niveles de expresión del gen col11a1 o de la proteína proCOL11A1 se realizan de modo semejante a como se ha indicado en relación con el primer método de la invención, incorporado aquí por referencia.

50 Cuando un compuesto disminuye los niveles de expresión del gen col11a1, o de la proteína proCOL11A1, o revierte los efectos de la expresión elevada de dicho gen, preferiblemente disminuyendo los niveles de proliferación celular, ese compuesto se convierte en candidato para la terapia del carcinoma invasivo.

55 En una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

#### Inhibidores de proCOL11A1 y sus aplicaciones

60 En otro aspecto de la invención se relaciona con un inhibidor de proCOL11A1. En el contexto de la presente invención, se entiende por "inhibidor de proCOL11A1" a un compuesto que inhibe o disminuye la expresión y/o actividad de la proteína proCOL11A1, o que inhibe los efectos carcinogénicos de la inducción de la expresión de la proteína proCOL11A1, e incluye cualquier compuesto que sea capaz de impedir o bloquear la transcripción y/o la

65

traducción del gen col11a1 (es decir, impedir o bloquear la expresión de dicho gen), o que sea capaz de impedir que la proteína codificada por dicho gen proCOL11A1 realice su función (actividad); es decir, dicho término “inhibidor de proCOL11A1” incluye compuestos que actúan bien a nivel del RNA (e.g., oligonucleótidos antisentido (“antisense”), shRNA, siRNA, etc.), o bien a nivel de la proteína (e.g., anticuerpos, péptidos, compuestos orgánicos pequeños o moléculas pequeñas, etc.).

A modo ilustrativo, no limitativo, entre los inhibidores de proCOL11A1 se encuentran agentes inhibidores de la expresión del gen col11a1 adecuados para su uso en la presente invención, e incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido específicos para el gen que col11a1, microARNs específicos, ARNs catalíticos o ribozimas específicos, ARNs de interferencia (ARNi) específicos, ARNs con actividad “decoy”, es decir, con capacidad para unirse específicamente a un factor (proteico generalmente) importante para la expresión del gen, de manera que la expresión del gen de interés, en este caso col11a1 sea inhibida, etc. Otros ejemplos ilustrativos, no limitativos, de inhibidores de proCOL11A1 incluyen compuestos o sustancias capaces de impedir que la proteína proCOL11A1 realice su función o actividad, por ejemplo, péptidos inhibidores de proCOL11A1, anticuerpos dirigidos específicamente contra epítopos de proCOL11A1, así como compuestos químicos de naturaleza no peptídica que reducen o inhiben la función de la proteína proCOL11A1.

Los inhibidores de proCOL11A1 pueden ser identificados y evaluados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención; en particular, el método de screening previamente descrito puede ser utilizado. No obstante, pueden utilizarse otro tipo de métodos apropiados para identificar y evaluar inhibidores de proCOL11A1.

Los compuestos que provocan la reducción de los niveles de mRNA de col11a1 pueden ser identificados usando ensayos estándar para determinar los niveles de expresión de mRNA, tales como los mencionados en relación con el primer método de la invención. Los compuestos que provocan la reducción de los niveles proteicos de proCOL11A1 pueden ser identificados usando ensayos estándar para la determinación de niveles de expresión proteica tales como los mencionados en relación con el primer método de la invención.

Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de inhibidores de proCOL11A1, incluyen:

- a) anticuerpos específicos contra uno o más epítopos presentes en la proteína proCOL11A1, preferiblemente anticuerpos monoclonales humanos o humanizados, o fragmentos funcionales de los mismos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos anti-idiotipo, etc.; en una realización particular, dicho anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 1E8.33, una variante del mismo, cuyas características se mencionan más adelante;
- b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, siRNAs, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína proCOL11A1; y
- c) compuestos antagonistas de la proteína proCOL11A1, que inhiben una o más de las funciones de dicha proteína proCOL11A1.

En otro aspecto de la invención se relaciona con un inhibidor de proCOL11A1, para su empleo en el tratamiento de un carcinoma invasivo, o, expresado en otros términos, con el empleo de un inhibidor de proCOL11A1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un carcinoma invasivo. En una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

En una realización particular, dicho inhibidor de proCOL11A1 es un anticuerpo que se une a proCOL11A1; ventajosamente, dicho anticuerpo se unirá específicamente a un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la proteína proCOL11A1, ya que dicho dominio presenta la mayor variación de secuencia entre los distintos colágenos, lo que permite generar anticuerpos que se unen específicamente a proCOL11A1, y permiten detectar específicamente dicha proteína proCOL11A1, y discriminarla de otros colágenos cuya expresión no varía durante el proceso tumoral.

#### Anticuerpo de la invención y sus aplicaciones

Tal como se ha mencionado previamente, en una realización particular, la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a proCOL11A1, en adelante “anticuerpo de la invención”, que comprende, dentro de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>), analizada por el método IMGT/V-QUEST (ver más adelante), al menos una región determinante de complementariedad o “CDR” (del inglés “complementarity determining region”) seleccionada entre:

- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 (GYSFTGY) [CDR-H1] o una variante de la misma;
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 (INCYNGAT) [CDR-H2] o una variante de la misma; y
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 (AIWDYEFHVMDY) [CDR-H3] o una variante de la misma.

En una realización particular, dicha CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, presente en la región V<sub>H</sub> del anticuerpo de la invención es una CDR1, dicha CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4, presente en la región V<sub>H</sub> del anticuerpo de la invención es una CDR2, y dicha CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, presente en la región V<sub>H</sub> del anticuerpo de la invención es una CDR3.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>H</sub>, al menos una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [CDR-H1] o una variante de la misma, o una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 [CDR-H2] o una variante de la misma, o una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma, preferentemente, al menos, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma.

En otra realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>H</sub>, dos de dichas CDRs previamente mencionadas; en este caso, una de dichas CDR es, preferentemente, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma, y la otra CDR se selecciona entre una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [CDR-H1] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 [CDR-H2] o una variante de la misma.

En otra realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>H</sub>, las tres CDRs previamente mencionadas, es decir, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [CDR-H1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 [CDR-H2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma.

En otra realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>), analizada por el método IMGT/V-QUEST (ver más adelante), al menos una CDR seleccionada del grupo formado por:

- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 (SSVNY) [CDR-L1] o una variante de la misma;
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma; y
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 (QQFTSSPWT) [CDR-L3] o una variante de la misma.

En una realización particular, dicha CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1], presente en la región V<sub>L</sub> del anticuerpo de la invención es una CDR1, dicha CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2], presente en la región V<sub>L</sub> del anticuerpo de la invención es una CDR2, y dicha CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3], presente en la región V<sub>L</sub> del anticuerpo de la invención es una CDR3.

En una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>L</sub>, al menos una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1] o una variante de la misma, o una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma, o una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma.

En otra realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>L</sub>, dos de dichas CDRs previamente mencionadas, por ejemplo, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma, o bien, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma. Alternativamente, según esta realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>L</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-

L2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma.

5 En otra realización particular, el anticuerpo de la invención comprende, dentro de la región V<sub>L</sub>, las tres CDRs previamente mencionadas, es decir, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma.

10 El anticuerpo de la invención puede contener cualquier combinación de regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, cuyas características han sido mencionadas previamente; no obstante, en una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende:

15 a) dentro de la región V<sub>H</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [CDR-H1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 [CDR-H2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma; y

20 b) dentro de la región V<sub>L</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma.

25 Las secuencias de las CDR pueden ser determinadas según los criterios convencionales, por ejemplo, mediante los criterios de la IMGT/V-QUEST: [http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/share/textes/](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/) (Brochet X, Lefranc MP and Giudicelli V: IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. Nucleic Acids Res Jul 1;36 (Web Server issue):W503-508, 2008), como en el presente caso, o bien siguiendo la numeración de Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991).

30 En una realización particular, la cadena pesada del anticuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 [EVQLQESGPELVKGTGSSVKISCKASGYSFTGYMHVVKQSQGSLEWIGYINCYNAGTSYNRNFKGKATFTVDTSS STAYMQFNLSLTSGLSDAVYYCAIWDYEFHVMYWGQRTSLTVSS] o una variante de la misma.

35 En otra realización particular, la cadena ligera del anticuerpo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 [ENVLTQSPAIMSASLGEKVTMSCRASSSVNYMYWYQKSDASPKLWIYYSNLPAGVVPARFSGSGSGNSYSLSLTSS MEGEDADTYCQQFTSSPWTFGGGTKLEIK] o una variante de la misma.

40 En una realización particular, el anticuerpo de la invención comprende:

- una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 [VH\_1E8.33] o una variante de la misma, y

45 - una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 [Vkappa\_1E8.33] o una variante de la misma.

50 En otra realización aún más particular, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo monoclonal identificado como 1E8.33, cuya obtención se describe en el Ejemplo 5.

El anticuerpo de la invención se une específicamente a un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la proteína proCOL11A1.

55 El término "anticuerpo", tal como se ha definido previamente, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos, por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, single chain Fv (scFv), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de origen no humano y polipéptidos derivados de inmunoglobulinas producidos mediante técnicas de ingeniería genética, por ejemplo, fragmentos Fv estabilizados mediante puentes disulfuro (dsFv), moléculas con dominios de la región variable de cadena única (Abs), minibodies, etc.

60 En general, el anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo que conserva la capacidad de unirse a proCOL11A1. Preferentemente, dichos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanizados. Los anticuerpos humanizados puede prepararse, por ejemplo, a partir de anticuerpos monoclonales murinos y los anticuerpos monoclonales humanos puede prepararse, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos o mediante la técnica de "phage display". En general, los anticuerpos de la invención pueden ser preparados mediante una

65

variedad de procedimientos conocidos por los técnicos en la materia. A modo ilustrativo, pueden citarse las siguientes publicaciones: *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988); *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Goding, 3<sup>rd</sup> Edition, Academic Press (1996). Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales secretados por hibridomas pueden ser purificados por métodos convencionales. En el Ejemplo 5 se describe la obtención de anticuerpos monoclonales y policlonales frente a proCOL11A1.

Los fragmentos con capacidad de unión a proCOL11A1 también pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Dichos métodos pueden implicar el aislamiento del DNA que codifica la cadena polipeptídica (o un fragmento de la misma) de un anticuerpo monoclonal de interés y manipular el DNA mediante la tecnología del DNA recombinante. El DNA puede ser utilizado para generar otro DNA de interés, o alterado, (por ejemplo, mediante mutagénesis) para añadir, eliminar, o sustituir uno o más aminoácidos, por ejemplo, el DNA que codifica las cadenas polipeptídicas de un anticuerpo (e.g., las cadenas pesada o ligera, la región variable o el anticuerpo completo) puede ser aislado a partir de células B murinas inmunizadas con proCOL11A1. El DNA puede ser aislado y amplificado por métodos convencionales, por ejemplo, mediante PCR.

Los anticuerpos de cadena sencilla pueden obtenerse por métodos convencionales uniendo la región variable de las cadenas pesada y ligera (región Fv) mediante un puente aminoácido. Los scFvs pueden prepararse fusionando DNA que codifica un linker peptídico entre los DNAs que codifican los polipéptidos de las regiones variables (V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>). La producción de scFvs se describe en numerosos documentos, por ejemplo, en la patente norteamericana US 4.946.778, Bird (Science 242: 423, 1988), Huston et al. (Proc. Natl. Acad. Sci USA 85: 5879, 1988) y Ward et al. (Nature 334: 544, 1989).

El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos de la invención pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos de manera que, aunque se altera la secuencia primaria del polipéptido, se mantenga la capacidad del anticuerpo de unirse a proCOL11A1. Dicha sustitución puede ser una sustitución conservativa y, en general, se aplica para indicar que la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares (por ejemplo, la sustitución del ácido glutámico (aminoácido cargado) por el ácido aspártico sería una sustitución de aminoácidos conservativa).

La presente invención también contempla variantes de las secuencias de las cadenas pesada y ligera identificadas en esta descripción, las cuales caen dentro del ámbito de la presente invención. El término "variante", tal como aquí se utiliza, se refiere a secuencias sustancialmente similares. En general, las variantes poseen la misma actividad biológica, desde el punto de vista cualitativo, que la secuencia nativa. Una variante de una secuencia polipeptídica puede ser un derivado de una secuencia polipeptídica identificada en esta descripción que comprende la adición, delección o sustitución de uno o más aminoácidos. Las variantes pueden diferir de las secuencias descritas dentro de las regiones marco ("framework regions") o dentro de las CDRs de cualquiera de las cadenas pesada o ligera. A modo ilustrativo, la invención incluye anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, o fragmentos de los mismos con capacidad de unión a proCOL11A1, que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen al menos, aproximadamente, un 70% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID Nos: 3 a 9, y con la secuencia YTS, preferentemente, al menos, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID Nos: 3 a 9, y con la secuencia YTS,.

El anticuerpo de la invención puede ser utilizado en el diagnóstico, pronóstico y/o diagnóstico diferencial de un carcinoma invasivo. Además, el anticuerpo de la invención puede ser utilizado en el tratamiento de un carcinoma invasivo.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un anticuerpo de la invención para el diagnóstico, pronóstico y/o diagnóstico diferencial de un carcinoma invasivo *in vitro*. En una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

En otro aspecto de la invención se relaciona con un anticuerpo de la invención para su empleo en el tratamiento de un carcinoma invasivo, o, expresado en otros términos, con el empleo de un anticuerpo de la invención en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un carcinoma invasivo. En una realización particular, dicho carcinoma invasivo se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

Composiciones farmacéuticas

5 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante “composición farmacéutica de la invención” que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de, al menos, un inhibidor de proCOL11A1, junto con un excipiente o sustancia transportadora farmacéuticamente aceptable.

10 Los excipientes, sustancias transportadoras y, en su caso, sustancias auxiliares eventualmente presentes en la composición farmacéutica proporcionada por esta invención tienen que ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

15 En una realización particular, la composición farmacéutica de la invención comprende, además, uno o más ingredientes activos que inhiben la función de la proteína proCOL11A1.

20 Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

**EJEMPLO 1****Análisis diferencial de expresión del gen col11a1 en muestras de tejido de riñón, utilizando los microarrays Human Genome U95 DNA arrays**

25

**1.1 Materiales y Métodos**

30 **Microarrays.** Se utilizaron los microarrays *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten analizar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el microarray *GeneChip Human Genome U95A* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 12.000 secuencias completas de genes anotados; el gen Colágeno XI, alfa 1 (col11a1) está representado en el microarray por el set de sondas 37892\_at de Affymetrix, que son unos oligonucleótidos *sentido* de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.82772 de Unigene, o J04177 de GeneBank.

35 **Muestras.** El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de 1 muestra de tejido neoplásico de riñón de 1 individuo afectado de oncocitoma renal, con mezclas equimolares (pools) de RNAs totales procedentes de un conjunto de 8 muestras de tejido neoplásico de riñón de 8 individuos afectados de carcinoma renal convencional, con RNA total procedente de 1 muestra de tejido neoplásico de riñón de 1 individuo afectado de carcinoma renal cromóforo y, como control negativo, con mezclas equimolares de RNAs totales procedentes de un conjunto de  
40 muestras de tejido no neoplásico de riñón de individuos afectados de oncocitoma renal, carcinoma renal convencional y carcinoma renal cromóforo. Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander; España), el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas, siguiendo los preceptos de la Declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de  
45 su análisis.

