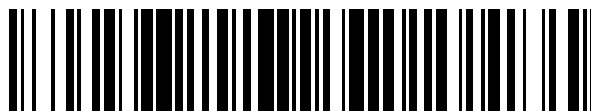


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 549**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09798419 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2307887**

54 Título: **Diagnóstico del cáncer según la concentración de anticuerpos contra Globo H y sus fragmentos**

30 Prioridad:

16.06.2008 US 61974 P

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

17.07.2014

73 Titular/es:

**ACADEMIA SINICA (100.0%)
128, Sec. 2 Academia Sinica Road Nan-Kang
Taipei 115, TW**

72 Inventor/es:

**WONG, CHI-HUEY;
WU, CHUNG-YI;
WANG, CHENG-CHI y
YU, ALICE L.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 477 549 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

Diagnóstico del cáncer según la concentración de anticuerpos contra Globo H y sus fragmentos

Antecedentes de la invención

5 El Globo H, que contiene un epítipo hexasacarídico, se expresa en diferentes cánceres, así como en las células epiteliales normales y en los tejidos glandulares. Véase Huang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15-20 (2006), Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 33: 11661-11666 (2008) y Chang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 33: 11667-11672 (2008). Se ha descrito que el suero de las pacientes con cáncer de mama contienen una gran cantidad de anticuerpos contra Globo H. Sin embargo, la concentración de estos anticuerpos no es por sí sola una indicación fiable del cáncer de mama.

10 En la solicitud de patente internacional WO 2010/005735 se describen composiciones para inducir las respuestas inmunitarias específicas contra Globo H y SSEA3.

En Van Slambrouck et al., 2007, *The Biochemical Journal*, vol. 401(3): 689-699, se describe que la aglomeración de monosialil-Gb5 se inicia después de los acontecimientos de señalización que conducen a la invasión de las células MCF-7 de cáncer de mama.

15 En Kannagi et al., *J. Biological Chemistry*, 2005, vol 258(14): 8934-8942 se inspeccionaron los glucolípidos en una línea celular cultivada de teratocarcinoma humano. Los principales glucolípidos de estas células son los glucolípidos de la globoserie Gb4.

20 En las solicitudes de patente japonesa JP 2002515060 y de patente internacional WO98/46246 se describen los glucopéptidos que incluyen glucoconjugaciones unidas por α -O y los compuestos relacionados que son útiles como terapéuticos contra el cáncer.

25 La solicitud de patente internacional WO 2006/068758 da a conocer un conjunto de moléculas de glucano para la detección del cáncer de mama en una muestra problema de paciente que comprende un soporte sólido y una colección de moléculas de glucano, en donde al menos una de las moléculas de glucano se fija a los anticuerpos que previamente se había identificado que estaban asociados a la neoplasia en las pacientes con tumores de mama benignos, premalignos o malignos.

Utilizando una micromatriz de glucanos, Wang et al. demostraron que la cantidad de anticuerpos contra Globo H de las pacientes con cáncer de mama era significativamente más elevada que en los donantes con sangre normal (Wang et al., *PNAS*, 2008, vol. 105 (33): 11661-11666).

Compendio de la invención

30 La presente invención se basa en un descubrimiento inesperado de que la proporción de la cantidad de anticuerpos contra Globo H, sus fragmentos Bb2 o Bb3, entre la cantidad de anticuerpos contra Gb5, otro fragmento de Globo H, es significativamente más alta en los pacientes con cánceres que son tanto positivos para Globo H como positivos para Gb5 que en los humanos sin cáncer.

35 Por consiguiente, esa invención da a conocer un procedimiento diagnóstico del cáncer, que incluye (i) el suministro una muestra (p. ej., una muestra de suero) que contiene anticuerpos de un sujeto (p. ej., un humano) que se sospecha que tiene un cáncer (p. ej., cáncer de mama, melanoma, neuroblastoma, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas), (ii) la incubación de la muestra con Gb5 y uno o varios de Globo H, Bb2 y Bb3 para permitir que estas moléculas se fijen a los anticuerpos en la muestra, (iii) la medición de la cantidad de anticuerpos fijados a Gb5 y la
40 cantidad de anticuerpos fijados a Globo H, a Bb2, a Bb3 o a Bb4, y (iv) la determinación de si el sujeto tiene el cáncer basándose en la proporción de la cantidad de anticuerpos que se fijan a Globo H, a Bb2 o a Bb3 por la cantidad de anticuerpos fijados a Gb5. Una proporción alta indica que el sujeto tiene el cáncer. Globo H, Gb5, Bb2 y Bb3 se pueden inmovilizar sobre un dispositivo de soporte para formar una matriz de glucanos. En un ejemplo, la matriz contiene Gb5 y uno de Globo H, Bb2 y Bb3. En otro ejemplo, contiene todas estas moléculas.

45 Se puede contemplar el uso de Gb5 y de uno o varios de Globo H, Bb2 y Bb3, aunque no de acuerdo con la presente invención como se reivindica, para la fabricación de un producto sanitario a utilizar en el diagnóstico del cáncer.

50 Los detalles de uno o varios ejemplos de la invención se presentan en la descripción que viene a continuación. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los dibujos que vienen a continuación y de la descripción detallada de varios ejemplos y también de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Los dibujos se describen primero.

