

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 443**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2006** **E 06791599 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012** **EP 1920256**

54 Título: **Método in vitro para diagnosticar y monitorizar carcinoma de células renales (RCC) usando MMP-7 como biomarcador humoral para el RCC**

30 Prioridad:

26.08.2005 EP 05291783

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2013

73 Titular/es:

**CEZANNE S.A.S. (100.0%)
280 ALLEE GRAHAM BELL PARC SCIENTIFIC
GEORGES BESSE
30035 NIMES CEDEX 1, FR**

72 Inventor/es:

**DARBOURET, BRUNO y
SARKISSIAN, GAIANÉ**

74 Agente/Representante:

MIR PLAJA, Mireia

ES 2 399 443 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método *in vitro* para diagnosticar y monitorizar carcinoma de células renales (RCC) usando MMP-7 como biomarcador humoral para el RCC

1. Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método *in vitro* altamente sensible y específico, para el diagnóstico de carcinoma de células renales (RCC) basándose en el nuevo hallazgo de que una metaloproteinasa seleccionada, a saber MMP-7, y/o su precursor fisiológico, la pro-MMP-7, son elevadas en los fluidos corporales, especialmente el suero o plasma, de pacientes con RCC. La presente invención se refiere también a un método específico de ensayo con ligandos para la detección de MMP-7 en una muestra de fluido corporal, es decir, al uso de la MMP-7 como biomarcador humoral para el RCC.

[0002] En el contexto de la presente solicitud, los términos como “diagnosis” o “diagnóstico”, a no ser que se defina de otra manera más detalladamente o en un sentido más restrictivo, se usan habitualmente como términos genéricos destinados a cubrir no solamente la diagnosis en el sentido restrictivo de detección e identificación de una enfermedad o condición, sino también la monitorización del curso de una enfermedad ya diagnosticada, incluyendo la terapia que acompaña a la valoración del éxito de medidas terapéuticas, y el pronóstico para el curso esperado de una enfermedad y la supervivencia de un paciente.

[0003] La expresión “biomarcador humoral” se usa para describir biomarcadores, o una inmunorreactividad asociada a dichos biomarcadores, que se pueden determinar en fluidos corporales, especialmente en la circulación, por oposición a biomarcadores tisulares que requieren material de tejido, obtenibles habitualmente solo mediante biopsia o punción, para su determinación.

2. Antecedentes de la invención

[0004] El carcinoma de células renales (RCC) es el tercer tumor maligno más común del tracto urinario después del cáncer de próstata y de vejiga. Es un cáncer que resulta particularmente difícil de diagnosticar. De hecho, los pacientes con RCC con frecuencia tienen síntomas no específicos o se encuentran completamente asintomáticos hasta que se alcanza un estado relativamente avanzado. Consecuentemente, en el momento del diagnóstico, entre el 15 y el 25 % de pacientes con cáncer de riñón ya presentan RCC metastásico. Una vez que la enfermedad metastásica se desarrolla, el pronóstico para la supervivencia a largo plazo es malo.

[0005] En la actualidad, ocurre que normalmente el RCC se detecta mediante ecografía abdominal (US) y tomografía computerizada (CT). En ocasiones, el mismo es sugerido por una gammagrafía isotópica ósea o de perfusión renal. No obstante, estas técnicas consumen mucho tiempo y resultan caras.

[0006] Actualmente se están llevando a cabo esfuerzos por caracterizar el RCC usando técnicas biológicas moleculares, citogenéticas, inmunohistoquímicas así como basadas en proteomas. En este contexto, se han evaluado muchos marcadores en relación con su uso potencial como factores de diagnóstico o pronóstico. No obstante, hasta ahora ninguno de ellos se ha validado en ensayos definitivos. El estado actual de la cuestión se puede resumir de la manera siguiente:

La interleucina 6 y su receptor podrían jugar un papel en la proliferación tumoral así como en ciertos signos sintomáticos asociados al cáncer renal metastásico (Blay JY et al., Cancer Res. (1992) 52, 3317-22).

[0007] El FGF (Factor de Crecimiento Fibroblástico), un factor angiogénico, puede servir como marcador potencial de pronóstico en relación con la progresión de la enfermedad (Rak JW et al., Anticancer Drugs, (1995) 6, 3-18).

[0008] Se ha informado del inhibidor del activador del plasminógeno 1, un inhibidor específico de la uroquinasa, como factor pronóstico en la predicción de una recaída temprana del carcinoma de células renales. Se pueden discriminar grupos de riesgo alto y bajo en relación con la supervivencia sin enfermedad, por medio del contenido de antígeno del inhibidor del activador del plasminógeno 1 en el tejido tumoral (Hofmann R et al, J. Urol. (1996) 155, 858-62).

[0009] Estudios recientes han descrito que la expresión de la cadherina E, que juega un papel principal en la adhesión célula-célula del epitelio normal, se reduce en el cáncer renal. Su índice puede estar en correlación con la agresividad del tumor (Shimazui T, Cancer Res. (1996) 56, 3234-7).

[0010] el documento WO 02/082076 se refiere a la identificación de marcadores tumorales que son inmunogénicos en pacientes con RCC. Los autores dieron a conocer que estas proteínas se presentan en la superficie de la célula tumoral y, por lo tanto, no son circulantes. Los autores describen un inmunoensayo para detectar la presencia de anticuerpos circulantes específicos de estas proteínas marcadoras de tumor en el suero de un individuo. Por lo tanto, el

inmunoensayo no se basa en la detección directa de marcadores de RCC en la circulación sino en la detección indirecta de autoanticuerpos (circulantes) preparados en relación con proteínas marcadoras de tumor RCC presentes en el tejido de los pacientes. No se mencionan metaloproteinasas de matriz o anticuerpos contra metaloproteinasas de matriz.

5 **[0011]** Sigue existiendo la necesidad de marcadores tumorales adicionales para la detección y el seguimiento de carcinoma de células renales, especialmente de marcadores de tumores humorales que se pueden detectar en muestras de sangre y muestras de suero o plasma respectivamente, y que, por lo tanto, se pueden incluir en la lista de biomarcadores determinados en las revisiones médicas rutinarias de los pacientes. Si fuera posible diagnosticar precozmente tumores renales, esto tendría un impacto muy alto en la mejora del devenir del RCC. La disponibilidad de un ensayo diagnóstico eficaz posibilitaría el cribado rutinario de poblaciones de riesgo especialmente alto (es decir, pacientes con Von Hippel-Lindau, en hemodiálisis, transplantados o inmunodeprimidos (N.J. Vogelzang, (1998) The Lancet 352, 1691-1696)) y la detección de un tumor asintomático. Una prueba con marcadores humorales sensibles de carcinoma de células renales también tendría un valor elevado para la detección de la recidiva tumoral en pacientes con carcinoma de células renales después de una nefrectomía total o parcial. Un marcador de este tipo permitirá completar la evaluación de la extensión de la enfermedad. El mismo puede ayudar a limitar el uso de revisiones invasivas y adaptar la terapéutica antes. Dicho marcadores humoral facilitará la monitorización de tumores durante el tratamiento y permitirá una mejor predicción de respuestas terapéuticas y de pronósticos.