**Tabla 1**  
**Datos clinicopatológicos de los neoplasmas renales analizados**

Caso	Edad	Género	Diagnóstico histológico	Estadío	Evolución
1	58	Hombre	CR Convencional	II	V&S (28 meses)
2	80	Hombre	CR Convencional	II	V&S (16 meses)
3	78	Hombre	CR Convencional	II	V&S (20 meses)
4	38	Hombre	CR Convencional	II	V&S (24 meses)
5	68	Hombre	CR Convencional	II	V&S (24 meses)
6	76	Mujer	CR Convencional	II	V&S (22 meses)
7	51	Hombre	CR Convencional	III	MDE (15 meses)
8	45	Hombre	CR Convencional	III	MDE (11 meses)
9	57	Hombre	CR Cromóforo	II	V&S (25 meses)
10	79	Hombre	Oncocitoma renal	II	V&S (26 meses)

50 CR: Carcinoma renal

V&S (n meses): Vivo y Sano, n meses después de diagnóstico.

MDE (n meses): Muerto debido a la enfermedad, n meses después de diagnóstico.

## Análisis GeneChip de expresión génica

### Síntesis del cRNA

5 El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 10 µg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. La segunda hebra de cDNA se sintetizó utilizando los enzimas DNA polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), DNA ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), y DNA polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El cRNA marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

### Hibridación y escaneado del array

20 Se fragmentaron 15 µg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía Tris-acetato 40 mM (pH 8,1), acetato potásico (KOAc) 100 mM y acetato magnésico (MgOAc) 30 mM. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación [ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 100 mM, NaCl 1M, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 20 mM, 0,01% de Tween® 20] y se calentó a 99°C durante 5 minutos y posteriormente a 45°C durante 5 minutos para, a continuación, ser cargado en el array de Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite analizar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el GeneChip *Human Genome 95 A* (HG-U95A) (Affymetrix, Santa Clara). Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45° durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm. El lavado y tinción de cada array se llevó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

- 30 - 10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (NaCl 0,9 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 6 mM, 0,01% de Tween® 20) a 25°C;
- 4x15 ciclos con MES 0,1 mM, NaCl 0,1M, 0,01% de Tween® 20 a 50°C;
- tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml) (Molecular Probes);
- 35 - 10x4 ciclos de lavado con SSPE-T 6x a 25°C;
- tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina (BA-0500, Vector Laboratories) durante 10 minutos;
- tinción con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1 mg/ml) (Molecular Probes) durante 10 minutos; y
- 15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°C.

40 Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

## 1.2 Resultados

45 El análisis diferencial de la expresión del gen col11a1 en las diferentes neoplasias renales con respecto al control, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron:

- 50 i) Detección: Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M);
- ii) Cambio: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC), Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD); y
- 55 iii) Signal Log Ratio (SLR): Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el log<sub>2</sub> del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tumoral frente a la muestra control-sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y de -1, para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

60 El análisis de la expresión diferencial del gen col11a1 en los diferentes tipos de neoplasias renales analizadas frente al control, demostró que los niveles de expresión del gen col11a1 estaban ligeramente aumentados, 2 veces (SLR=1), en biopsias de oncocitoma (tumor benigno), y, muy aumentados, en tumores malignos, con un incremento proporcional a la invasividad del tipo de tumor, más de 8 veces (SLR>3) en biopsias de carcinomas convencionales y más de 120 veces (SLR>7) en biopsias de carcinoma cromóforo (Tabla 2).

65

**Tabla 2**  
Resultados obtenidos con Genechip Human U95A array, para col11a1. N. Acc. J04177

Detección en muestra control	Detección en Oncocitoma	SLR Oncocitoma vs Control	Cambio en Oncocitoma vs Control
A	P	1	I
Detección en muestra control	Detección en Carcinoma Convencional	SLR en Carcinoma Convencional vs Control	Cambio en Carcinoma Convencional vs Control
A	P	3,9	I
Detección en muestra control	Detección en Carcinoma Cromóforo	SLR en Carcinoma Cromóforo vs Control	Cambio en Carcinoma Cromóforo vs Control
A	P	7,3	I

5

**EJEMPLO 2**

**Análisis diferencial de expresión del gen col11a1 en muestras de tejido de páncreas, utilizando los microarrays Human Genome U133 DNA arrays**

**2.1 Materiales y Métodos**

10

**Microarrays.** Se utilizaron los microarrays *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten analizar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el microarray *GeneChip Human Genome U133A* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 15.000 secuencias completas de genes anotados y 7.000 secuencias génicas expresadas sin anotar (*ESTs* o “*expressed sequence tags*”); el gen Colágeno XI, alfa 1 (col11a1) está representado en el microarray por el set de sondas 37892\_at de Affymetrix, que son unos oligonucleótidos *sentido* de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.82772 de Unigene, o J04177 de GeneBank.

15

20

**Muestras.** Las muestras estudiadas procedían de biopsias, obtenidas por resección quirúrgica, de (i) sujetos control sin adenocarcinoma ductal de páncreas (n = 1), (ii) tejido pancreático aparentemente no tumoral (“sano”) procedente de individuos que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas (n = 1), (iii) sujetos control sin adenocarcinoma ductal de páncreas, pero con pancreatitis crónica (n = 2) y (iv) pacientes que fueron clínicamente tipados posteriormente y que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas (n = 12) en uno de los siguientes estadios: Estadio I, tumor limitado al páncreas; Estadio III, tumor extendido a ganglios linfáticos regionales; y Estadio IVB, existe metástasis en tejidos u órganos distantes. Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente (grado y estadio) en el Hospital Central de Asturias, el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas, siguiendo los preceptos de la declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su análisis. De cada tipo de tumor así como de las muestras sanas se recibieron varios casos:

25

30

Control de tejido sano:	2 muestras
Control de tejido con pancreatitis:	2 muestras
Tumor estadio I:	7 muestras
Tumor estadio III:	1 muestra
Tumor estadio IV:	2 muestras
Ampuloma:	2 muestras

35

**Tabla 3**  
Descripción de las muestras analizadas

Código de la muestra	Tipo	Clasificación TNM	Estadio
PA36	Control sano	-	-
PA26	Control sano	-	-
PA29	Control pancreatitis	-	-
PA46	Control pancreatitis	-	-
PA02	Adenocarcinoma ductal	T2N0M0	I
PA03	Adenocarcinoma ductal	T2N0M0	I

PA17	Adenocarcinoma ductal	T1bN0M0	I
PA19	Adenocarcinoma ductal	T1bN0M0	I
PA25	Adenocarcinoma ductal	T1N0M0	I
PA27	Adenocarcinoma ductal	T1N0M0	I
PA33	Adenocarcinoma ductal	T1bN0M0	I
PA20	Ampuloma	T1bN1M0	III
PA24	Adenocarcinoma ductal	T3N1M0	III
PA31	Ampuloma	T1bN1M0	III
PA16	Adenocarcinoma ductal	T2N1M1	IV
PA23	Adenocarcinoma ductal	T1bN1M1	IV

### Análisis *GeneChip* de expresión génica

5 El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de sujetos individuales. Las 16 muestras analizadas fueron las descritas en la Tabla 3.

#### *Síntesis del cRNA*

10 El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 10 µg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. La segunda hebra de cDNA se sintetizó utilizando los enzimas DNA polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), DNA ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), y DNA polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El cRNA marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

20

#### *Hibridación y escaneado del array*

25 Se fragmentaron 15 µg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía Tris-acetato 40 mM (pH 8,1), KOAc 100 mM y MgOAc 30 mM. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación (MES 100 mM, NaCl 1M, EDTA 20 mM, 0,01% de Tween® 20) y se calentó a 99°C durante 5 minutos y posteriormente a 45°C durante 5 minutos para, a continuación, ser cargado en el array de Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite analizar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el GeneChip *Human Genome* 133 A (HG-U133A) (Affymetrix, Santa Clara). Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45°C durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm. El lavado y tinción de cada array se llevó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix®. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

30

- 10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (NaCl 0,9 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 6 mM, 0,01% de Tween® 20) a 25°C;
- 35 - 4x15 ciclos con MES 0,1 mM, NaCl 0,1M, 0,01% de Tween® 20 a 50°C;
- tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritina (10 µg/ml) (Molecular Probes);
- 10x4 ciclos de lavado con SSPE-T 6x a 25°C;
- tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina (BA-0500, Vector Laboratories) durante 10 minutos;
- 40 - tinción con un conjugado estreptavidina-ficoeritina (1 mg/ml) (Molecular Probes) durante 10 minutos; y
- 15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°C.

45

Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

45

## 2.2 Resultados

50 El análisis diferencial de la expresión del gen col11a1 en los estadios tumorales con respecto al control, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron:

- i) Detección: Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M);
- ii) Cambio: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), o No Cambia (NC);

- iii) **Signal Log Ratio (SLG):** Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el  $\log_2$  del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tumoral frente a la muestra control-sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y de  $-1$ , para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

5 El análisis de la expresión diferencial del gen col11a1 en los estadios tumorales con respecto al control sano, demuestra que los niveles de expresión del gen col11a1 estaban claramente aumentados en todos los adenocarcinomas ductales de páncreas analizados (10), pero no se detectó expresión de col11a1 en los 2 ampulomas analizados. La sobreexpresión media respecto al Control Sano de las muestras de estadio temprano (Estadio I) fue de más de 30 veces (SLR>5) y de más de 60 veces (SLR>6) en biopsias de tumores avanzados (Estadio IVB) (Tabla 4). Estos valores son incluso mayores al comparar la expresión del gen col11a1 en los tumores respecto a la muestra procedente de individuos afectados de pancreatitis crónica pero no de adenocarcinoma ductal de páncreas (PA46), siendo el aumento de expresión medio de las muestras de estadio temprano (Estadio I) de más de 100 veces (SLR=6,7), y de más de 120 veces (SLR>7) en biopsias de tumores avanzados (Estadio IVB) (Tabla 5). La sobreexpresión de los niveles de expresión del gen col11a1 en muestras tumorales respecto a las muestras con pancreatitis crónica demostró que esta sobreexpresión es específica del proceso tumoral y no se debe a una proliferación estromática inherente al proceso de inflamación característico de las pancreatitis; inflamación que también es característica, como efecto colateral, de los procesos tumorales. El gen col11a1 fue detectado como Ausente por el software MAS 5.0 en los 4 controles analizados (Tablas 4 y 5).

25 **Tabla 4**  
**Resultados obtenidos con Genechip Human U133A array para col11a1. N. Acc. J04177. Resultado de las comparaciones frente al control sano (PA36)**

Muestra*	Detección	SLR Muestra* vs PA36	Cambio Muestra* vs PA36
<b>Controles</b>			
PA36 (páncreas normal)	A	-	-
PA26 (páncreas normal)	A	1,8	NC
PA29 (pancreatitis)	A	0,1	NC
PA46 (pancreatitis)	A	-1,1	NC
<b>Tumores estadio I</b>			
PA02	P	4,6	I
PA03	P	7,3	I
PA17	P	4,2	I
PA19	P	4,7	I
PA33	P	4,7	I
PA25	P	4	I
PA27	P	7,3	I
<b>Tumores estadio III</b>			
PA24	P	5,5	I
<b>Tumores estadio IV</b>			
PA16	P	6,7	I
PA23	P	5,4	I
<b>Ampulomas</b>			
PA31	A	0,8	NC
PA20	A	0,3	NC

30

**Tabla 5**  
**Resultados obtenidos con Genechip Human U133A array para col11a1. N. Acc. J04177. Resultado de las comparaciones frente al control con pancreatitis (PA46)**

Muestra*	Detección	SLR Muestra* vs PA46	Cambio Muestra* vs PA46
<b>Controles</b>			
PA46 (pancreatitis)	A	-	-
PA29 (pancreatitis)	A	1,1	NC
PA36 (páncreas normal)	A	1,1	NC
PA26 (páncreas normal)	A	3,5	NC
<b>Tumores estadio I</b>			
PA02	P	5,8	I
PA03	P	8,9	I
PA17	P	5,4	I
PA19	P	5,9	I
PA33	P	6,2	I
PA25	P	5,8	I
PA27	P	8,9	I
<b>Tumores estadio III</b>			
PA24	P	7	I
<b>Tumores estadio IV</b>			
PA23	P	7,1	I
PA16	P	8	I
<b>Ampulomas estadio III</b>			
PA31	A	2,8	NC
PA20	A	-0,3	NC

5

### EJEMPLO 3

#### Análisis diferencial de expresión del gen col11a1 en muestras de tejido de vejiga, utilizando los microarrays Human Genome U95 DNA arrays

#### 3.1 Materiales y Métodos

**Microarrays.** Se utilizaron los microarrays *GeneChip Test 3* (Affymetrix, Santa Clara), que permiten analizar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el microarray *GeneChip Human Genome U95A* (Affymetrix, Santa Clara), que representa 12.000 secuencias completas de genes anotados; el gen col11a1 está representado en el microarray por el set de sondas 37892\_at de Affymetrix, que son unos oligonucleótidos *sentido* de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.82772 de Unigene, o J04177 de GeneBank.

**Muestras.** Las muestras estudiadas procedían de biopsias, obtenidas por resección quirúrgica transuretral, de (i) sujetos control sin carcinoma transicional de vejiga (n = 7), y (ii) pacientes que fueron clínicamente tipados tras resección y que presentaban carcinoma transicional de vejiga (n = 22) en uno de los siguientes estadios: Tumores de bajo grado que respetan la lámina propia (Ta G1), tumores de alto grado que infiltran la lámina propia (T1 G3) y tumores de alto grado que invaden tejido muscular (T2 G3). Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente (grado y estadio) en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Santander, España), el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas, siguiendo los preceptos de la Declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su análisis. De cada tipo de tumor así como de las muestras sanas se recibieron varios casos:

Control de tejido sano (mucosa sin estrato muscular): 5 muestras  
 Control de tejido sano (mucosa con estrato muscular): 2 muestras  
 Tumor de bajo grado que respeta lámina propia (TaG1): 9 muestras  
 Tumor de alto grado que infiltra lámina propia (T1G3): 7 muestras  
 Tumor de alto grado que invade músculo (T2G3): 6 muestras

#### 3.5 Análisis *GeneChip* de expresión génica

El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de sujetos individuales, y con mezclas equimolares (*pools*) de RNAs totales procedentes de distintos sujetos sanos, o afectados de carcinoma transicional de vejiga del mismo estadio (Tabla 6).

**Tabla 6**  
**Descripción y número de muestras analizadas**

	<b>Control epitelial</b>	<b>Control muscular</b>	<b>Ta G1</b>	<b>T1 G3</b>	<b>T2 G3</b>
Muestras	3*(pC1) <sup>a</sup> , 2(pC3)	2(pC2)	1, 4(pTa.1) <sup>b</sup> , 4(pTa.2)	1, 2(pT1.1) <sup>c</sup> , 4(pT1.2)	1, 2(pT2.1) <sup>d</sup> , 3(pT2.2)

\* número de muestras que forman parte de cada *pool*.

<sup>a</sup> pC: *pool* de muestras control. Ejemplo: 3(pC1) = *pool* 1 de 3 muestras control.

<sup>b</sup> pTa: *pool* de muestras de tumores de bajo grado (G1) que respetan la lámina propia (Ta).

Ejemplo: 4(pTa.1) = *pool* 1 de 4 muestras TaG1.

<sup>c</sup> pT1: *pool* de muestras de tumores de alto grado (G3) que infiltran la lámina propia (T1).