3. Resumen de la invención

20 **[0012]** Para lograr estos fines, y otros, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método *in vitro* para el diagnóstico de RCC sobre la base de un biomarcador humoral medible directamente en fluidos corporales de pacientes, más especialmente sangre, suero y plasma.

25 **[0013]** Basándose en las determinaciones y pruebas clínicas descritas en la presente, se proporciona, según la presente invención, tal como se caracteriza en la reivindicación 1, un método *in vitro* para diagnosticar o monitorizar carcinoma de células renales (RCC) en un paciente humano mediante la determinación, en una muestra de un fluido corporal del paciente, de un biomarcador cuyo nivel es indicativo de la presencia de RCC, y la asociación del nivel del biomarcador medido a la presencia de RCC, en donde el biomarcador es la metaloproteinasa de matriz 7 (MMP-7) peptídica que contiene metal y/o su forma de pro-enzima (pro-MMP-7), y se determina en una muestra de un fluido corporal seleccionado de entre suero, plasma y sangre.

30 **[0014]** En las reivindicaciones 2 a 4 se exponen reivindicaciones preferidas de dicho método basado en la determinación de la MMP-7 como biomarcador de RCC.

35 **[0015]** En dichas reivindicaciones, el término "nivel" significa cantidad o concentración la cual se puede proporcionar en números exactos de masa por volumen, aunque también comunidades arbitrarias definidas por la calibración del ensayo usado para la determinación.

40 **[0016]** La MMP-7 y la pro-MMP-7 son biomoléculas que contienen metal, peptídicas, de estructuras y secuencias de aminoácidos conocidas. La MMP-7 presenta actividad enzimática y pertenece a un grupo de moléculas relacionadas funcional y estructuralmente que se denominan "metaloproteinasas de matriz" las cuales, además de las denominaciones triviales, se caracterizan por abreviaturas sistemáticas que constan de las letras MMP y un número (es decir, MMP-xx). En humanos, se han identificado 16 miembros de esta familia (Kleiner et al., (1999) Cancer Chemother Pharmacol., 1999; 43 Suppl: S42-15), y si se consideran también especies no humanas, el número de MMPs es todavía mayor (un miniestudio de Hideaki Nagase et al. (1999), *J. Biol. Chem.* 274, págs. 21491-21494, enumera 20 miembros de la familia). Seguidamente se describen las MMPs en general y la MMP-7 en particular.

Metaloproteinasas de matriz

50 **[0017]** Las metaloproteinasas de matriz (MMPs), denominadas también matrixinas, constituyen una familia de endopeptidasas dependientes de cinc y calcio, que tienen una función en la degradación de la matriz extracelular (ECM).

55 **[0018]** Las MMPs se han implicado en una amplia variedad de procesos fisiológicos normales incluyendo la remodelación ósea y tisular, la resorción uterina, la implantación del trofoblasto, la angiogénesis, el desarrollo embrionario y la curación normal de heridas (Kleiner and Stetler-Stevenson, *Cancer Chemother Pharmacol.* (1999) 43 Suppl1:S42-51; Nagase, H. et al (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 2191). Cuando las mismas están presentes en exceso, se cree que participan también en la degradación acelerada de la ECM que está asociada a una serie de enfermedades incluyendo la periodontitis (Reynolds y Meikle, *J R Coll Surg Edinb.* (1997) 42(3) :154-60), la artritis, la aterosclerosis, ulceraciones tisulares, invasión de células tumorales, y metástasis (Birkedal-Hansen et al., *Crit Rev Oral Biol Med.* (1993) 4 (2) :197-250).

[0019] Se sabe que las metaloproteasas de matriz juegan un papel importante en la invasión tumoral por la mediación de la degradación de la matriz extracelular (Shiomi T et al, Cancer Metastasis Rev. (2003) 22(2-3), 145-152).

[0020] Se ha informado de que las metaloproteinasas de los tipos MMP-2 y MMP-9 son elevadas en el tejido tumoral de RCC, y se ha sugerido que sus niveles de expresión están en correlación con la agresividad del tumor (Kugler et al, J. Urol. 1998 Nov; 160(5): 1914-8).

[0021] Lein M et al observaron que la MMP-9 era elevada en el tejido tumoral de pacientes con RCC, mientras que la MMP-2 no era diferente entre el tejido tumoral y los homólogos normales (Int J Cancer 2000 Mar 15; 85 (6) :801-4).

[0022] Sherief et al describieron que es posible detectar en orina de pacientes con carcinoma de células renales una actividad enzimática elevada de metaloproteinasas de matriz, lo cual conduce a la degradación de proteínas de matriz extracelular (ECM) excretadas normalmente. Se analizaron proteínas de ECM urinaria reducidas mediante SDS-PAGE, seguido por una inmunotransferencia con anticuerpos contra tres tipos de proteínas de ECM. Se midió la actividad enzimática de la metaloproteinasas de matriz usando sustrato de colágeno IV conjugado con fluoresceína (Sherief MH, J Urol. (2003) 169(4), 1530-4).

[0023] En una determinación enzimática, no se miden directamente MMPs. Puesto que en mediciones de este tipo se determina solamente una actividad enzimática, las mismas no permiten extraer conclusiones fiables en relación con el tipo de MMP(s) responsable(s) de la actividad enzimática observada.

[0024] De modo similar, en el documento US 2004/0029200, se informó sobre un método para diagnosticar RCC mediante la detección, en orina de pacientes, de proteína de matriz extracelular como resultado de la degradación proteolítica por actividad enzimática de metaloproteinasas. Se menciona que las MMPs incluyen MMP-2, MMP-3 y MMP-9. Y lo que es más interesante, los autores especificaban que una actividad incrementada de metaloproteinasas no significa necesariamente que se deba incrementar la cantidad de una metaloproteinasas. Por lo tanto, se ha mostrado que las cantidades de MMP-2 y MMP-9 no se incrementan correspondientemente en la orina de pacientes con RCC en comparación con controles.

MMP-7

[0025] La MMP-7, la metaloproteinasas determinada en el método de la presente invención, estructuralmente es una de las más pequeñas de todas las MMPs, que consta de dos dominios, un pro-dominio y un dominio catalítico.

[0026] La MMP-7 se conoce también como Matrilisina, Pump-1 proteasa, metaloproteinasas uterina, metaloproteinasas de matriz 7, y Matrinas (número de acceso Swiss-Prot: P09237, EC 3.4.24.2).

[0027] La MMP-7 se secreta en forma de un precursor (pro-MMP-7) que es activado por acetato 4-aminofenilmercúrico (APMA) y tripsina de una manera escalonada (Imai K et al, J Biol Chem (1995) 270, 6691-6697). La activación de la proenzima implica una eliminación proteolítica de la pro-región N-terminal que contiene el motivo interruptor de cisteína (*cysteine switch*) conservado en MMPs (Van Wart, H.E. y H. Birkedal-Hansen (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5578).

[0028] La MMP-7 puede escindir una amplia gama de macromoléculas de matriz extracelular, tales como fibronectina, laminina, proteoglicano, elastina, gelatina y colágeno de tipo IV así como α_1 -antitripsina (Murphy G et al, Biochem J (1991) 277, 277-279; Sires U et al, Biochem Biophys Res Commun, (1994) 204, 613-620).

[0029] La MMP-7 se expresa en células epiteliales de tejidos normales y enfermos (Wilson, C.L. y L.M. Matrisian (1996) Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 123). Int. J. Biochem. Cell Biol. 28, 123).

[0030] La MMP-7 se sobreexpresa frecuentemente en varios cánceres tales como el gastrointestinal (McDonnell S et al, Mol Carcinog. (1991), 4(6), 527-33; Senota A, Clin. Exp. Metastasis. (1998) 16(4), 313-21), el colorrectal (Yoshimoto M et al, Int J Cancer, (1993) 54(4), 614-8; Adachi Y, Int J Cancer. (2001) 95(5), 290-4), el de ovario (Tanimoto H, Tumor Biol. (1999) 20(2), 88-98), y el pancreático (Yamamoto H et al, Journal of Clinical Oncology, (2001) 19(4), 1118-1127).

[0031] La expresión incrementada de la MMP-7 se observó también en tumores RCC de alto grado (Sumi T et al, Oncol Rep. (2003) 10(3) 567-70).

[0032] No obstante, la sobreexpresión del ARNm se determina en extractos de tejidos, por ejemplo, extractos de tejidos tumorales, y está bien documentado que la sobreexpresión del ARNm en muchos casos no está en correlación con niveles incrementados en suero de proteínas correspondientes, por ejemplo, en suero de pacientes con cáncer.

[0033] De hecho, se ha informado de que los niveles de pro-MMP-7 en los sueros de pacientes con cáncer colorrectal no presentaba ninguna diferencia significativa con respecto a los de sueros normales, aunque la pro-MMP-7 se sobreexpresaba en células de adenocarcinoma de colon (Ohuchi E et al, Clin Chim Acta. (1996) 244(2), 181-98).

[0034] Se ha informado sobre niveles incrementados en suero de MMP-7 y pro-MMP-7 en pacientes con cáncer rectal y de próstata (documentos JP10287700 y JP8217800). No obstante, los niveles en suero de pro-MMP-7 y MMP-7 se reducían en pacientes con cáncer de colon, en comparación con el suero de personas sanas (documento JP08217800).

[0035] Hasta la fecha, ninguno de los estudios antes descritos ha sugerido que los niveles de MMP-7 ó pro-MMP-7 se puedan usar como marcadores humorales para la detección precoz o la detección de RCC.

[0036] De modo similar, ninguno de los estudios sugiere que los niveles de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en fluidos corporales se puedan usar para monitorizar el RCC.

[0037] De hecho, los inventores han mostrado, por primera vez, que un número significativo de pacientes con RCC tienen niveles de inmunoreactividad incrementados de MMP-7 y/o pro-F4MMP-7 circulantes. De esta manera, la MMP-7 y/o la pro-MMP-7 se pueden usar como un parámetro predictivo positivo para la detección de RCC en la medida en la que se encuentra una probabilidad de RCC estadísticamente significa, elevada, para pacientes que tienen niveles incrementados de MMP-7 y/o pro-MMP-7.

[0038] Por lo tanto, la MMP-7 y/o la pro-MMP-7 representan marcadores valiosos para el diagnóstico de RCC de poblaciones de alto riesgo, para el seguimiento en la gestión de pacientes con RCC, para monitorizar la evolución de RCC y también para medir la eficacia del tratamiento contra el cáncer.

[0039] La presente invención proporciona un método in vitro para diagnosticar o detectar RCC en un paciente con cáncer, que comprende analizar periódicamente una muestra de fluido corporal de dicho paciente, con respecto a la MMP-7 y/o la pro-MMP-7; comparar los niveles de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en dicho fluido corporal con niveles de MMP-7 y/o la pro-MMP-7 preferentemente en el mismo tipo de fluido corporal de un control humano normal, en donde un aumento de niveles de MMP-7 y/o la pro-MMP-7 en el paciente con respecto al control humano normal se asocia al RCC.

[0040] Los inventores identificaron la MMP-7 y/o la pro-MMP-7 usando técnicas que combinan análisis proteómico y cribado serológico convencionales que permiten la identificación de componentes inmunogénicos en RCC (Unwin et al., Electrophoresis (1999) 20, 3629).

[0041] La MMP-7 y/o la pro-MMP-7 de la presente invención se han identificado primero mediante electrofóresis en gel bidimensional de extractos de proteínas de una línea celular de RCC y la posterior detección por medio de inmunotransferencia con sueros de pacientes con RCC. El punto de proteína inmunoteñida se escindió de un gel duplicado, se sometió a digestión en gel y se analizó mediante espectrometría de masas. Con el análisis diferencial de sueros de pacientes con respecto a voluntarios sanos, la proteína antes mencionada se identificó como marcador tumoral en pacientes con RCC (Flickinger C et al, J Reprod. Immunol. (1999) 43, 35-53).

[0042] La MMP-7 y/o la pro-MMP-7 se pueden usar como biomarcadores humorales en una variedad de aplicaciones diagnósticas según se ejemplifica posteriormente:

Debido a la naturaleza de la respuesta inmune, es probable que se puedan obtener autoanticuerpos por medio de una cantidad muy pequeña de proteína marcadora de tumor circulante, y consecuentemente los métodos indirectos que se basan en la detección de la respuesta inmune a marcadores tumorales pueden ser una alternativa a su determinación directa, e incluso pueden ser más sensibles que los métodos para la medición directa de marcadores tumorales en fluidos corporales. Por lo tanto, los métodos de ensayo basados en la detección de autoanticuerpos contra la MMP-7 pueden tener un valor particular en los primeros momentos del proceso de la enfermedad.

[0043] No obstante, la respuesta inmune y la presencia de autoanticuerpos dependen del paciente (Kotera et al, (1994) Cancer Res., 54, 2856-2860; Korneeva et al., (2000) Am. J. Obs. Gynecol., 183, 18-21).