Ejemplo: 2(pT1.1) = *pool* 1 de 2 muestras T1G3.

<sup>d</sup> pT2: *pool* de muestras de tumores de alto grado (G3) que invaden tejido muscular (T2).

Ejemplo: 2(pT2.1) = *pool* 1 de 2 muestras T2G3.

#### Síntesis del cRNA

El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 10 µg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. La segunda hebra de cDNA se sintetizó utilizando los enzimas DNA polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), DNA ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), y DNA polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El cRNA marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

#### Hibridación y escaneado del array

Se fragmentaron 15 µg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía Tris-acetato 40 mM (pH 8,1), KOAc 100 mM y MgOAc 30 mM. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación (MES 100 mM, NaCl 1M, EDTA 20 mM, 0,01% de Tween® 20) y se calentó a 99°C durante 5 minutos y posteriormente a 45°C durante 5 minutos para, a continuación, ser cargado en el array de Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite analizar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el GeneChip *Human Genome* 95 A (HG-U95A) (Affymetrix, Santa Clara). Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45°C durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm. El lavado y tinción de cada array se llevó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix®. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

- 10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (NaCl 0,9 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60 mM, EDTA 6 mM, 0,01% de Tween® 20) a 25°C;
- 4x15 ciclos con MES 0,1 mM, NaCl 0,1M, 0,01% de Tween® 20 a 50°C;
- tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml) (Molecular Probes);
- 10x4 ciclos de lavado con SSPE-T 6x a 25°C;
- tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina (BA-0500, Vector Laboratories) durante 10 minutos;
- tinción con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1 mg/ml) (Molecular Probes) durante 10 minutos; y
- 15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°C.

Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

### 3.2 Resultados

El análisis diferencial de la expresión del gen col11a1 en los estadios tumorales con respecto al control, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron:

- i) Detección: Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M);

- ii) **Cambio:** Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC), Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD); y
- iii) **Signal Log Ratio (SLR):** Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el  $\log_2$  del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tumoral frente a la muestra control-sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control) y de  $-1$ , para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

El análisis de la expresión diferencial del gen col11A1 en los estadios tumorales con respecto al control, demuestra que la expresión del gen col11A1 en tumores de vejiga superficiales (carcinoma transicional de bajo grado TaG1 o carcinoma transicional de grado alto que invade la lamina propia T1 G3) no cambió respecto a la de los controles; aunque el SLR medio de los tres estadios fue de 3,2, el software de Affymetrix empleado para determinar la fiabilidad de los datos consideró que el gen col11A1 no se expresaba en estos tumores (A). Por el contrario, los niveles de expresión del gen col11a1 estaban elevados más de 20 veces (SLR = 4,5) en biopsias de tumores de vejiga invasivos (carcinoma transicional de vejiga de alto grado que invade músculo T2G3) (Tabla 7).

**Tabla 7**  
**Resultados obtenidos con Genechip Human U95A array para col11a1. N. Acc. J04177**

Detección en muestra control	Detección en estadio TaG1	SLR Ta G1 vs Control	Cambio en estadio TaG1
A	A	2,1	NC
Detección en muestra control	Detección en estadio T1 G3	SLR T1G3 vs Control	Cambio en estadio T1G3
A	A	3	NC
Detección en muestra control	Detección en estadio T2 G3	SLR T2G3 vs Control	Cambio en estadio T2G3
A	P	4,5	I

#### EJEMPLO 4

#### Análisis diferencial de expresión del gen col11a1 en muestras de tejido de páncreas, utilizando RT-PCR cuantitativa a tiempo real

##### 4.1 Materiales y Métodos

**Método.** El método empleado consiste en la transcripción inversa del mRNA a cDNA y su posterior amplificación en un equipo *LightCycler* (Roche Diagnostics Inc., Mannheim, Alemania), utilizando SYBR Green para la detección del producto amplificado. La cuantificación se realiza en tiempo real y permite calcular la expresión relativa de la secuencia en diferentes muestras en la fase de amplificación lineal de la reacción.

**Muestras.** Las muestras estudiadas procedían de biopsias, obtenidas por resección quirúrgica, de tejido pancreático aparentemente no tumoral, procedente de (i) individuos que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas ( $n = 1$ ), (ii) sujetos control sin adenocarcinoma ductal de páncreas con pancreatitis crónica ( $n = 1$ ), y (iii) pacientes que fueron clínicamente tipados posteriormente y que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas ( $n = 5$ ) en uno de los siguientes estadios: Estadio I, tumor limitado al páncreas y Estadio IV, existe metástasis en tejidos u órganos distantes. Todas las muestras fueron clasificadas histológicamente (grado y estadio) en el Hospital Central de Asturias, el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

**RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real.** El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de sujetos individuales. Las 7 muestras que fueron analizadas se describen en la Tabla 8.

**Tabla 8**  
**Descripción de las muestras analizadas**

Código de la muestra	Tipo	Clasificación TNM	Estadio
PA36	Control sano	-	-
PA46	Control pancreatitis	-	-
PA19	Tumor	T1bN0M0	I

PA27	Tumor	T1N0M0	I
PA33	Tumor	T1bN0M0	I
PA14	Tumor	T3N1M1	IV
PA16	Tumor	T2N1M1	IV

*Síntesis del cDNA*

5 El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. et al., Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). El RNA se cuantificó espectrofotométricamente y se digirieron 5 µg de RNA total con DNAsal. Se utilizó 1 µg de RNA tratado con DNAsa como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Se prepararon alícuotas del cDNA diluido a la concentración de trabajo.

*Amplificación*

15 El cDNA sintetizado se amplificó utilizando cebadores específicos del gen humano col11a1 [5'-TGGTGATCAGAATCAGAAGTTTCG-3' (SEQ ID NO: 1) y 5'- AGGAGAGTTGAGAATTGGGA ATC-3' (SEQ ID NO: 2)], y cebadores específicos del gen de la proteína ribosomal L10 humana (rib10) [5'-TGCGATGGCTGCACACA-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'- TCCCTTAGAGCAACCCATACAAC-3' (SEQ ID NO: 12)]. Las reacciones de PCR en tiempo real se prepararon utilizando el kit *LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green I kit* (Roche Diagnostics Inc., Mannheim, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación consistía en 1 ciclo de 95°C durante 10 minutos ("hot start"), seguido de 45 ciclos de 95°C (desnaturalización) durante 10 segundos, 60°C (anillamiento) durante 5 segundos, 72°C (amplificación y adquisición de fluorescencia) durante 10 segundos. El programa de análisis de curvas de desnaturalización consistía en un ciclo de un pulso de 95°C, 65°C durante 15 segundos, y un pulso de 95°C durante el paso de amplificación y adquisición.

*Cuantificación*

25 En primer lugar se determinó la especificidad de los productos de PCR analizando las curvas de desnaturalización. Posteriormente, como medida relativa de la expresión génica, se calculó la relación entre la abundancia de mRNAs transcritos de col11a1 y la abundancia de transcritos de rib10 y se normalizó el dato de la relación en cada una de las muestras tumorales en base a los valores de la muestra control. Para calcular la eficiencia de las reacciones de PCR (col11a1 y rib10) se construyó, para cada secuencia génica, una curva patrón realizada con diluciones seriadas de cDNA. A las concentraciones de cDNA molde para las reacciones en la curva patrón se les dieron valores arbitrarios 10, 5, 2,5, 1,25 y 0,625. La eficiencia se calculó utilizando la ecuación:

$$E = 10^{-1/p}$$

donde

E es la eficiencia de amplificación, y  
p es la pendiente de la recta patrón.

La relación de los valores de expresión génica se determinó utilizando la siguiente ecuación, que relaciona los datos experimentales de la amplificación y corrige el error originado por la diferencia de eficiencia de las reacciones de PCR:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{diana}}^{-\text{(Cp diana control-Cp diana muestra)}}}{E_{\text{referencia}}^{-\text{(Cp referencia control - Cp referencia muestra)}}$$

donde

E es la eficiencia de amplificación,  
Cp es el punto de cruce ("Crossing point"),  
diana es col11a1,  
referencia es rib10,  
control es la muestra control (sano o pancreatitis), y  
muestra es la muestra tumoral.

## 4.2 Resultados

### Cuantificación del cambio de expresión del gen col11a1

5 Dos réplicas de cada muestra (sana y tumoral) se amplificaron con los cebadores específicos de col11a1 (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) y ribl10 (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11). A partir de los puntos de corte generados en estas amplificaciones, se calcularon los cambios de expresión del gen col11a1 en las muestras tumorales, respecto al control sano y al control de pancreatitis, aplicando la ecuación anteriormente descrita (Tabla 9).

10 **Tabla 9**  
**Valores de sobreexpresión de col11a1 en las 5 muestras tumorales respecto al control sano (PA36) y respecto al control con pancreatitis (PA46)**

Muestras	PA14	PA16	PA19	PA27	PA33
<b>Aumento de expresión respecto al control sano (PA36)</b>	356,9	36,5	245,2	205,1	322,0
<b>Aumento de expresión respecto a Pancreatitis (PA46)</b>	381,6	39,0	262,1	219,3	344,2

15 Los resultados confirmaron los datos obtenidos midiendo la diferencia de expresión génica con DNA-chips (Ejemplo 2), esto es, la expresión del gen col11a1 estaba fuertemente incrementada en las muestras tumorales respecto a las muestras sanas y respecto a las muestras con pancreatitis.

### EJEMPLO 5

#### Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales específicos de la proteína proCOL11A1

#### 20 5.1 Materiales y Métodos

##### 25 5.1.1 Clonaje de genes diferenciales en un vector de expresión heterólogo. Estrategia de LCR (*Ligase Chain Reaction*), digestión y ligación

30 Dado que el gen col11a1 es muy grande y dada la gran homología y complejidad dentro de la familia de los colágenos, se optó por generar un fragmento de DNA sintético correspondiente a la región más específica de la subunidad A1 del procolágeno tipo 11 (proCOL11A1). Para ello se llevó a cabo una reacción en cadena de la ligasa (LCR) acoplada a una PCR convencional, un método de síntesis *in vitro* de genes asistido por un programa informático (Au et al., Biochem Biophys Res Commun. 1998 Jul 9;248(1):200-3, Rouillard et al., Nucleic Acids Res. 2004 Jul 1;32(Web Server issue):W176-80).

#### Comparación de secuencias

35 En primer lugar se llevó a cabo una comparación entre las secuencias aminoacídicas de todos los tipos de colágenos, realizando un alineamiento múltiple con el programa Multalin v5.4.1 del INRA (Corpet, et al., Nucleic Acids Res. 1998 Jan 1;26(1):323-6). En un segundo paso se buscaron las regiones de menor homología entre proCOL11A1 y los tipos de colágeno con mayor grado de similitud usando el programa Lalign v2.0 (Huang *et al.*, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337-357). Posteriormente se realizó un *plot* de hidrofobicidad de la secuencia específica de proCOL11A1 mediante el programa ProtScale de ExPASy Server (<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>) y se seleccionó una región hidrófila con probabilidad alta de estar expuesta (Gasteiger *et al.*, The proteomics protocols Handbook, H.Press, 2005;571-607). Entre las zonas más hidrofílicas de la proteína, se identificó una (aminoácidos 350-400, señalada en negro en la Figura 3), que abarcaba la región más específica de pro-COL11A1 (aminoácidos 363-393), por lo que fue seleccionada como inmunógeno. Se identificó la secuencia de nucleótidos que codificaba la región seleccionada y sobre ella se realizó el diseño de oligonucleótidos para la LCR.

#### Diseño de oligonucleótidos

50 Para el diseño de oligonucleótidos se empleó el programa Gene2Oligo (Rouillard *et al.*, 2004, citado *supra*). Este programa permite el diseño automático de oligonucleótidos cuya secuencia se solapa parcialmente, con unas características de longitud y temperatura de desnaturalización que permiten un anillamiento múltiple en condiciones homogéneas mediante LCR (Tabla 10). La salida del programa de diseño es el siguiente:

Tabla 10

Oligonucleótidos para síntesis *in vitro* de un fragmento de proCOL11A1 por LCR, diseñados con Gene2Oligo. El número de cada oligonucleótido muestra la posición del nucleótido de comienzo. F: Forward (directo) y R: Reverse (reverso)

5

Código oligo	Secuencia (5'-3')	SEQ ID NO:
R0	TTGGGTGCTGAAGA	12
F0	TCTTCAGCACCCAAGGCTGCTCAAGC	13
R14	TCTGAGGTTCTGAGCTTGAGCAGCC	14
F26	TCAGGAACCTCAGATAGATGAGGCAAACA	15
R40	GAAAATCATCAACGATGTTTGCCTCATCTA	16
F55	TCGTTGATGATTTTCAAGAATACTATGGA	17
R70	GGTAACTTTCCATTGTTCCATAGTTGTATTCTT	18
F87	ACAATGGAAAGTTACCAGACAGAAGCTCC	19
R103	CAGAAACATGCCTAGGAGCTTCTGTCT	20
F116	TAGGCATGTTTCTGGGACAAATGAGCC	21
R130	TCTTCAACTGGATTTGGCTCATTGTCC	22
F143	AAATCCAGTTGAAGAAATATTTACTGAAGAATAT	23
R158	CCTCTCCCGTTAGATATTCTTCAGTAAATATT	24
F177	CTAACGGGAGAGGATTATGATTTCCAGAG	25
R190	ATCCTCAGAATTTTCTCTGGGAATCATAAT	26
F206	GAAAAATTCTGAGGATACACTATATGAAAACAA	27
R222	TGCCGTCTATTTCTTTGTTTTCATATAGTGT	28
F239	AGAAATAGACGGCAGGGATTCTGATCTTC	29
R253	AATCTCCATCTACCAGAAGATCAGAATCCC	30
F268	TGGTAGATGGAGATTTAGGCGAATATGATTT	31
R283	CATATTTCTTTATATTCATAAAAAATCATATTCGCCTA	32
F299	TTATGAATATAAAGAATATGAAGATAAACCAACAAG	33
R319	CTTCATTAGGGGGGCTTGTGGTTTATCTT	34
F335	CCCCCTAATGAAGAATTTGGTCCAGGT	35
R349	GTTTCTGCTGGTACACCTGGACCAATT	36
F363	GTACCAGCAGAACTGATATTACAGAAACAA	37
R377	ATGGCCATTTATGCTTGTCTGTAAATATCA	38
F394	GCATAAATGGCCATGGTGCATATgcg	39
R408	gtcaagcctccatcgcATATGCACC	40
R420	Atggaggctgac	41

#### Ligación y amplificación por LCR-PCR

10 Los 30 oligonucleótidos descritos en la Tabla 10 se diluyeron a una concentración de 5  $\mu$ M. Se fosforilaron 25 pmol de cada oligo en un total de 5 reacciones (6 oligonucleótidos por reacción). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 50  $\mu$ l. Cada reacción estaba compuesta por 1,3  $\mu$ l de MilliQ-H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l de 10X T4 Kinasa Buffer, 7  $\mu$ l de oligonucleótidos (6 por reacción) 5  $\mu$ M, 0,7  $\mu$ l de ATP 75 mM y 1  $\mu$ l de T4 Kinasa 10U/ $\mu$ l. Las 5 reacciones se incubaron a 37°C durante 30 minutos y posteriormente se purificaron los oligonucleótidos fosforilados en una columna de Sephadex G-25 (Amersham). Para no saturar la columna se cargaron sólo 25  $\mu$ l de reacción, se lavó con dos volúmenes y se cargaron los 25  $\mu$ l restantes. Los dos eluidos se recogieron juntos. Con las 5 mezclas de oligonucleótidos fosforilados y purificados se llevó a cabo la reacción en cadena de la ligasa (LCR) en un volumen final de 25  $\mu$ l. Cada vial contenía 4  $\mu$ l de mezcla de oligonucleótidos (5 reacciones), 2,5  $\mu$ l de Ligase Buffer y 2,5  $\mu$ l de Taq Ligase 4U/ $\mu$ l (dilución 1:10). El programa de ligación fue 2 minutos a 94°C y 20 ciclos de 30 segundos a 94°C y 4 minutos a 51°C. La "segunda" PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50  $\mu$ l. Cada vial contenía 31,5  $\mu$ l de MilliQ-H<sub>2</sub>O, 5  $\mu$ l de 10X PCR Buffer, 5  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2  $\mu$ l de primer directo 25  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de primer reverso 25  $\mu$ M, 1  $\mu$ l de dNTP's 10 mM, 0,5  $\mu$ l de Taq polimerasa 5U/ $\mu$ l y 3  $\mu$ l de la LCR. Los primers usados en la segunda PCR estaban modificados para clonaje y su secuencia fue:

25 Directo: ATCGGAGAATTCTCTTCAGCACCCAAGGCT (SEQ ID NO: 42);  
 Reverso: GCTTCGGACGTCAATTATACGTGGTACCGGTAATA (SEQ ID NO: 43)

El programa de amplificación consistió en 10 minutos a 95°C, 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C y 1 minuto a 72°C, más una incubación final de 5 minutos a 72°C. El producto de PCR teñido con bromuro de etidio se verificó por electroforesis en gel de agarosa.

5 El fragmento de PCR amplificado y digerido con las enzimas apropiadas se ligó con el vector pET41a (Novagen), digerido a su vez con las mismas enzimas. pET41a es un vector de expresión en procariontes que incluye un tag de GST para la producción de proteínas de fusión. Se digirieron aproximadamente 2 µg del producto de PCR y 1 µg de vector. Las reacciones de digestión se llevaron a cabo en 20 µl y cada reacción contenía 2 µl del 10X Buffer específico de cada enzima (Promega, Madison, USA. New England Biolabs, Ipswich, USA), 0,2 µl de BSA 10mg/ml, 1 µl de enzima de restricción 10 U/µl, DNA (1-2 µg) y MilliQ-H<sub>2</sub>O hasta 20 µl. Las reacciones se incubaron durante 1-2 horas a 37°C y 10 minutos de inactivación a 65°C, cuando fue necesario. Los productos digeridos se purificaron por escisión de un gel de agarosa ultrapura (cloning grade) al 0,75% usando el QIAquick Gel Extraction Kit o el QIAquick DNA Kit (Qiagen). Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en 10 µl y se incubaron toda la noche a 16°C en un termociclador. Cada reacción contenía 1 µl de 10X Ligasa Buffer, 1 µl de T4 Ligasa (New England), 50-100 ng de vector digerido, inserto digerido (se optimizaron los ratios molares inserto/vector en cada caso) y MilliQ-H<sub>2</sub>O hasta 10 µl. Se transformaron células competentes JM109 (Promega) mediante choque térmico, con 1 µl de la reacción de ligación. Las células se sembraron en placas de medio LB con antibiótico, kanamicina, y se incubaron a 37°C durante 16 horas en una estufa. Entre 2-24 de las colonias obtenidas se pincharon con palillos autoclavados y se crecieron con agitación en medio líquido LB con kanamicina (30 µg/ml) a 37°C durante 16 horas en un incubador orbital. En paralelo se hizo un screening por PCR sobre las mismas colonias para identificar aquellas que contenían plásmido recombinante. Para ello se prepararon mezclas de PCR que incluían 25 µl de MilliQ-H<sub>2</sub>O, 5 µl de 10X PCR Buffer, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 5 µl de primer directo [Directo: ATCGGAGAATTCTTCTCAGCACCCAAGGCT (SEQ ID NO: 42)] 25 µM, 5 µl de primer reverso [Reverso: GCTTCGGACGTCAATTATACGTGGTACCGGTA AAA (SEQ ID NO 43)] 25 µM, 1 µl de dNTP's 10 mM y 1 µl de Taq polimerasa 5 U/µl. En un tubo con 100 µl de MilliQ-H<sub>2</sub>O se disolvió una colonia, se incubó durante 10 minutos a 100°C y tras una centrifugación de 5 minutos a máxima velocidad, se tomaron 5 µl del sobrenadante y se añadieron a la mezcla de PCR. Aquellas colonias que resultaron positivas en la prueba de PCR se purificaron por miniprep (Promega), se verificaron por secuenciación y finalmente se purificaron a gran escala mediante midi- o maxi-prep (Qiagen).

### 30 5.1.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes

#### Optimización de las condiciones de expresión

35 Para estimar las condiciones óptimas de expresión de las proteínas de fusión, se llevaron a cabo experimentos piloto de inducción. Se transformaron células competentes BL21-DE3 con todas las construcciones plasmídicas y se dejaron crecer a 37°C toda la noche en 10 ml de LB con Kanamicina. Al día siguiente se inocularon 10 ml de LB-Kanamicina con 500 µl de cada cultivo anterior y se dejaron crecer 2 horas a 37°C en agitación. Se dividieron los cultivos en dos partes, uno inducido con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y otro sin inducir. Tras añadir el IPTG se tomaron alícuotas de 500 µl a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas de cada uno de los cultivos. Las muestras de los cultivos recogidas se centrifugaron, los pellets celulares se resuspendieron en buffer SDS-PAGE 1X y se analizaron en gel de acrilamida al 12%. En determinados casos se emplearon células competentes BL21-AI que contienen un sistema extra de represión de expresión basal, en ausencia de inductor, que resulta muy útil en casos en los que la proteína recombinante expresada resulta tóxica para la bacteria o inhibe su crecimiento. En este caso, la inducción de los cultivos se llevó a cabo suplementando el medio con IPTG 1 mM y 0,2% de L-arabinosa. En caso de observar la aparición de una banda de proteína del tamaño esperado solamente en los cultivos inducidos, se verificó la identidad de la misma por Western-blotting usando anticuerpos contra la cola de GST o bien anticuerpos específicos contra la proteína expresada.

#### 50 Producción de proteínas recombinantes

Una vez determinadas las condiciones óptimas de expresión se repitió el protocolo descrito en el apartado anterior escalando los volúmenes de cultivo. Se indujeron cultivos de 250 ml – 1000 ml para cada una de las proteínas recombinantes. Una vez transcurrido el tiempo óptimo (2-4 h) se recogieron las bacterias por centrifugación y se eliminó el medio de cultivo. Los *pellets* bacterianos secos se almacenaron a –80°C hasta la extracción de proteína.

55 A partir de los pellets se obtuvieron extractos de proteína soluble e insoluble mediante el BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen). Se emplearon 5 ml de BugBuster Reagent, 5 KU de rLysozima (Novagen) y 10 µl de Benzonasa (Novagen) por cada 700 mg de pellet (100 ml de cultivo). Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente se centrifugó a 16.000 g y se recogió el sobrenadante con la fracción soluble. Las proteínas insolubles (cuerpos de inclusión) se solubilizaron mediante un tratamiento con rLysozima y sonicación seguido de un buffer desnaturante (ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico (CAPS) 50 mM, 0,3% de N-laurilsarcosina, ditiotreitól (DTT) 1 mM DTT), para solubilizar la proteína. La proteína solubilizada se dializó en dos pasos; primero frente a Tris 20 mM con DTT 0,1 mM para promover su replegamiento mediante la formación de puentes disulfuro y finalmente frente a Tris 20 mM (Protein Refolding Kit - Novagen). Las proteínas recombinantes de la fracción soluble y los cuerpos de inclusión solubilizados y replegados se purificaron por cromatografía de afinidad.

## Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

Las proteínas de fusión a GST se purificaron por cromatografía de afinidad usando GST-Bind Resin Chromatography Kit (Novagen). Tras equilibrar la resina de GST con 10 volúmenes de buffer de unión, se cargaron los extractos de proteína. Las proteínas recombinantes fusionadas a GST quedaron retenidas en la columna por unión específica al glutatión reducido que está inmovilizado en la matriz de agarosa. La mayoría de las proteínas pasaron a través de la columna y se recogieron como eluido (flow-through). Tras lavar la columna con 5 volúmenes de buffer de lavado para despegar las proteínas unidas de forma inespecífica, se recogió la proteína de fusión añadiendo 1,5 volúmenes de un buffer de elución que contiene glutatión reducido. Finalmente se dializó la proteína contra un buffer fosfato para eliminar el glutatión. Todo el proceso se monitorizó analizando por SDS-PAGE la proteína presente en cada una de las diferentes fracciones cromatográficas, en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con Coomassie blue.

### 5.1.3 Producción de anticuerpos

#### 5.1.3.1 Producción de anticuerpos policlonales

Se obtuvo suero pre-inmune de conejos New Zeland antes de iniciar las inmunizaciones para su uso como control en experimentos posteriores. Se inmunizaron estos conejos con 5 dosis sucesivas de antígeno (proteína recombinante purificada) en adyuvante incompleto de Freund por vía intramuscular. Cada dosis contenía unos 500 µg de proteína y se administraron con un intervalo de 15 días entre dosis. Dos semanas después de la quinta dosis se sangraron a muerte los conejos obteniendo unos 80 ml de suero por cada animal. Las IgGs se purificaron por cromatografía de afinidad en columnas pre-empaquetadas con Proteína A Sefarosa (HiTrap Protein A – Amersham Biosciences). Las IgGs se unieron a la columna en condiciones de pH neutro y tras varios lavados con un buffer fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20mM, pH = 7) se eluyeron usando un buffer citrato 0,1 M a pH = 3,6. Para evitar la degradación de las IgGs debido a la acidez del buffer, se equilibró el pH usando una solución de TRIS-HCl. Para eliminar del suero purificado los anticuerpos reactivos contra la cola de GST, se inmovilizó proteína GST recombinante purificada mediante el método descrito anteriormente a una resina amino-link (Pierce). Esta resina de GST se empleó para aumentar la especificidad mediante depleción de todos los sueros producidos por inoculación de proteínas de fusión a GST. Para ello se incubó el suero purificado por HiTrap con la resina GST durante 30 minutos en agitación, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante deplecionado en IgGs anti-GST. Este proceso se llevó a cabo tres veces usando cada vez una alcuota de resina nueva.

Además de la producción propia de anticuerpos se encargaron anticuerpos policlonales de conejo generados contra péptidos (Sigma-Genosys, Cambridge, UK), se utilizaron anticuerpos comerciales de diferentes compañías y se pidieron anticuerpos a otros grupos de investigación.

#### 5.1.3.2 Producción de anticuerpos monoclonales

Para la generación de estos anticuerpos monoclonales, se hiperinmunizaron ratones BALB/c con las proteínas recombinantes previamente producidas. Posteriormente, empleando células de mieloma Sp2/0 como partner de fusión, se generaron hibridomas de células B, siguiendo la tecnología convencional. A continuación, los sobrenadantes, que contenían los anticuerpos, fueron cribados mediante ELISA frente a la proteína pro-COL11A1-GST recombinante purificada.

## 5.2 Resultados

### Estrategia de LCR (*Ligase Chain Reaction*), digestión y ligación

#### 50 Comparación de secuencias de los colágenos

La comparación de secuencias de todos los tipos de colágeno (tipos I a XXVII) mostró gran homología entre el colágeno XI alfa 1 (COL11A1) y el colágeno V alfa 1 (COL5A1). El análisis mostró también homología entre COL11A1 y COL11A2. Como ejemplo, se muestra la región de mayor homología en la Figura 1.

Con el objetivo de poder generar anticuerpos contra un inmunógeno de máxima especificidad para proCOL11A1 se seleccionó la región de menor homología entre las isoformas de mayor similitud (75%), 11A1 y 5A1. Para ello se comparó la secuencia de estas dos isoformas mediante el programa Lalin 2.0. El algoritmo de comparación identificó una región de mínima homología entre los aminoácidos 363-393 (Figura 2).

Paralelamente, se realizó una gráfica de hidrofobicidad de COL11A1 con el programa ProtScale y el algoritmo de Kyte & Doolittle, que reveló varias regiones hidrófilas en la proteína. Los dominios hidrófilos de una proteína tienen mayor probabilidad de corresponder a zonas expuestas, y, por tanto, los anticuerpos generados contra esos dominios tendrán mayor probabilidad de reconocer a la proteína en su conformación nativa en células y tejidos. Curiosamente, entre dichas regiones hidrófilas se identificó una región entre los aminoácidos 350 y 400 que

abarcaba la región más específica de COL11A1 (363-393) (Figura 3). Finalmente, se seleccionó la región comprendida entre los aminoácidos 268 y 400 para generar un inmunógeno hidrófilo y específico de proCOL11A1. Este péptido de 133 aminoácidos se encuentra en el subdominio VAR de la región N-terminal de la proteína intracelular proCOL11A1, que se procesa y elimina en la proteína extracelular COL11A1, que es la que se ensambla en las fibras de colágeno extracelulares. La secuencia nucleotídica que codifica este fragmento se utilizó para el diseño de oligonucleótidos para la LCR-PCR.

#### Ligación, amplificación por LCR-PCR y clonaje

Se diseñaron oligonucleótidos solapantes que cubrían la secuencia codificante del dominio hidrófilo específico (aminoácidos 268-400) de proCOL11A1, identificado según lo descrito en el apartado anterior. A este dominio se le denominó proCOL11A1-T (Truncado) para diferenciarlo de la proteína completa. Los oligonucleótidos se diseñaron mediante el programa Gene2Oligo y se ensamblaron mediante LCR seguida de PCR, usando para la PCR una pareja de primers externos modificados con sitios de corte únicos para enzimas de restricción [Primer directo, con sitio de restricción para EcoRI, secuencia: ATCGGAGAATTCTCTTCAGCACCCAAGGCT (SEQ ID NO: 42) y primer reverso, con sitio de restricción para PstI, secuencia: GCTTCGGACGTCAATTATACGTGGTACCGGTAAA (SEQ ID NO: 43)]. El fragmento sintético generado se visualizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 4A), observándose una amplificación del fragmento de proCOL11A1-T esperado de 444 nucleótidos de longitud. Una vez generado el inserto, la metodología de clonaje fue similar a la descrita anteriormente: digestión de inserto y vector con enzimas de restricción, purificación con minicolumnas de afinidad, ligación y transformación de células *E. coli* competentes de la cepa JM109. El *screening* de PCR realizado sobre lisados de colonias resistentes a kanamicina reveló 6 clones positivos y 2 negativos de las 8 colonias analizadas (Figura 4B, Resultado del *screening* de las colonias transformantes. Las colonias 1-7 resultaron contener el fragmento pro-COL11A1-T). Los plásmidos de las colonias positivas se purificaron como se ha descrito y se guardaron como cultivos stock en glicerol.