[0044] La presente invención proporciona también un método para ayudar en el diagnóstico de RCC en población de alto riesgo, que comprende las etapas de determinar la cantidad de MMP-7 y/o pro-MMP-7 específicamente en muestras de fluido corporal obtenidas a partir del paciente, y comparar dicha cantidad medida con un corte definido mediante cualquier método estadístico conocido (95 % de CI de la población de control o pendiente de la curva ROC).

[0045] La presencia de una cantidad significativamente incrementada de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en el fluido corporal del paciente es una indicación de RCC.

- [0046] El método descrito también se puede llevar a cabo como método para monitorizar el curso o progresión del cáncer en un paciente al cual se le ha diagnosticado RCC primario.
- 5 [0047] En caso de nefrectomía parcial o total, el método se usa para medir la eficacia del tratamiento quirúrgico, comprendiendo la realización de pruebas periódicas mediante la determinación de la concentración de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en una muestra de un fluido biológico de un paciente con RCC, en donde las concentraciones en suero de MMP-7 y/o pro-MMP-7 que vuelven a un nivel basal son indicativas de eficacia del tratamiento.
- 10 [0048] El método también se puede usar para medir la eficacia del tratamiento de inmunoterapia para pacientes con RCC que tienen metástasis en un diagnóstico inicial, comprendiendo la realización de pruebas periódicas mediante la determinación de las concentraciones de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en una muestra de un fluido biológico de paciente con RCC, en donde niveles decrecientes de MMP-7 y/o pro-MMP-7 son indicativos de sensibilidad o éxito del tratamiento.
- 15 [0049] El método también se puede usar para detectar recidiva del tumor en un paciente con RCC después de una remisión completa, comprendiendo la medición periódica de niveles de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en fluido biológico del paciente, en donde concentraciones aumentadas de MMP-7 y/o pro-MMP-7 indican recidiva de la enfermedad.
- [0050] La MMP-7 y/o pro-MMP-7 se pueden medir solas o en combinación con otros métodos diagnósticos rutinarios.
- 20 [0051] Los ensayos combinatorios de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en suero y otros marcadores tumorales o herramientas de diagnóstico serán beneficiosos para la diagnosis, monitorizar la evaluación, y el seguimiento del RCC.
- [0052] La MMP-7 y/o pro-MMP-7 se miden usando anticuerpos o cualquier ligando específico que se une específicamente, de manera respectiva, a MMP-7 y/o pro-MMP-7 humanas.
- 25 [0053] Los ligandos específicos representan ligandos para MMP-7 humana, pro-MMP-7, variantes o productos de degradación de estas enzimas que sean específicos de la MMP-7, la pro-MMP-7 y que no presenten sustancialmente ninguna reactividad cruzada con otras MMPs.
- 30 [0054] Resulta evidente que estos ligandos no presentan ninguna reactividad cruzada con hemoglobina, α -globulina y albúmina humana.
- [0055] La presencia de MMP-7 y/o pro-MMP-7 se puede medir o detectar con sencillez relativa en muestras de fluidos corporales (por ejemplo, plasma, suero) usando técnicas de ensayo con ligandos específicos, que son conocidas de por sí. Entre los ligandos específicos se encuentran, por ejemplo, anticuerpos y aptámeros. Entre las técnicas de ensayo con ligandos específicos se encuentran sistemas de detección basados en anticuerpos normalizados, tales como inmunoensayos, por ejemplo ensayos sándwich o ensayos competitivos, y técnicas de inmunotransferencia.
- 35 [0056] La invención se refiere a un método para detectar y medir específicamente MMP-7 y/o pro-MMP-7 como marcadores de RCC, siendo dicho método una técnica de ensayo con ligandos específicos que comprende hacer entrar en contacto una muestra a someter a prueba con respecto a la presencia de dichas MMP-7 y/o pro-MMP-7, con un reactivo de ensayo ligando y detectar la presencia de complejos formados mediante la unión específica del reactivo de ensayo ligando a cualquier MMP-7 y/o pro-MMP-7 presente en la muestra.
- 40 [0057] No se requiere en la presente una descripción exhaustiva de las técnicas de inmunoensayo conocidas puesto que las mismas son conocidas por aquellos expertos en la materia. Las técnicas de inmunoensayo adecuadas típicas incluyen inmunoensayos ligados a enzimas, de tipo sándwich (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de unión competitiva, ensayos homogéneos, ensayos heterogéneos, etcétera. Varios de los métodos de inmunoensayo conocidos se estudian en *Methods in Enzymology* (1980) 70, págs. 30-70 y 166 a 198. En inmunoensayos se pueden usar etiquetas directas e indirectas.
- 45 [0058] En una realización de la invención, el método de detección de reacción inmunológica se basa en la denominada tecnología TRACE (Mathis, Clin Chem. (1993) 39(9), 1953-9).
- 50 [0059] El método de la invención comprende hacer entrar en contacto suero, de un individuo con RCC, con uno o varios ligando(s) reactivo(s) con MMP-7 y/o pro-MMP-7 humanas.
- 55 [0060] Preferentemente, los ligandos para MMP-7, pro-MMP-7 humanas, o variantes, son específicos de la MMP-7 o la pro-MMP-7 y presentan y no presentan sustancialmente ninguna reactividad cruzada con MMPs que no sean MMP-7 y pro-MMP-7.
- 60 [0061] No obstante, por lo menos un ligando debería ser específico cuando el ensayo se realiza con dos o varios ligandos que dan como resultados mediciones específicas de MMPs-7 y/o pro-MMP-7.

[0062] En una realización, los ligandos específicos son anticuerpos policlonales y/o monoclonales para MMPs-7 y/o pro-MMP-7 humanas.

[0063] Hasta la fecha, no hay información referente al metabolismo de la MMP-7 y la pro-MMP-7. Por lo tanto, igual que para muchas proteínas, se puede suponer que la MMP-7 y la pro-MMP-7 pueden existir en diferentes formas modificadas (es decir, degradación, mutaciones, modificaciones post-traduccionales).

[0064] De esta manera, la evaluación de la MMP-7 y la pro-MMP-7 está destinada a abarcar mediciones que detectan formas diferentes de la MMP-7 y la pro-MMP-7.