#### Expresión y purificación de proteínas recombinantes

##### Optimización de las condiciones de expresión

Tal y como se ha descrito en Materiales y Métodos, se realizaron cultivos de bacterias transformadas en medio LB, se indujo la expresión de las proteínas de fusión con IPTG/arabinosa, se extrajeron proteínas de dichos cultivos y se analizaron mediante SDS-PAGE seguida de tinción con azul de Coomassie. El análisis mediante SDS-PAGE de extractos proteicos de cultivos transformados con los diferentes plásmidos de expresión construidos reveló en la mayoría de los casos la aparición de una banda del tamaño esperado exclusiva del cultivo inducido con IPTG o IPTG/arabinosa. De esta manera, se verificó que los plásmidos generados por clonaje en el vector pET41a del gen col11a1-T eran funcionales; es decir, que dirigían la expresión de las correspondientes proteínas fusionadas a GST. También se confirmó la expresión de la proteína GST en cultivos transformados con el vector pET41a. En la mayoría de los casos se obtuvo un nivel de expresión máximo a las 4 h tras la inducción con IPTG 1 mM y 0,2% de arabinosa. Estas condiciones se fijaron para los experimentos de expresión a mayor escala. Además se determinó la localización de las proteínas recombinantes, así como sus niveles de expresión. Las proteínas GST-COL11A1-T y GST se expresaron a alto nivel y se localizaron en el sobrenadante.

Para confirmar la identidad de las proteínas expresadas se analizaron los extractos de cultivos bacterianos por Western-blotting usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cola de GST (anti-GST mouse mAb, Novagen). Este análisis confirmó que las bandas de tamaño esperado observadas en los geles SDS-PAGE correspondían a las proteínas de fusión a GST (Figura 5).

##### Producción de proteínas recombinantes a mayor escala

Se abordó la expresión a mayor escala de la proteína de fusión GST-COL11A1-T con el objetivo de purificarla e inyectarla en conejos para obtener anticuerpos policlonales. También se expresó la proteína GST libre para emplearla en experimentos de depleción posteriores. Para ello se escalaron los experimentos puestos a punto a pequeña escala.

##### Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad

Siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos se purificó GST-COL11A1-T, mediante cromatografía de afinidad en columnas de glutatión (GST-Bind Kit, Novagen). La cuantificación de las bandas de proteína por densitometría (ImageJ) permitió establecer la eficiencia de recuperación de proteína en un 40-50% y enriquecimiento en proteína de fusión en las diferentes fracciones de la columna, que fue menor del 15% en el extracto inicial y superior al 80% en el eluido.

**Producción de anticuerpos policlonales**

Se inmunizaron dos conejos mediante inyección intramuscular de las proteínas de fusión purificadas GST-COL11A1-T en adyuvante de Freund. Tras las primeras inmunizaciones se realizaron sangrados cada 15 días para monitorizar el aumento del título y de la especificidad del anti-suero. Para ello se testó su reconocimiento del antígeno por Western-blotting. Se confirmó un aumento del título de los sueros y de su afinidad por las proteínas recombinantes GST-COL11A1-T, en especial en los dos últimos sangrados (6 y 7). La inmunización generó también una reactividad muy fuerte contra la proteína GST, lo que no es sorprendente dado el tamaño de GST respecto al de COL11A1-T. Para reducir posibles reacciones cruzadas de los anticuerpos anti-GST sobre otras proteínas en posteriores etapas del proyecto, se llevó a cabo una depleción de los sueros, mediante cromatografía de afinidad. Para ello se inmovilizó la proteína GST en una matriz de glutatión y se incubó el suero con dicha matriz-GST dos veces. De esta manera se mejoró la especificidad de los sueros anti-COL11A1-T.

**Producción de anticuerpos monoclonales**

Para la generación de estos anticuerpos monoclonales, se hiperinmunizaron ratones BALB/c con las proteínas recombinantes previamente producidas. Posteriormente, empleando células de mieloma Sp2/0 como partner de fusión, se generaron hibridomas de células B, siguiendo la tecnología convencional. A continuación, los sobrenadantes, que contenían los anticuerpos, fueron cribados mediante ELISA frente a la proteína proCOL11A1-T recombinante purificada. Finalmente, el sub-isotipado de los anticuerpos murinos, se llevó a cabo mediante el Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche Diagnostics GmbH). Se seleccionó un anticuerpo monoclonal (IgG1, kappa), correspondiente al clon 1E8.33, que presentó gran afinidad por la proteína proCOL11A1-T. La especificidad del anticuerpo por proCOL11A1 y la ausencia de reactividad cruzada con el colágeno tipo V (el que mayor homología presenta respecto al tipo XI, se llevó a cabo mediante western-blot (Figura 6). Además, se comprobó por inmunocitoquímica, la detección del proCOL11A1 en líneas celulares de rhabdomyosarcoma A204, que expresan mayoritariamente proCOL11A1 según análisis a nivel de mRNA, y en células de osteosarcoma SAOS-2, que expresan mayoritariamente COL5A1, observándose una tinción intracelular intensa en las células A204, y leve en las SAOS-2, y mostrando un patrón de tinción contrario al de proCOL5A1, que fue comprobado empleando un anticuerpo policlonal de conejo frente a dicha proteína (Figura 7).

Los dominios VL y VH del anticuerpo 1E8.33 fueron secuenciadas empleando procedimientos previamente descritos (Fernández-Sánchez et al. Immunol Letters 2009, 123:125-131), y comprobadas mediante las herramientas Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd.) y Bioedit sequence Alignment Editor 7.0.9 (Tom Hall, Ibis Biosciences, Carlsbad, USA), y analizadas por IMTG/V-QUEST (<http://imtg.cines.fr>) e IgBLAST de GeneBank (<http://www.ncbi.nih.gov>). Las características nucleotídicas y aminoácidas de las regiones VL y VH se resumen en la Tabla 11, y las características de la CDR, en la Tabla 12.

**Tabla 11**  
**Caracterización de los segmentos génicos y sustituciones aminoácidas de las regiones VL y VH del anticuerpo monoclonal 1E8.33 según IMGT/V-QUEST**

AcM 1E8.33	Genes de la línea germinal			Cambios en los aminoácidos					
	V <sub>H</sub>	D <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3
VH	IGHV1S34*01	IGHD5	IGHJ4*01	1 A17>S	0	1 H46>Q	1 S57>N	3 Q69>R K70>N E97>G	0
VL	IGKV4-50*01	N.A.	IGKJ1*01	0	0	0	0	1 A100>D	0

N.A.: No aplicable

\*: El asterisco forma parte de la manera establecida por el programa de designar alelos

**Tabla 12**  
**Características de las CDR del anticuerpo monoclonal 1E8.33**  
 \*: número de residuos en CDR1-CDR2-CDR3

AcM 1E8.33	Restos de aminoácidos en CDR1-CDR2-CDR3		
	CDR1	CDR2	CDR3
VH 8-8-12*	GYSFTGYY	INCYNGAT	AIWDYEFHVMDY
VL 5-3-9	SSVNY	YTS	QQFTSSPWT

\*: número de residuos en CDR1-CDR2-CDR3

Se comprobó que el anticuerpo monoclonal (AcM) 1E8.33 es un anticuerpo nuevo que no había sido previamente descrito.

El epítipo del proCOL11A1 detectado por el anticuerpo 1E8.33 fue mapeado ensayándolo frente a varios péptidos de 15 aminoácidos (solapados en 12 aminoácidos), que cubrían los residuos 255-409 del proCOL11A1. Ensayos de bloqueo del anticuerpo con varios péptidos corroboraron esta afirmación, ya que solo el péptido mencionado impidió la detección de proCOL11A1 en células A204 por parte del monoclonal (Figura 8).

#### EJEMPLO 6

#### Expresión diferencial de la proteína proCOL11A1 en muestras de tejido de páncreas, utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de proCOL11A1, mediante Inmunohistoquímica

#### 6.1 Materiales y Métodos

##### Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes con microtomo de biopsias de tejido fijado en formol e incluido en parafina. Los cortes de 3-4  $\mu\text{m}$  se secaron toda la noche a 54-56°C en estufa. Se aplicó un pre-tratamiento con buffer citrato a pH = 6,4 en olla a presión durante 4 minutos. Tras una titulación para ajustar la dilución adecuada, se incubaron las preparaciones con los anticuerpos policlonales específicos de proCOL11A1 a una dilución 1:1200 en diluyente S2022 (Dako, Carpinteria, California) y con el anticuerpo monoclonal 1E8.33 a una dilución 1:500. Se empleó el sistema de detección EnVision K4003 (Dako) y se reveló con diaminobencidina (Dako).

Se analizaron cincuenta y tres casos de adenocarcinoma ductal de páncreas, 2 casos de ampuloma y 24 casos de pancreatitis crónica con el anticuerpo policlonal específico de proCOL11A1 obtenido en el Ejemplo 5.

Asimismo, se analizaron cincuenta y dos casos de adenocarcinoma ductal de páncreas y 19 casos de pancreatitis crónicas con el anticuerpo monoclonal específico de proCOL11A1 (clon 1E8.33) descrito en el Ejemplo 5.

La inmunotinción se realizó con un ensayo doble ciego por 2 patólogos diferentes. Las puntuaciones fueron:

- 0 (sin tinción visible con ningún objetivo);
- 1 (tinción visible con objetivo 20X);
- 2 (tinción visible con objetivo 10X); y
- 3 (tinción visible con objetivo 4X).

Los portas inmunoteñidos también fueron cuantificados mediante análisis de imagen utilizando el programa QWin (Leica). Este estudio se realizó sobre imágenes de las áreas más teñidas. Las imágenes fueron tomadas a través de un objetivo de 20 aumentos (20X) de un microscopio Olympus BX61 y se almacenaron en una cámara Olympus Dp70. Se consideraron 7 parámetros diferentes: número de células positivas; superficie de las células positivas; superficie de las células teñidas; área de referencia; número de células positivas/área de referencia; superficie de las células teñidas/área de referencia; número de células positivas/ $\text{mm}^2$ ; e índice de saturación sobre un intervalo de 0 a 255.

##### Análisis de los datos estadísticos

Asumiendo unas varianzas desiguales, se utilizó el test de Welch para determinar el significado de las diferencias en los datos de imágenes entre adenocarcinoma ductal de páncreas (ACDP) y pancreatitis crónica. También se aplicó el test ANOVA. Se evaluó la correlación entre diversos parámetros de imagen con el test de correlación Spearman

Rank. Se representó la sensibilidad y especificidad de proCOL11A1 como un análisis de las características del operador receptor (ROC). Un área bajo la curva ROC (AUC) de 1 indica una discriminación perfecta (ACDP vs pancreatitis crónica), mientras que un área de 0,5 indica que la discriminación no es mejor que la elección aleatoria. La posición del punto de corte (cut-off) en la curva determinará el número de verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos. Todos los análisis fueron implementados usando el "Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 13)" y MedCalc v9.4.1.0.

## 6.2 Resultados

### 10 **Análisis de la expresión de la proteína proCOL11A1 por Inmunohistoquímica en muestras biológicas de individuos con ACDP, pancreatitis crónica y controles**

15 Se estudió la expresión de la proteína proCOL11A1 en cortes histológicos de biopsias de páncreas procedentes de individuos con ACDP, individuos con ampuloma y de biopsias procedentes de individuos con pancreatitis crónica, sin cáncer. El objetivo de estos experimentos fue determinar el tipo celular responsable de la expresión de esta proteína así como evaluar su patrón de expresión en las tres patologías pancreáticas.

20 Por un lado, se empleó el anticuerpo policlonal generado contra COL11A1-T (Figuras 9 y 10). La detección inmunohistoquímica de proCOL11A1 en los 53 pacientes con ACDP moderadamente diferenciado analizados, resultó positiva en la gran mayoría de los fibroblastos del estroma desmoplásico que rodea al tumor, observándose un grado de tinción intracitoplasmática fuerte (+++). En las 24 muestras de pancreatitis, la mayor parte (>95%) de los fibroblastos resultaron negativos para proCOL11A1, aunque se observó tinción (++) muy focal en escasos fibroblastos de las zonas más dañadas. En las dos muestras de ampuloma la tinción con anti-COL11A1-T resultó negativa, si bien las áreas de estroma eran menos abundantes que en las muestras de ACDP. Los niveles de Especificidad: 83% y Sensibilidad: 96% demuestran que el anticuerpo policlonal anti-proCOL11A1 se ha demostrado útil como marcador para determinar el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de adenocarcinoma ductal de páncreas vs pancreatitis.

30 Por otro lado, se procedió al análisis de la expresión de la proteína proCOL11A1 por Inmunohistoquímica en muestras biológicas de individuos con ACDP y pancreatitis crónica, utilizando el anticuerpo monoclonal 1E8.33. La alta sensibilidad y especificidad de la tinción de proCOL11A1 se mantuvo al utilizar el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (Figura 11).

#### EJEMPLO 7

### 35 **Evaluación de proCOL11A1 como marcador de diagnóstico y pronóstico de adenocarcinoma ductal de páncreas y como marcador de diagnóstico diferencial de adenocarcinoma ductal de páncreas vs pancreatitis crónica**

40 Empleando el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (Ejemplo 5), se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de muestras tumorales procedentes de individuos con adenocarcinoma ductal de páncreas (ACDP) en las que existía una proliferación de estroma peritumoral y se comparó la inmunotinción con respecto a muestras control de individuos con pancreatitis crónica.

45 En un estudio llevado a cabo con 71 sujetos: 52 casos de cáncer de páncreas (ACDP) y 19 casos de pancreatitis crónica, la inmunodetección del proCOL11A1s mediante el anticuerpo monoclonal específico (1E8.33), permitió discriminar entre ACDP y pancreatitis crónica con una alta precisión: Especificidad: 74%, Sensibilidad: 94%. Esto es muy importante clínicamente porque existe un porcentaje significativo de casos en los que el diagnóstico diferencial del cáncer de páncreas (ACDP) y la pancreatitis crónica presenta dificultades. Incluso el análisis anatomopatológico de la biopsia pancreática puede no ser concluyente en casos en los que el parénquima pancreático está muy degradado o la cantidad de material biopsiado es escasa.

#### EJEMPLO 8

### 55 **Evaluación de proCOL11A1 como marcador de diagnóstico, diagnóstico diferencial y pronóstico de diferentes tipos de carcinomas**

60 Adicionalmente, empleando el anticuerpo monoclonal 1E8.33 (Ejemplo 5), se llevó a cabo una batería de análisis inmunohistoquímicos, en tejidos humanos, con el objetivo de evaluar el potencial de proCOL11A1 como marcador diagnóstico, diagnóstico diferencial y pronóstico en diferentes tipos de cáncer. Para ello se tomaron muestras tumorales en los que existía una proliferación de estroma peritumoral y se comparó la inmunotinción respecto a muestras control sanas y/o muestras fibróticas benignas del mismo órgano. Los resultados obtenidos hasta el momento ponen de manifiesto el potencial diagnóstico y pronóstico de este marcador proCOL11A1.

65

### 8.1 Carcinoma infiltrante de mama. Diagnóstico diferencial de adenocarcinoma ductal infiltrante de mama vs adenosis esclerosante

En un estudio llevado a cabo con 103 sujetos: 51 casos de carcinoma infiltrante de mama, y 52 casos de lesiones fibróticas benignas de mama (adenosis esclerosante), la inmunodetección de proCOL11A1 mediante el anticuerpo monoclonal específico 1E8.33, permitió discriminar entre adenocarcinoma ductal infiltrante de mama y fibrosis benigna con una alta precisión: AUC = 0,97, Especificidad: 92%, Sensibilidad: 96%.

Conclusiones: El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 1E8.33 ha demostrado ser útil como marcador para determinar el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de adenocarcinoma ductal infiltrante de mama vs adenosis esclerosante de mama (Figuras 12 y 13).

### 8.2 Carcinoma infiltrante de mama. Diagnóstico diferencial de carcinoma infiltrante de mama vs lesiones benignas

En un estudio llevado a cabo con 161 sujetos: 102 casos de carcinoma infiltrante de mama, y 59 casos de lesiones fibróticas benignas de mama, la inmunodetección de proCOL11A1 mediante el anticuerpo monoclonal específico 1E8.33, permitió discriminar entre cáncer infiltrante de mama y fibrosis benigna con una alta precisión: AUC = 0,88, Especificidad: 81%, Sensibilidad: 92%.

Conclusiones: El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 ha demostrado ser útil como marcador para determinar el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de a y adenocarcinoma ductal infiltrante de mama vs lesiones benignas.

### 8.3 Carcinoma infiltrante de mama. Diagnóstico diferencial de adenocarcinoma ductal infiltrante de mama vs carcinoma *in situ*

En un estudio llevado a cabo con 36 sujetos con carcinoma de mama: 29 de ellos presentaban un tumor infiltrante, y los 7 en restantes se trataba de un carcinoma *in situ* la inmunodetección de proCOL11A1 mediante el anticuerpo monoclonal específico 1E8.33, permitió discriminar entre adenocarcinoma ductal infiltrante de mama y carcinoma *in situ* con una alta precisión: Especificidad: 79.31%, Sensibilidad: 71.43%.

Conclusiones: El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 1E8.33 ha demostrado ser útil como marcador para determinar el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de adenocarcinoma ductal infiltrante de mama vs carcinoma *in situ*.

### 8.4 Adenocarcinoma bronquioalveolar. Pronóstico, Diagnóstico y Diagnóstico diferencial de adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar versus adenocarcinoma bronquioalveolar

Con el objetivo de investigar la utilidad del anticuerpo monoclonal 1E8.33, específico de proCOL11A1, en la detección de invasión estromal en adenocarcinomas bronquioloalveolares, se llevó a cabo la inmunotinción con dicho anticuerpo monoclonal 1E8.33 en una serie de 9 casos de adenocarcinoma bronquioalveolar y 6 casos de adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar.

Los resultados pusieron de manifiesto ausencia de tinción en 7 de los 9 casos de adenocarcinoma bronquioalveolar mientras que los 6 casos de adenocarcinoma con patrón bronquioloalveolar se tiñeron ( $p=0,0034$ ).

Conclusiones: El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 1E8.33 ha demostrado ser útil como marcador para determinar la invasión estromal en casos dudosos de adenocarcinoma bronquioalveolar y, por tanto, es útil para el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de adenocarcinoma bronquioloalveolar, vs adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioloalveolar.

### 8.5 Adenocarcinoma de colon. Pronóstico, Diagnóstico y Diagnóstico diferencial de adenocarcinoma de colon vs fibrosis benignas

En un estudio llevado a cabo con 64 sujetos: 29 casos de adenocarcinoma de colon, 6 casos control de fibrosis benigna (2), infarto (2) y diverticulitis (2), y 29 controles internos extraídos de áreas no tumorales del correspondiente colon con cáncer, la inmunodetección de proCOL11A1 mediante el anticuerpo monoclonal 1E8.33 reveló la presencia de dicho marcador (proCOL11A1) en el estroma del 100% de los casos de cáncer de colon, y sólo en el 5% de los controles, así como la ausencia en el 100% de los fibroblastos de áreas no tumorales del correspondiente colon con cáncer (Figura 14)

: Tinción de fibroblastos procedentes de cortes histológicos de biopsias de colon, procedentes de individuos con carcinoma de colon. Tinción con Eosina-Hematoxilina y anticuerpo monoclonal proCOL11A1 (clon 1E8.33).

Conclusiones: El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1, 1E8.33, ha demostrado ser útil como marcador para el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de adenocarcinomas de colon versus otras patologías benignas de colon.

5 **8.6 Carcinoma de cabeza y cuello. Diagnóstico, diagnóstico diferencial y pronóstico de carcinomas escamosos infiltrantes del área otorrinolaringológica**

10 En una serie de 50 casos de tumores de malignos de cabeza y cuello (8 mujeres y 42 hombres de entre 45 y 85 años); 9 casos de cáncer de boca, 11 casos de cáncer de faringe; 11 casos de cáncer de laringe; 17 casos de cáncer de lengua; 1 caso de cáncer de nariz; y 1 caso de cáncer de seno maxilar, la inmunodetección de proCOL11A1 con el anticuerpo monoclonal 1E8.33, permitió confirmar la presencia de proCOL11A1 en el 90% de las muestras analizadas. Solamente en 1 muestra de cáncer de boca, 1 de cáncer de lengua y 3 de cáncer de laringe, se observó ausencia total de tinción específica. La ausencia de tinción en tejido normal, se confirmó analizando el tejido normal adyacente a las muestras tumorales estudiadas (epitelio escamoso benigno).

15 Conclusiones: El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1 ha demostrado ser útil como marcador para determinar el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de carcinomas escamosos infiltrantes del área otorrinolaringológica vs otras patologías benignas (Figura 15).

20 **8.7 Carcinoma peritoneal. Diagnóstico y pronóstico de carcinomatosis peritoneales**

25 En una serie de muestras históricas parafinadas de implantes peritoneales de adenocarcinomas de las siguientes tumoraciones primarias: 6 casos de cáncer de colon y 5 casos de cáncer genital femenino (endometrio y ovario), la inmunodetección de proCOL11A1 con el anticuerpo monoclonal 1E8.33, permitió confirmar la presencia de proCOL11A1, que se expresa focalmente e intensamente en fibroblastos del estroma tumoral desmoplásico de implantes peritoneales de adenocarcinomas de origen colónico, endometrial y ovárico; la tinción era más intensa en los poco diferenciados.

30 Conclusiones: Este estudio preliminar demuestra que los fibroblastos peritumorales de implantes peritoneales expresan proCol11A1 (Figura 16). El anticuerpo monoclonal anti-proCOL11A1, 1E8.33, ha demostrado ser útil como marcador para el pronóstico, diagnóstico y diagnóstico diferencial de carcinomatosis peritoneales.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para detectar la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, para determinar o pronosticar la malignidad, la invasividad, el estadio y/o la severidad de dicho carcinoma en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho carcinoma, que comprende:
- 5 a) la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 en una muestra de dicho individuo;
- 10 b) la comparación de la presencia y/o cantidad de dicha proteína proCOL11A1 detectada en dicha muestra de dicho individuo con la cantidad de proteína proCOL11A1 detectada en una muestra control; y
- 15 c) correlacionar el resultado obtenido con la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, la determinación o pronóstico de la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo, o la monitorización del efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo;
- con la condición de que dicho carcinoma a detectar no es adenocarcinoma ductal infiltrante de mama ni adenocarcinoma ductal pancreático;
- 20 o, alternativamente
- a) la detección y/o cuantificación del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo;
- 25 b) la comparación de la cantidad de mRNA del gen col11a1 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en dicha muestra de dicho individuo, con la cantidad del mRNA del gen col11a1 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra control; y
- 30 c) correlacionar el resultado obtenido con la presencia de un carcinoma invasivo en un individuo, la determinación o pronóstico de la malignidad, invasividad, estadio y/o severidad de dicho carcinoma invasivo en dicho individuo, o la monitorización del efecto de la terapia administrada a dicho individuo que presente dicho carcinoma invasivo;
- 35 con la condición de que dicho carcinoma a detectar no es carcinoma de vejiga y de que dicho carcinoma cuya invasividad se desea conocer no es cáncer de mama, colon, pulmón u ovario.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho carcinoma invasivo se selecciona del grupo formado por carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.
- 40 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicha muestra es una muestra de tejido, preferiblemente de tejido de riñón, vejiga, páncreas, colon, pulmón, o cabeza o cuello.
- 45 4. Método según la reivindicación 3, en el que dicha muestra de tejido a analizar se obtiene mediante biopsia, cistoscopia o resección quirúrgica.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra es una muestra de bilis, exudado de flujo gástrico, heces, orina, plasma, líquido ascítico, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido peritoneal, líquido pleural, líquido sinovial, orina, saliva, sangre, semen o suero,
- 50 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha muestra a analizar es una muestra seleccionada entre:
- 55 una muestra de un individuo al que no se le ha diagnosticado previamente un carcinoma;
- una muestra de un individuo al que se le ha diagnosticado previamente un carcinoma; y
- una muestra de un individuo en tratamiento, o que ha sido tratado previamente, contra un carcinoma.
- 60 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, la obtención a partir de dicha muestra de un extracto de proteínas o de un extracto que comprende RNA total.
8. Método según la reivindicación 7, en el que la detección de la proteína proCOL11A1 comprende poner en contacto el extracto de proteínas de la muestra con un anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 bajo condiciones que permiten la formación de un complejo anticuerpo-proteína proCOL11A1.
- 65

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo específico contra la proteína proCOL11A1 es un anticuerpo que reconoce un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la proteína proCOL11A1.
- 5 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, que comprende, además, la detección y/o cuantificación del complejo anticuerpo-proteína proCOL11A1 formado.
- 10 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que la detección y/o cuantificación del complejo anticuerpo-proteína proCOL11A1 formado comprende el empleo de una técnica seleccionada del grupo formado por Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioimmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Competitive enzyme immunoassay o Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (Double antibody sandwich-ELISA o ensayo ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas de detección multiplex basadas en el empleo de microsferas, biochips o microarrays de proteínas que incluyen anticuerpos específicos, o ensayos basados en precipitación coloidal.
- 15 12. Método según la reivindicación 7, en el que la detección y/o cuantificación de la proteína proCOL11A1 se lleva a cabo mediante cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.
- 20 13. Método según la reivindicación 7, en el que la detección del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA comprende una primera etapa de amplificación del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, o del correspondiente cDNA sintetizado por retrotranscripción del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen col11a1.
- 25 14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha amplificación se realiza de manera cualitativa o cuantitativa, mediante transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) en presencia de cebadores específicos del gen col11a1.
- 30 15. Método según la reivindicación 14, en el que dicha RT-PCR se lleva a cabo en presencia de la pareja de oligonucleótidos cebadores cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.
- 35 16. Método según la reivindicación 7, en el que la detección del mRNA del gen col11a1 o del correspondiente cDNA se realiza mediante sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen col11a1, o mediante Northern-blot o transferencia Northern.
- 40 17. Método según la reivindicación 7, en el que la detección del mRNA del gen col11a1 se efectúa mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).
- 45 18. Un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que mantiene la capacidad de unirse a la proteína proCOL11A1.
- 50 19. Anticuerpo según la reivindicación 19, que reconoce un epítipo situado en el dominio VAR del extremo N-terminal de la proteína proCOL11A1.
- 55 20. Un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, que comprende, dentro de la región variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>), al menos una región determinante de complementariedad (CDR) seleccionada entre:
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 (GYSFTGY) [CDR-H1] o una variante de la misma;
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 (INCYNGAT) [CDR-H2] o una variante de la misma; y
- 60 - una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 (AIWDYEFHVMDY) [CDR-H3] o una variante de la misma.
21. Anticuerpo según la reivindicación 20, que comprende, dentro de la región V<sub>H</sub>, dos de dichas CDRs seleccionadas entre las CDRs cuyas secuencias de aminoácidos comprenden las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 3 a 5.
22. Anticuerpo según la reivindicación 20, que comprende, dentro de la región V<sub>H</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [CDR-H1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 [CDR-H2] o una variante de la misma, y una

- CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma.
- 5 23. Anticuerpo según la reivindicación 20, que comprende, además, dentro de la región variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>), al menos una CDR seleccionada del grupo formado por:
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 (SSVNY) [CDR-L1] o una variante de la misma;
- 10 - una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma; y
- una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 (QQFTSSPWT) [CDR-L3] o una variante de la misma.
- 15 24. Anticuerpo según la reivindicación 23, que comprende, dentro de la región V<sub>L</sub>, dos de dichas CDRs seleccionadas entre las CDRs cuyas secuencias de aminoácidos comprenden las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 6 ó 7.
- 20 25. Anticuerpo según la reivindicación 23, que comprende, dentro de la región V<sub>L</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma.
- 25 26. Anticuerpo según la reivindicación 23, que comprende:
- dentro de la región V<sub>H</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [CDR-H1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 [CDR-H2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 [CDR-H3] o una variante de la misma; y
- 30 - dentro de la región V<sub>L</sub>, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [CDR-L1] o una variante de la misma, una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos YTS [CDR-L2] o una variante de la misma, y una CDR que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [CDR-L3] o una variante de la misma.
- 35 27. Anticuerpo según la reivindicación 20, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 o una variante de la misma.
- 40 28. Anticuerpo según la reivindicación 23, en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 o una variante de la misma.
29. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 27 ó 28, que comprende:
- una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 8 [VH\_1E8.33] o una variante de la misma, y
  - una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 [Vkappa\_1E8.33] o una variante de la misma.
- 50 30. Anticuerpo según la reivindicación 20, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo recombinante, o un fragmento de anticuerpo que mantiene la capacidad de unirse a la proteína proCOL11A1.
- 55 31. Uso de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, para el diagnóstico, pronóstico y/o diagnóstico diferencial de un carcinoma.
- 60 32. Uso de un anticuerpo según la reivindicación 31 para detectar *in vitro* la presencia de un carcinoma, en el que dicho carcinoma se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.
- 65 33. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un carcinoma invasivo.

34. Uso de un anticuerpo según la reivindicación 33, en el que dicho carcinoma se selecciona entre carcinoma renal, carcinoma transicional invasivo de vejiga, adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma infiltrante de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma pulmonar con patrón bronquioalveolar, carcinoma escamoso infiltrante de cabeza y cuello y carcinomatosis peritoneales.

5 35. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de, al menos, un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1, según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, junto con un excipiente o sustancia transportadora farmacéuticamente aceptable.

10 36. Composición farmacéutica según la reivindicación 35, que comprende, además, un ingrediente activo adicional, preferiblemente un ingrediente activo que inhibe la función de la proteína proCOL11A1.