[0065] A continuación se describirá más detalladamente la invención en referencia a pruebas y figuras. En las figuras:

la Figura 1 es una curva normalizada para la medición de niveles MMP-7 en suero de pacientes con carcinoma de células renales (RCC) con un inmunoensayo ligado a enzimas, tal como se describe en la sección de experimentos;

la Figura 2 es una representación esquemática de los resultados de mediciones de MMP-7 en sueros de pacientes con RCC y controles sanos, con un inmunoensayo ligado a enzimas, según se describe en la sección de experimentos;

la Figura 3 es una curva ROC (Rendimiento Diagnóstico (*Receiver-Operating Characteristics*)) indicativa de la validez del diagnóstico clínico (sensibilidad con respecto a especificidad) de la determinación de niveles aumentados de MMP-7 en sueros de pacientes con RCC, con un kit Quantikine ELISA para MMP-7;

la Figura 4 es una curva normalizada para la medición de niveles de MMP-7 en suero de pacientes con carcinoma de células renales (RCC) con un inmunoensayo homogéneo, basado en la tecnología TRACE, según se describe en la sección de experimentos;

la Figura 5 es una representación esquemática de los resultados de mediciones de la MMP-7 en sueros de pacientes con RCC y controles sanos, con un inmunoensayo homogéneo basado en la tecnología TRACE, según se describe en la sección de experimentos;

la Figura 6 es una curva ROC (Rendimiento Diagnóstico) indicativa de la validez del diagnóstico clínico (sensibilidad con respecto a especificidad) de la determinación de niveles aumentados de MMP-7 en sueros de pacientes con RCC, con un inmunoensayo homogéneo basado en la tecnología TRACE;

4. Sección de experimentos y ejemplos

Materiales y métodos

Muestras de suero

[0066] Todas las muestras de suero se aislaron de muestras de sangre humana venosa tomadas a partir o bien de pacientes a los que se había diagnosticado carcinoma de células renales (n=177) o bien a partir de donantes voluntarios normales (n=116) (después de que se proporcionara un consentimiento informado de cada individuo).

Inmunoensayos

[0067] Para las determinaciones que se describen posteriormente se usaron tanto un kit de inmunoensayo disponible comercialmente, Kit Quantikine ELISA para MMP-7 Humana (DMP700) (R&D Systems Europe Ltd. Abingdon UK) y un inmunoensayo para MMP-7 homogéneo basado en la tecnología TRACE (Mathis, Clin Chem. 39(9), 1953-9 (1993)).

a) Inmunoensayo ligado a enzimas MMP-7 humanas

[0068] El ensayo utiliza la técnica de inmunoensayo cuantitativo con enzimas, de tipo sándwich. Un anticuerpo monoclonal específico para la MMP-7 se ha aplicado como pre-recubrimiento sobre una microplaca. En los pocillos se pipetea patrones y muestras, y el anticuerpo inmovilizado se une a la MMP-7. Después de eliminar por lavado las sustancias que no se han unido, se añade a los pocillos un anticuerpo policlonal ligado a enzimas, específico para la MMP-7. Tras un lavado para eliminar reactivo de anticuerpo-enzima no unido, se adiciona a los pocillos una solución de sustrato y se revela un color en proporción a la cantidad de MMP-7 total (pro y/o activa) unida en la etapa inicial. El revelado del color se detiene y se mide la intensidad del mismo a una absorbancia de 450 nm de longitud de onda mediante un lector de microplacas FLUOstar (BMG Labtechnologies, GmbH, Offenburg, Alemania).

[0069] El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo de ensayo prescrito por el fabricante R&D Systems.

[0070] b) Inmunoensayo homogéneo para MMP-7 humana basado en la tecnología TRACE (Mathis, Clin Chem. 39(9) 1953-9 (1993)).

[0071] El ensayo utiliza la tecnología TRACE (*Time Resolved Amplified Cryptate Emission*), basada en una transferencia no radiante de energía. Esta transferencia tiene lugar entre dos trazadores fluorescentes: - un donador: criptato de europio, - un aceptor: AF647.

[0072] En el ensayo, los mismos se unen, cada uno de ellos, a un anticuerpo monoclonal específico para la MMP-7 humana. Después de la excitación, el criptato emite una señal fluorescente de larga duración a 620 nm. El AF647 emite una señal a 665 nm, que tiene una duración corta excepto cuando se excita mediante una transferencia de energía desde el criptato. Esta transferencia depende de la proximidad del donador al aceptor en el complejo inmunológico, así como de la recuperación del espectro de emisión del donador y del espectro de absorción del aceptor. La señal medida durante la formación del complejo de antígeno-anticuerpo viene acompañada de una amplificación. La fluorescencia específica (RFU) que es proporcional a la concentración de antígenos se obtiene a través de una selección doble: espectral (separación en función de la longitud de onda) y temporal (medición de resolución temporal). Este ensayo es homogéneo, sin separación o lavado. Las moléculas de MMP-7 presentes en las muestras del ensayo se interponen entre dos anticuerpos monoclonales específicos para la MMP-7 humana (Cezanne SAS, Francia). La intensidad de la señal (RFU) es proporcional a la cantidad de MMP-7.

[0073] En el ensayo, dos anticuerpos monoclonales anti-MMP-7 humana se acoplaron a fluoróforo AF647 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) y criptato de europio TBP-mono-MP (Schering AG GmbH, Alemania), respectivamente. Las reacciones de acoplamiento se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos de acoplamiento prescritos por el fabricante.

[0074] Las soluciones madre de anticuerpo conjugado con AF647 y anticuerpo conjugado con criptato se diluyeron a 5 µg/ml y 0,35 µg/ml, respectivamente, antes de su uso, con tampón de ensayo (fosfato de sodio 0,1M, pH 7,1, proteasa de BSA 0,1%, KF 0,6 M, 0,2 mg/ml de IgG de ratón).

Mediciones y resultados:

[0075]

a) Curva normalizada y medición de niveles de MMP-7 en suero de pacientes con carcinoma de células renales (RCC) usando la técnica de inmunoensayo ligado a enzimas

La curva normalizada se obtuvo usando la MMP-7 humana recombinante (patrones del kit Quantikine). La MMP-7 humana recombinante se diluyó en diluyente calibrador RD6-28 (kit Quantikine) para proporcionar valores normalizados de MMP-7 de 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, y 10 ng/ml.

Se diluyeron muestras de suero con >10 ng/ml de concentración de MMP-7, con diluyente calibrador RD6-28 (kit Quantikine) para producir muestras con valores dentro del intervalo dinámico del ensayo.

En los pocillos de la placa de microtitulación se adicionaron patrones o muestras de suero (50µL) y diluyente de ensayo (100µL). Después de una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital horizontal, cada pocillo se lavó 4 veces con tampón de lavado (400 µL). En cada pocillo se adicionaron 200µL de conjugado de MMP-7, seguido por la incubación de la placa de microtitulación durante 2 horas a temperatura ambiente en el agitador. Después de 4 etapas de lavado y de la adición de solución de sustrato (200µL) a cada pocillo, la microplaca se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo con solución de parada (50µL) y se determinó la densidad óptica de cada pocillo usando un lector de microplacas FLUOstar a 450nm.

Como muestras de control se usaron sueros humanos normales (n=116). En la Figura 1 se muestra la curva normalizada.