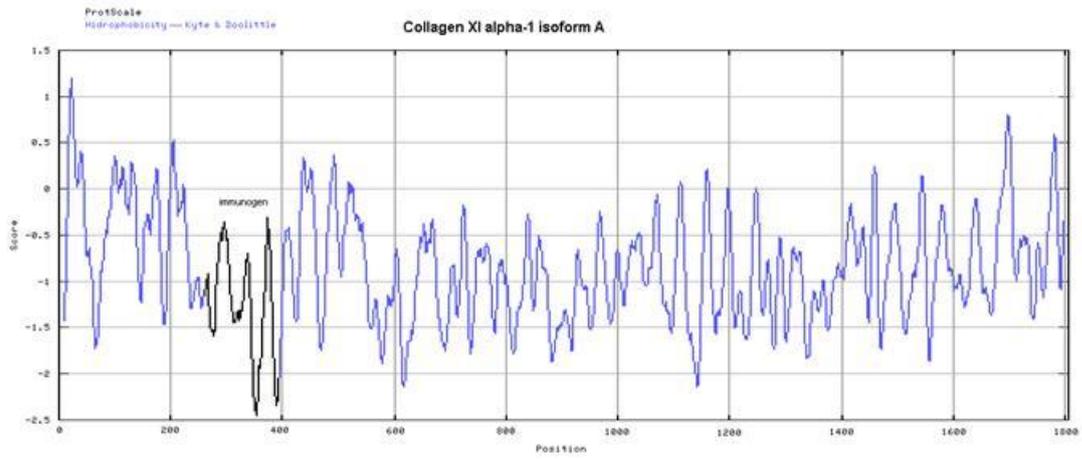


Figura 3

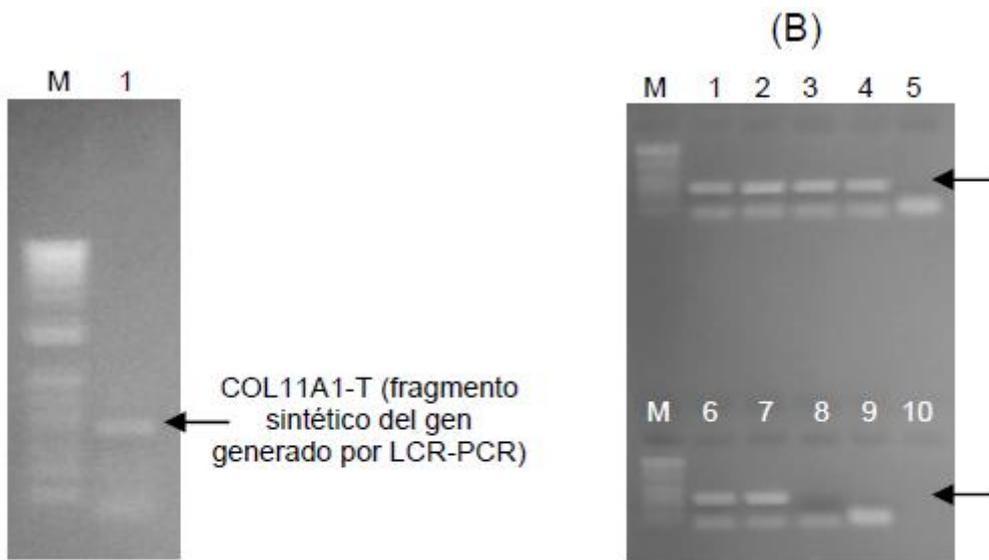


Figura 4

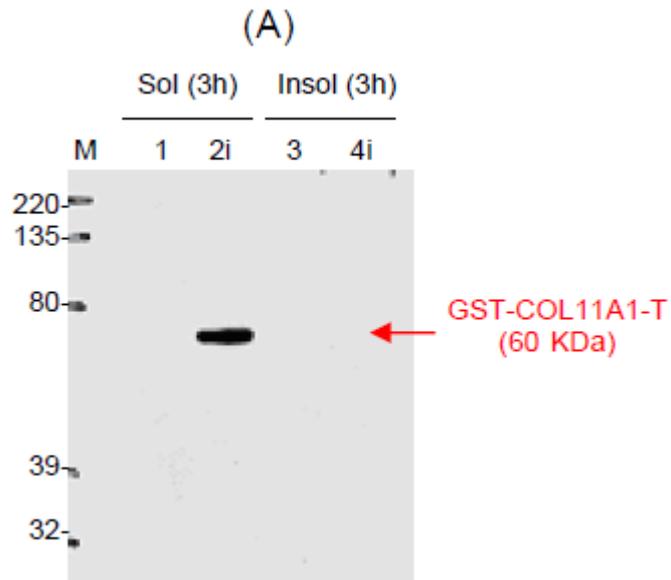


Figura 5

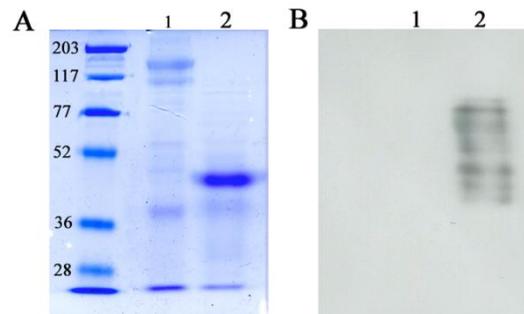
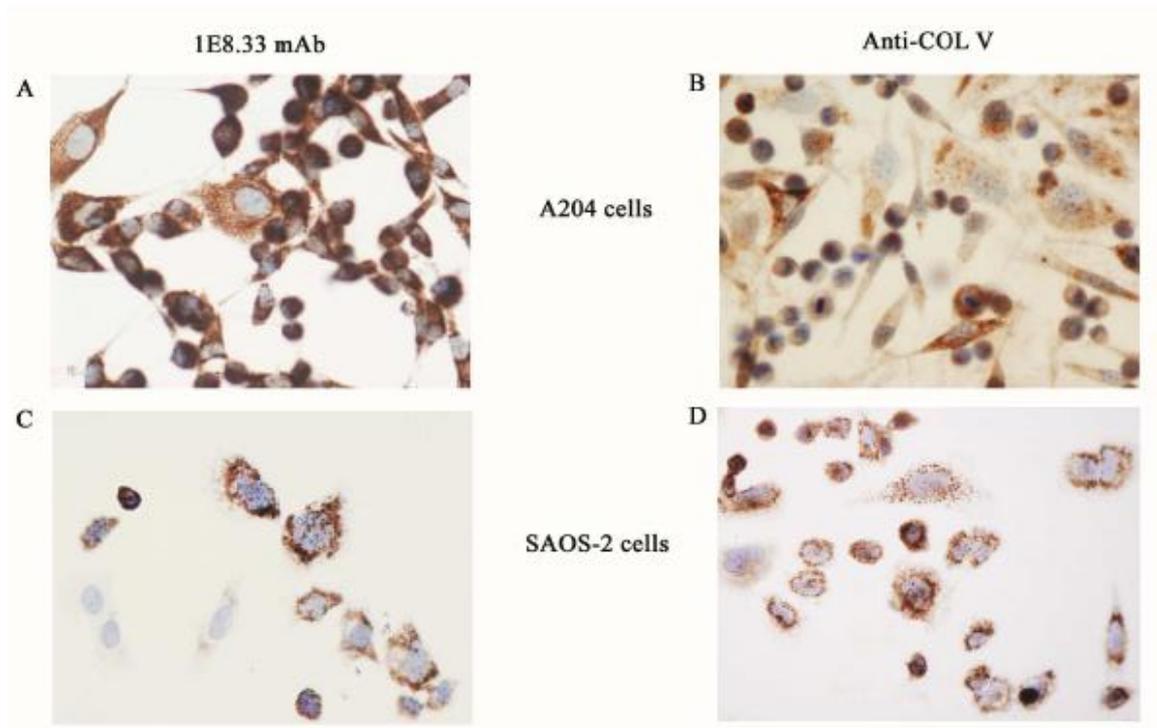
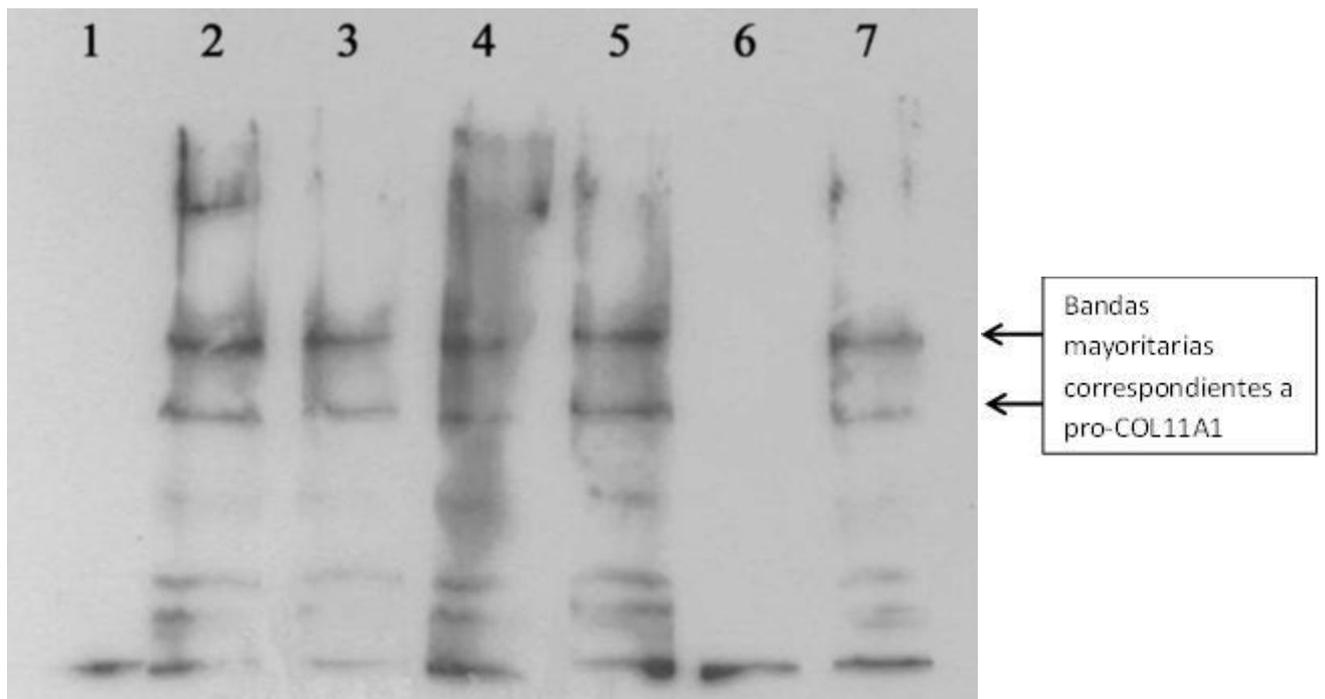


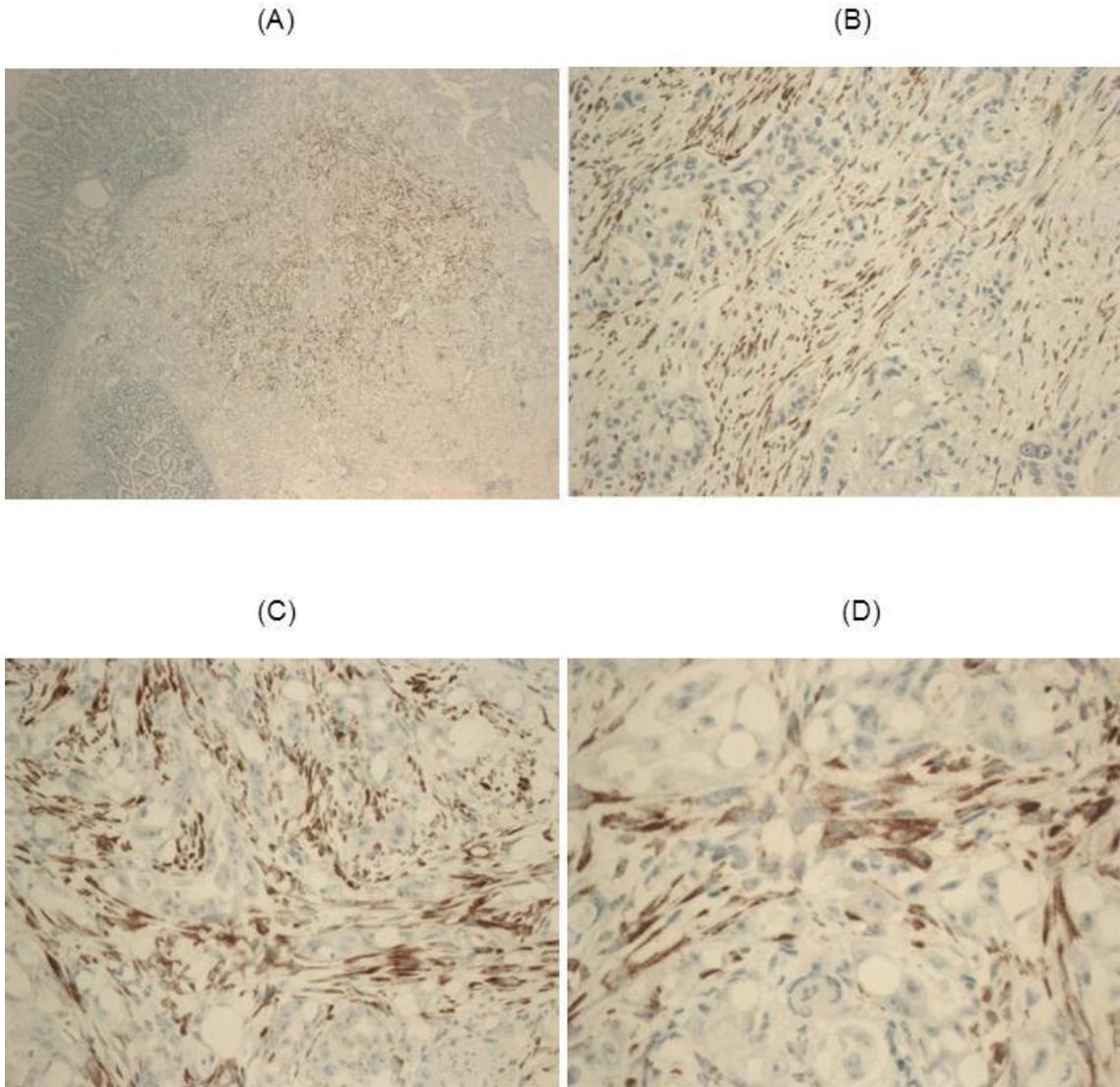
Figura 6



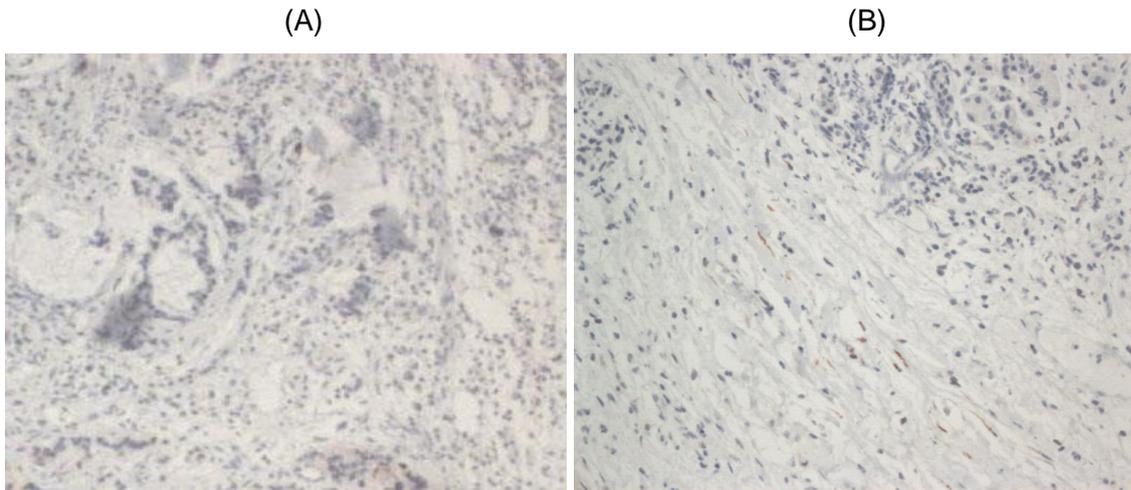
**Figura 7**



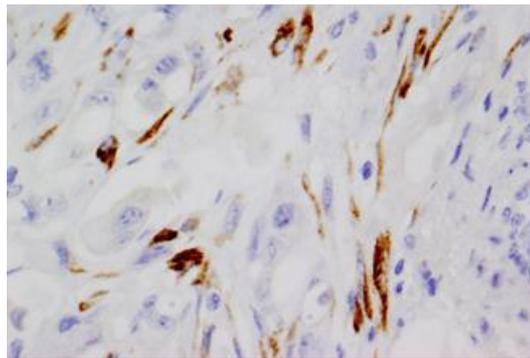
**Figura 8**



**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**

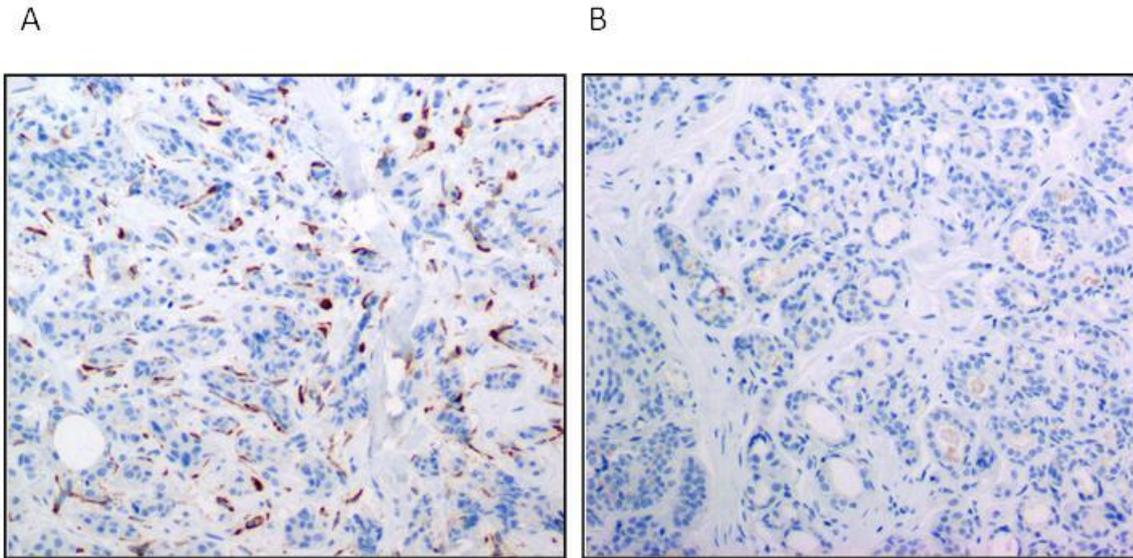


Figura 12

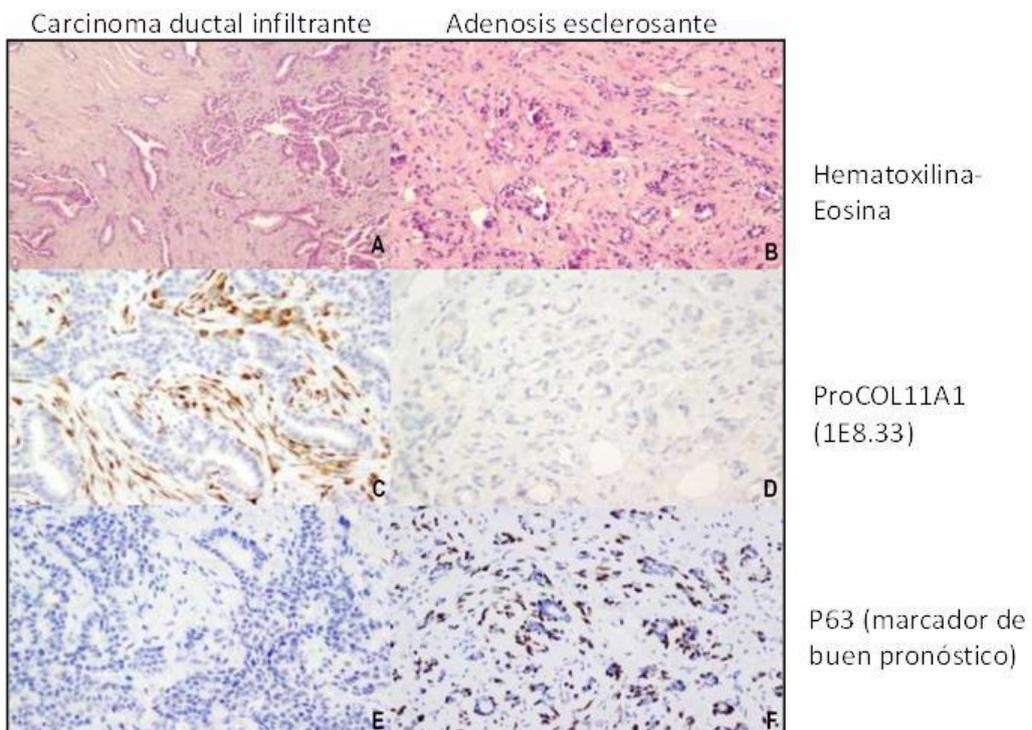
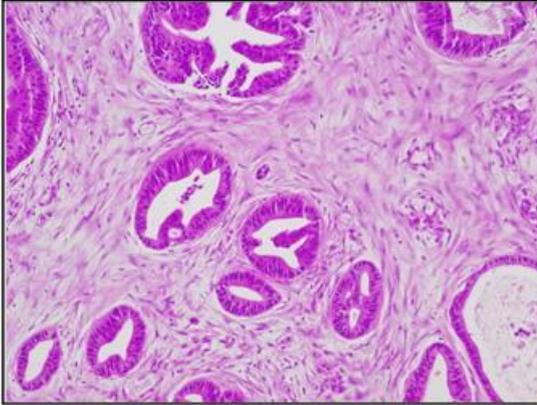
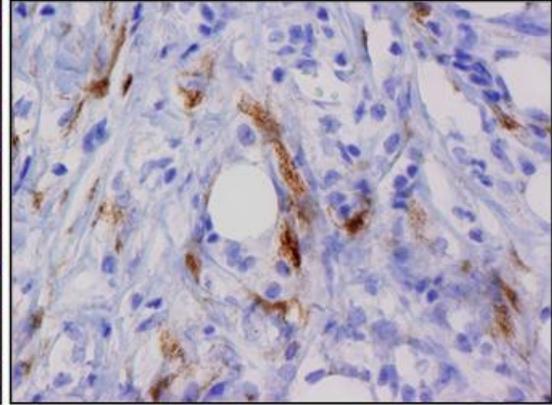


Figura 13

Cáncer de colon Hematoxilina-Eosina

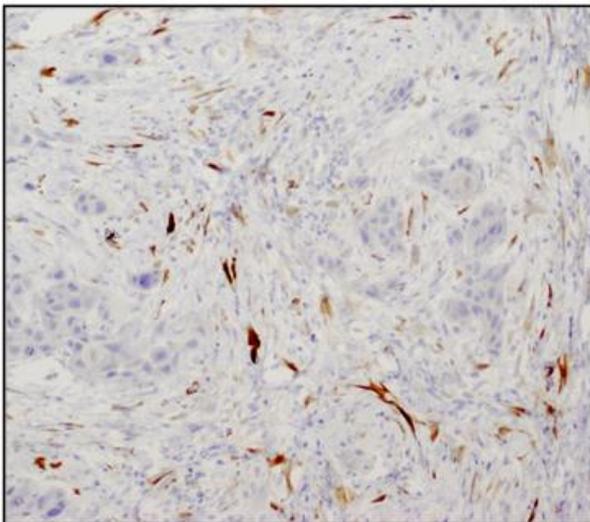


Cáncer de colon (detalle) Anti-proCOL11A1



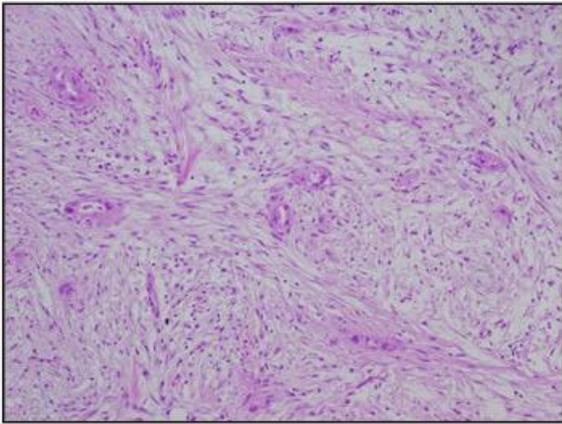
**Figura 14**

Carcinoma de boca-laringe. Anti-proCOL11A1

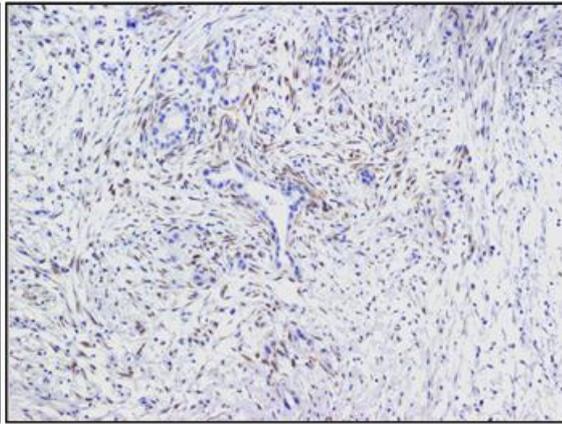


**Figura 15**

Cáncer de endometrio.  
Hematoxilina -Eosina



Cáncer de endometrio.  
Anti-proCOL11A1



**Figura 16**



- ②① N.º solicitud: 201131374  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.08.2011  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZHAO Y. et al. A Potential Role of Collagens Expression in Distinguishing Between Premalignant and Malignant Lesions in Stomach. The Anatomical Record. 2009. Vol. 292, páginas: 692-700, todo el documento.	1-17
X	FISCHER H. et al. Colorectal carcinogénesis is associated with stromal expression of COL11A1 and COL5A2. Carcinogénesis. 2001. Vol. 22(6), páginas: 875-878.	2-17
X	WANG K. et al. Novel candidate tumor marker genes for lung adenocarcinoma. Oncogene. 2002, Vol. 21, páginas: 7598-7604.	2-17
X	GARCIA PRAVIA C. et al. Anti-pro COLL11A1, a new marker of infiltrating breast cancer. ESSR Abstract 2009. British Journal of Surgery. 2009. Vol. 96(S5), páginas: 1-72, página 11, abstract O-05-4.	18,31-36

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
22.02.2013

Examinador  
M. D. García Grávalos

Página  
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.02.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 2-17, 19-29	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1, 18, 31-36	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 19-29	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18, 31-36	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ZHAO Y. et al. The Anatomical Record. 2009. Vol. 292, páginas: 692-700.	2009
D02	FISCHER H. et al. Carcinogénesis. 2001. Vol. 22(6), páginas: 875-878.	2001
D03	WANG K. et al. Oncogene. 2002, Vol. 21, páginas: 7598-7604.	2002
D04	GARCIA PRAVIA C. et al. ESSR Abstract 2009. British Journal of Surgery. 2009. Vol. 96(S5), páginas: 1-72.	2009

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente invención divulga un método *in vitro* para detectar en un paciente la presencia de un carcinoma invasivo, para determinar o pronosticar el estadio o invasividad de dicho carcinoma, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un paciente que presenta dicho carcinoma, basado en la expresión del gen *col11a1*, o de la proteína proCOL11A1, en una muestra biológica (reivindicaciones 1-17). Se refiere también a un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1 y a su uso en la elaboración de un medicamento para tratamiento de un carcinoma invasivo (reivindicaciones 18-36).

El documento D01 divulga los genes *col11a1* y *col1a1* como marcadores del cáncer de estómago en fases premaligna y maligna. Este documento se refiere a un estudio realizado con muestras de lesiones de estómago y muestras de tejido sano, utilizando el *mRNA* extraído de las muestras en ensayos de arrays de oligonucleótidos (ver todo el documento).

El documento D02 divulga la asociación entre la carcinogénesis colorectal y la expresión de los genes *col11a1* y *col5a2* en el estroma gastrointestinal. Este documento se refiere a un estudio realizado con muestras procedentes de pacientes con carcinoma colorectal y empleando como control muestras de epitelio de colon de individuos adultos que no padecen la enfermedad. Utilizando el *mRNA*, se analiza la expresión de los genes y los resultados muestran que la mayoría de las muestras tumorales expresan el gen *col11a1* que no es expresado en las células epiteliales normales (ver todo el documento).

El documento D03 divulga una serie de genes, entre los que se encuentra *col11a1*, como posibles marcadores de adenocarcinoma de pulmón. Este documento se refiere a un estudio realizado con muestras de adenocarcinoma de pulmón y, como control, sus correspondientes muestras de tejido pulmonar normal (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un anticuerpo anti-proCOL11A1 como nuevo marcador para diagnóstico de cáncer de mama (ver página 11, *abstract O-05-4*).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**

La presente solicitud divulga un método *in vitro* para detectar en un paciente la presencia de un carcinoma invasivo, para determinar o pronosticar el estadio o invasividad de dicho carcinoma, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un paciente que presenta dicho carcinoma, basado en la expresión del gen *col11a1*, o de la proteína proCOL11A1, en una muestra biológica (reivindicaciones 1-17). Se refiere también a un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1 y a su uso en la elaboración de un medicamento para tratamiento de un carcinoma invasivo (reivindicaciones 18-36).

**1.1. REIVINDICACIONES 1-17**

La presente invención, según las reivindicaciones 1-17, divulga un método *in vitro* para detectar en un paciente la presencia de un carcinoma invasivo (a condición de que no sea cáncer de mama, colon, pulmón u ovario), basado en la expresión del gen *col11a1* en una muestra biológica. El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa la detección del *mRNA* del gen *col11a1* en muestras de tejido gástrico como marcador del cáncer de estómago en fases premaligna y maligna.

La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de la invención radica en la exclusión de ciertos tipos de carcinoma según se busque la detección del *mRNA* o la expresión de la proteína proCOL11A1.

En consecuencia, según lo divulgado en D01, la reivindicación 1 no cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Según lo divulgado en D01, las reivindicaciones 2-17 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Sin embargo, siendo el uso del gen *col11a1* como marcador genético de carcinomas invasivos, comparando la expresión del *mRNA* de muestras tumorales y normales, ampliamente conocido en el estado de la técnica (de hecho, los documentos D02 y D03 también anticipan el gen *col11a1* como marcador genético de la carcinogénesis colorectal y de adenocarcinoma de pulmón), se considera que sería obvio para un experto en la materia el uso de este marcador para diagnóstico de otros tipos de carcinomas invasivos, así como el uso la expresión de la proteína que codifica dicho gen, empleando técnicas y aplicaciones de análisis de datos de uso corriente en microbiología.

En consecuencia, las reivindicaciones 2-17 no cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

## 1.2. REIVINDICACIONES 18-33

La presente invención, según las reivindicaciones 18-33, divulga un anticuerpo que se une específicamente a la proteína proCOL11A1 y a su uso en la elaboración de un medicamento para tratamiento de un carcinoma invasivo. El documento D04 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un anticuerpo anti-proCOL11A1 con capacidad de unirse a la proteína proCOL11A1.

La diferencia entre el documento D04 y el objeto técnico de la invención radica en la determinación del anticuerpo de la invención según reivindicaciones 19-30, que especifica la región que reconoce el epítipo y las secuencias de aminoácidos que lo forman.

En consecuencia, según lo divulgado en D04, las reivindicaciones 18, 31-36 no cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Según lo divulgado en D04, las reivindicaciones 19-30, cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).