Los pacientes con RCC presentaban niveles incrementados de MMP-7 en suero, en comparación con sujetos de control (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1

Grupos	n	Media $\pm$ SD	Sensibilidad (corte 4,78 ng/ml)	Especificidad (corte 4,78 ng/ml)
RCC	177	12,59 $\pm$ 29,13 ng/ml	79,7%	95%
Control	116	3,27 $\pm$ 0,83 ng/ml		

En la Tabla 1:
Sensibilidad = Verdadero-positivo/Verdadero-positivo + Falso-negativo;
Especificidad = Verdadero-negativo/Verdadero-negativo + Falso-positivo

b) Curva normalizada y mediciones de niveles de MMP-7 en suero, de pacientes con carcinoma de células renales (RCC), usando la tecnología TRACE.

[0076] La curva normalizada se obtuvo usando sobrenadante de cultivo celular de la línea celular Cal-54 (DSMZ, GmbH, Alemania) establecida a partir de carcinoma de riñón humano (Gioanni et al., Bull Cancer 83:553 (1996)). El sobrenadante de cultivo que contenía MMP-7 natural se diluyó en suero de ternero recién nacido (NBCS) para proporcionar valores normalizados de MMP-7 de 1, 2, 4, 6,1, 9, 9,9, 16,3 y 42,8 ng/ml. Los patrones se calibraron con respecto a MMP-7 humana recombinante altamente purificada (R&D Systems Europe Ltd. Abingdon UK). El NBCS se usó como patrón cero. Como muestras de control se usaron sueros humanos normales (n=61).

[0077] Muestras de suero con >42,5 ng/ml de concentración de MMP-7 se diluyeron con NBCS para producir muestras con valores dentro del intervalo dinámico del ensayo.

[0078] Patrones y muestras (50 μ l) se colocaron en un tubo adecuado para su uso en una automática Kryptor de BRAHMS (12-13 mm de diámetro), seguido por la adición de las soluciones de anticuerpo conjugado con AF647 (50 μ l) y de anticuerpo conjugado con criptato (50 μ l), preparadas según se ha descrito en "Materiales y métodos" (b). Después de una incubación 37°C durante 1 hora, se midió la fluorescencia específica (RFU) a través de medición de longitud de onda dual simultánea a 665 y 620 nm usando un automático Kryptor de BRAHMS (BRAHMS Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Alemania).

[0079] En la Figura 4 se muestra la curva patrón.

[0080] Los pacientes con RCC presentaban niveles aumentados de MMP-7 en suero, en comparación con sujetos de control (Tabla 2 y Figura 5).

Tabla 2

Grupos	n	Media $\pm$ SD	Sensibilidad (corte 3,37 ng/ml)	Especificidad (corte 3,37 ng/ml)
RCC	100	13,51 $\pm$ 42,32 ng/ml	79%	95%
Control	61	1,58 $\pm$ 0,97 ng/ml		

En la Tabla 2: Sensibilidad = Verdadero-positivo/Verdadero-positivo + Falso-negativo; Especificidad = Verdadero-negativo/Verdadero-negativo + Falso-positivo

b) Análisis estadístico y curva ROC

[0081] Por medio de una curva ROC (Rendimiento Diagnóstico) se presenta el diagrama de sensibilidad química con respecto a especificidad clínica.

[0082] Para los cálculos de la sensibilidad clínica y la especificidad clínica, se determinaron intervalos de confianza del 95% basándose en la distribución binomial (Besnard et Morin, In: Immunostat, Paris, Edition Nucléon, 227-251 (1997)).

[0083] Si se considera el corte del ensayo usado en los experimentos de manera que se encuentra en 4,78 ng/ml (kit Quantikine ELISA para MMP-7) y en 3,37 ng/ml (inmunoensayo para MMP-7 basado en la tecnología TRACE) definido por la distancia ortogonal máxima entre la curva ROC y la diagonal, la sensibilidad clínica de la determinación de MMP-7 en RCC es del 79% (véanse la Tabla 1 y la Tabla 2).

[0084] En la Figura 3 y la Figura 6 se muestran las curvas ROC.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para diagnosticar o monitorizar carcinoma de células renales (RCC) en un paciente humano mediante la determinación, en una muestra de un fluido corporal del paciente, de un biomarcador cuyo nivel es indicativo de la presencia de RCC, y la asociación del nivel del biomarcador medido a la presencia de RCC, en donde el biomarcador es la metaloproteinasa de matriz 7 (MMP-7) peptídica que contiene metal y/o su forma de pro-enzima (pro-MMP-7), y se determina en una muestra de un fluido corporal seleccionado de entre suero, plasma y sangre.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, que se lleva a cabo como método para monitorizar la evolución del RCC en un paciente con RCC, comprendiendo la medición de los niveles de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en intervalos de tiempo consecutivos seleccionados, en donde una variación de los niveles medidos de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en el tiempo es indicativa de la evolución del RCC.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, que se lleva a cabo como método para medir la eficacia de un tratamiento de RCC, que comprende la medición de los niveles de MMP-7 y/o pro-MMP-7 en intervalos de tiempo consecutivos seleccionados, en donde una reducción de los niveles medidos de MMP-7 y/o pro-MMP-7 entre las mediciones es indicativa de la eficacia del tratamiento.
- 20 4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se mide la MMP-7 y/o la pro-MMP-7 usando técnicas de ensayo con ligandos específicos.

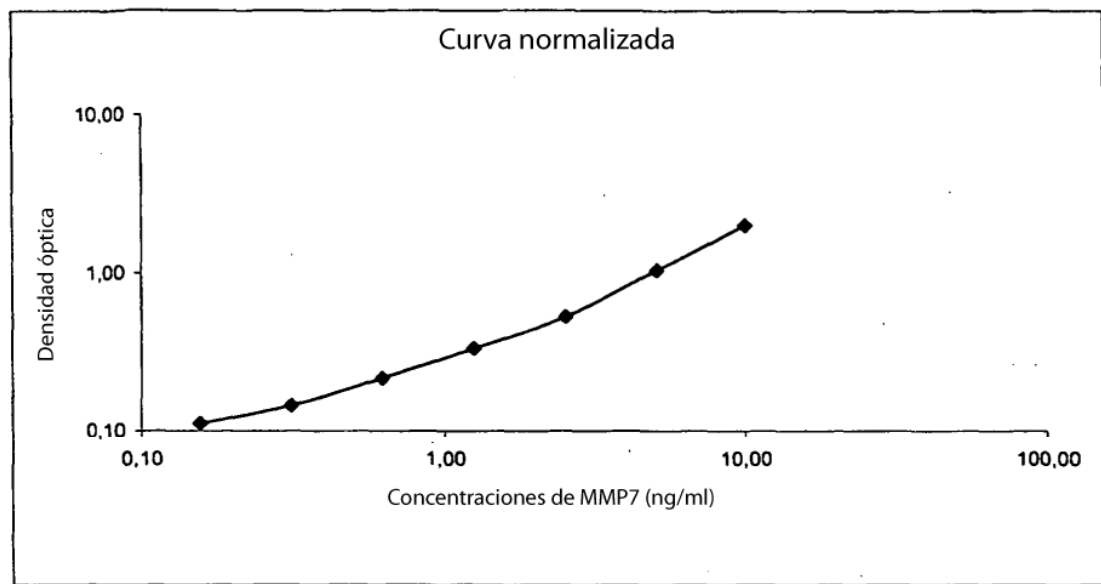


Figura 1

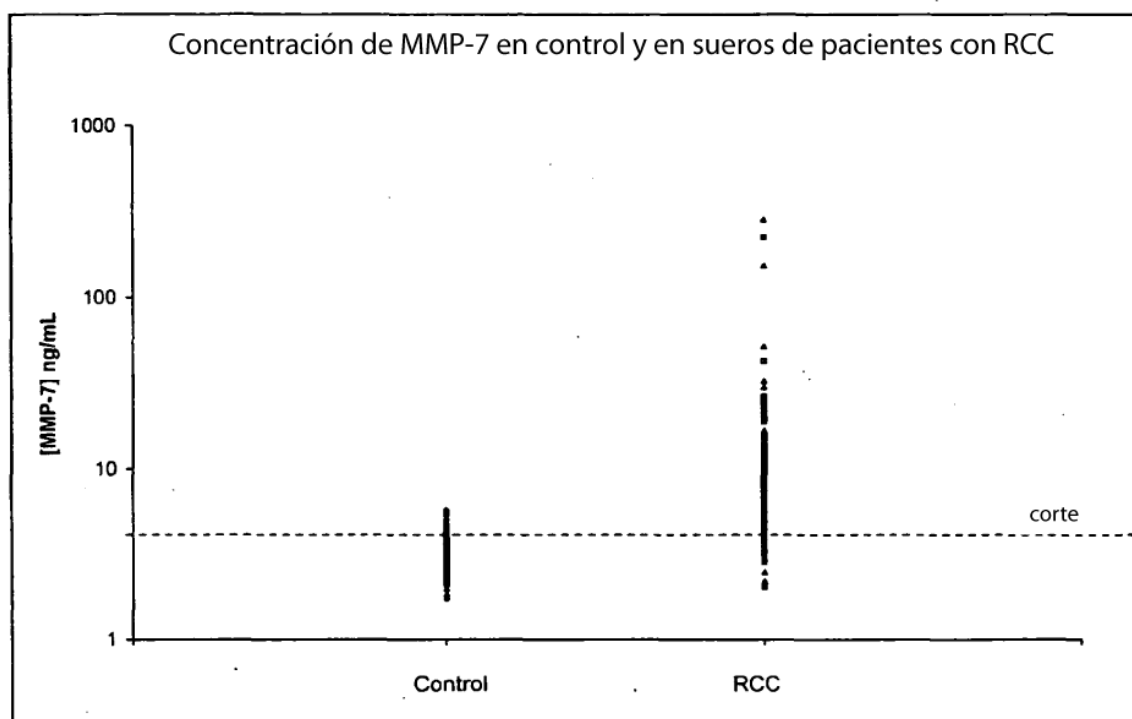


Figura 2

Curva ROC

Control/RCC		n
Control		116
RCC		177

Curva	Área	SE	p	CI del 95% de Área	Control/RCC = RCC
[MMP7] ng/ml	0,926	0,0156	<0.0001	0,895 a 0,956	tienen valores superiores

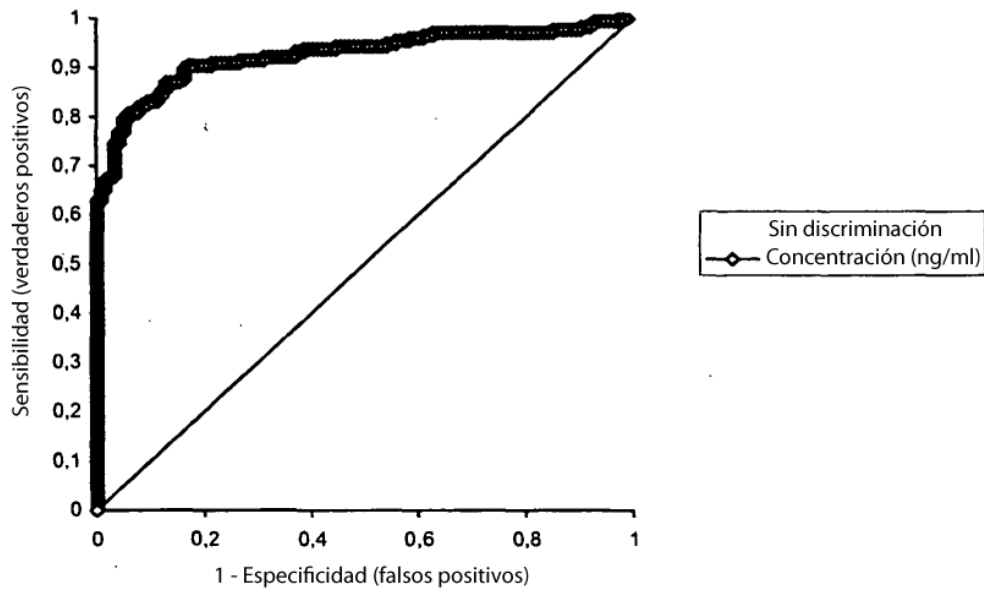


Figura 3

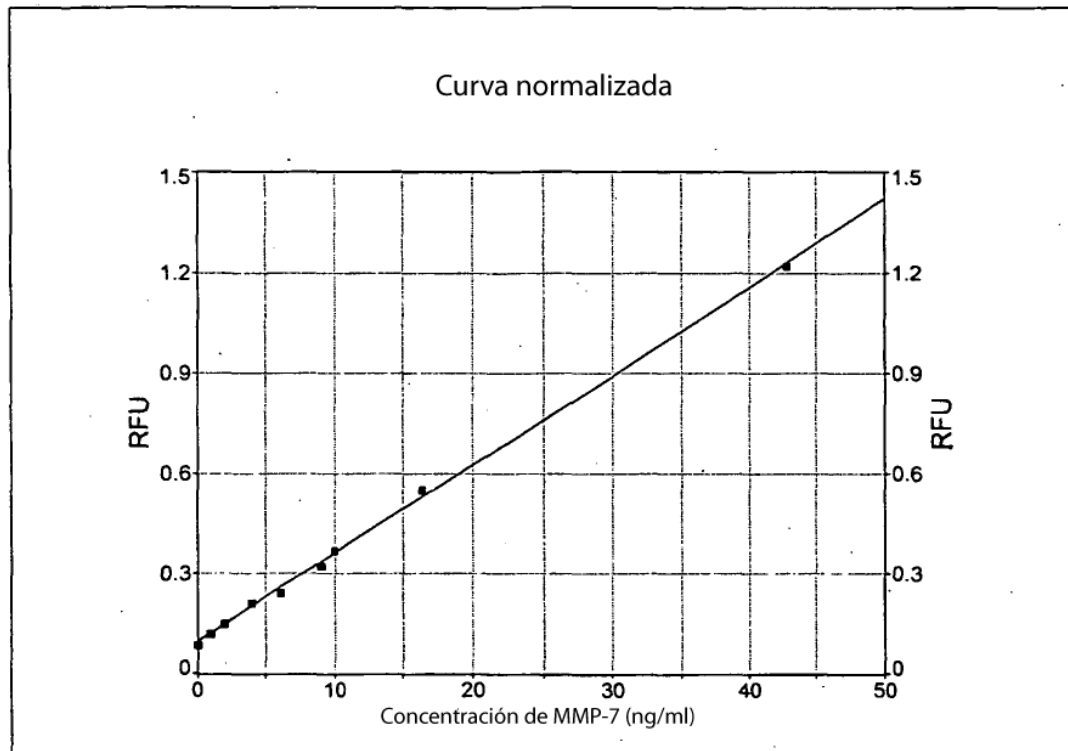


Figura 4

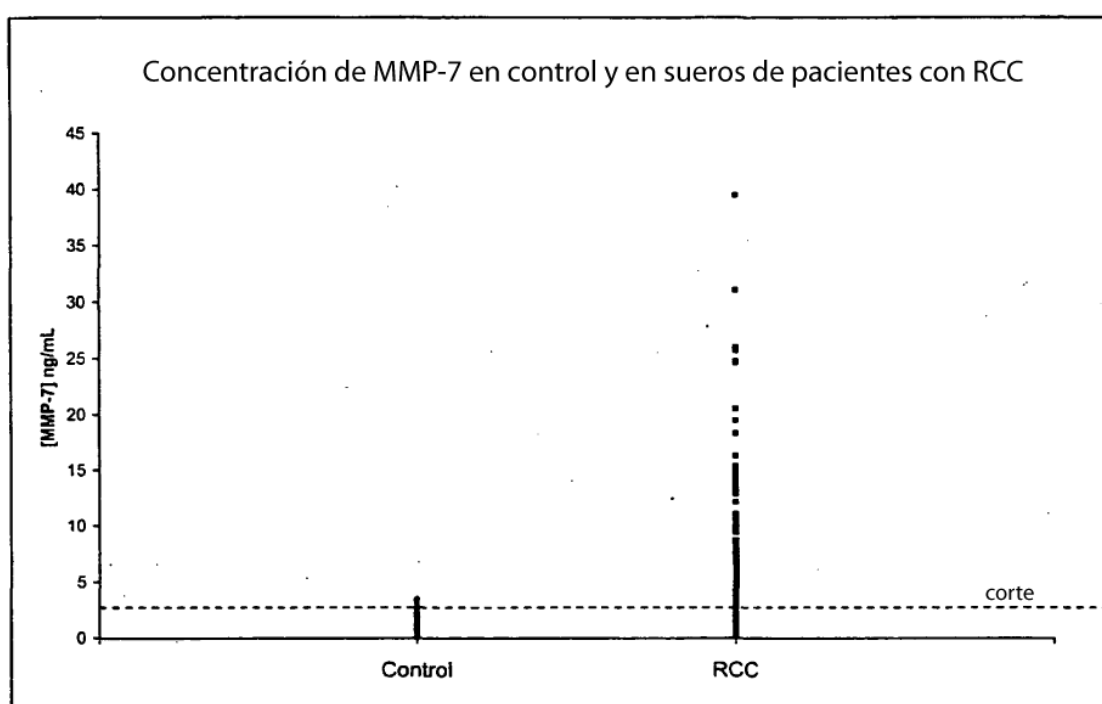


Figura 5

Curva ROC

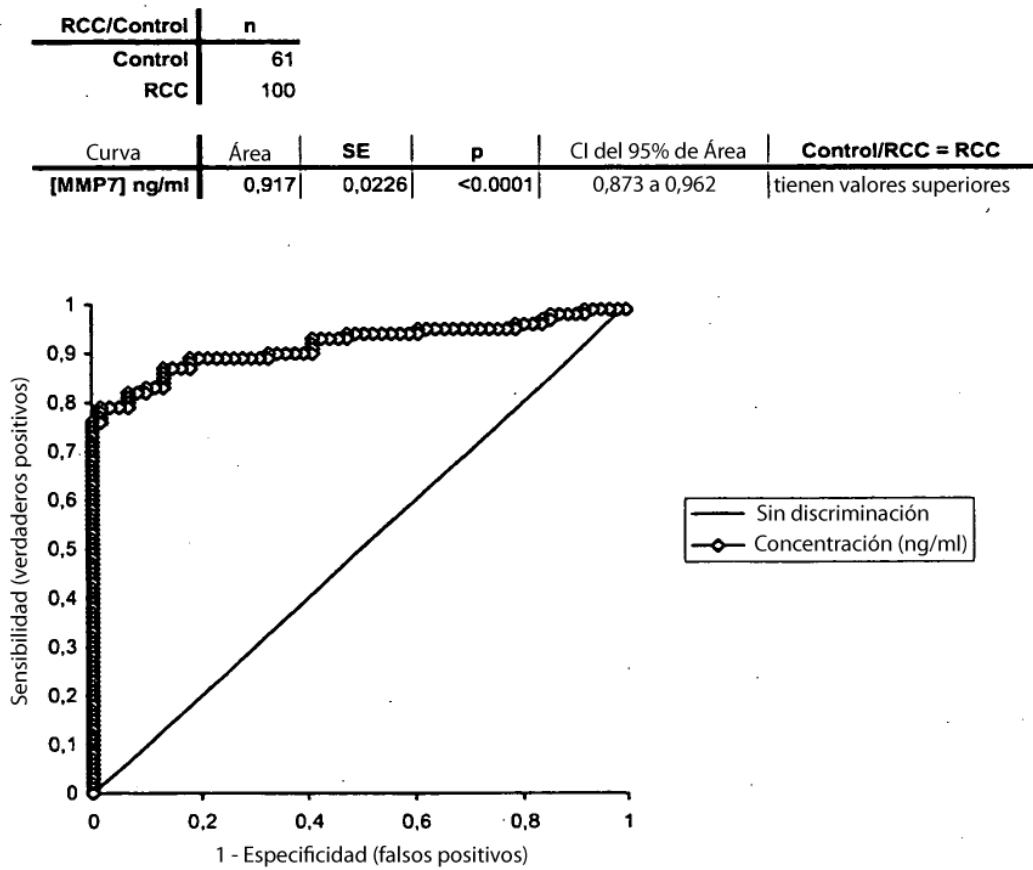


Figura 6