La figura 1 es un diagrama que describe las estructuras del epítipo hexasacárido de Globo H (GH) y los fragmentos de este epítipo. Panel A: la estructura del epítipo hexasacárido. Panel B: la estructura de los epítipos hexasacáridos y sus siete fragmentos.

La figura 2 es un diagrama que muestra el uso de la matriz de glucanos, que imita la superficie de la célula cancerosa, para detectar los anticuerpos contra los glucanos.

Descripción detallada de la invención

Hemos descubierto que la proporción de la cantidad de anticuerpos anti-Globo H/anti-Gb5, anti-Bb2/anti-Gb5 o anti-Bb3/anti-Gb5 es significativamente más alta en los pacientes con cánceres que son positivos para Globo-H y para Gb5 que en los individuos sin cáncer. Así pues, cualquiera de estas proporciones sirve como indicación fiable del diagnóstico del cáncer.

Por consiguiente, en la presente memoria se describe un procedimiento para diagnosticar el cáncer mediante la detección de la cantidad de anticuerpos contra Gb5 y uno o más de Globo H, Bb2, Bb3 en un sujeto que se sospecha que tiene cáncer, p. ej., un humano que es genéticamente susceptible al cáncer, y determinar si el sujeto tiene cáncer basándose en el valor de cualquiera de las proporciones mencionadas anteriormente. Los anticuerpos mencionados anteriormente pueden ser IgG, IgM, IgE, IgA o IgD, o una mezcla de los mismos.

Globo H es un glucano que contiene el epítipo hexasacárido mostrado en la figura 1, panel A, y, opcionalmente, un resto que no es glucídico. Su fragmento (p. ej., Gb5, Bb2, Bb3 y Bb4) es un glucano que contiene un fragmento del epítipo hexasacárido y, si es aplicable, del resto que no es glucídico. En la figura 1, panel B, se muestran siete fragmentos del epítipo hexasacárido. Estos oligosacáridos se pueden preparar mediante procedimientos convencionales. Véase, p. ej., Huang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15-20 (2006). Preferiblemente, se conjugan con un conector que no es glucídico, tal como una alquilamina, p. ej., $(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$ o una alquilazida, p. ej., $(\text{CH}_2)_3\text{N}_3$, que se puede unir covalentemente a un dispositivo de soporte (p. ej., un sustrato de polímero) hecho de diferentes materiales, tales como vidrio, plástico, nilón, metal o sílice. Cada uno de Globo H, Gb5, Bb2, Bb3 y Bb4 se pueden depositar en una posición definida sobre el dispositivo de soporte para formar una matriz de glucanos. Esta matriz, que imita la superficie de una célula cancerosa que expresa los epítipos de oligosacáridos contenidos en Globo H, Gb5, Bb2, Bb3 y Bb4 (véase la figura 2), se puede utilizar para detectar la cantidad de anticuerpos que se fijan a los epítipos oligosacáridos.

Para realizar el procedimiento de esta invención, la matriz de glucanos descrita en la presente memoria se incuba con una muestra que contiene el anticuerpo de un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer. Ejemplos de la muestra incluyen, pero sin limitarse a ellos, suero, saliva y líquido de los ganglios linfáticos. La matriz se lava para retirar los anticuerpos sin fijar y, a continuación, se incuba con un anticuerpo secundario marcado que se fija específicamente a los anticuerpos de interés, que pueden ser IgG, IgA, IgD, IgE o IgM de humano. La matriz de glucanos se lava de nuevo para retirar las moléculas del anticuerpo secundario sin fijar y la intensidad de las señales que se liberan desde las moléculas de anticuerpo secundario fijado corresponden a la cantidad de anticuerpos diana. Cuando en un sujeto se observa una proporción de concentraciones más alta de anti-Globo H/anti-Gb5, anti-Bb2/anti-Gb5, anti-Bb3/anti-Gb5 o anti-Bb4/anti-Gb5, el diagnóstico del sujeto es que tiene el cáncer o corre el riesgo de padecer el cáncer.

Sin más elaboración, se cree que el experto en la técnica puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente invención en su alcance más completo. Por lo tanto, las realizaciones específicas siguientes se deben considerar como simplemente ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción de ningún modo. Todas las publicaciones citadas en la presente memoria se incorporan por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1: fijación de los anticuerpos Vk9, Mbr1 y A488 a una matriz de glucanos

Los oligosacáridos Globo H, Gb5, Gb4, Gb3, Gb2, Bb4, Bb3, Bb2 mostrados en la figura 1 se prepararon de acuerdo con el protocolo programable en un único recipiente descrito en Hung et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15-20 (2006). Estos oligosacáridos se unieron covalentemente a un portaobjetos de vidrio revestido con NHS, que se compró a Nexterion H Slide (SCHOTT North America), mediante la tecnología de impresión robótica de micromatrices estándar descrita en Hung et al. y Blixt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 17033-17038 (2004). Más específicamente, se colocó una alícuota de una solución madre (80 μM) de cada oligosacárido sobre el portaobjetos de vidrio con un formato de 16 columnas, dos columnas por cada oligosacárido.

Se utilizaron los siguientes tres anticuerpos en este estudio:

- Mbr1, un anticuerpo monoclonal IgM de ratón contra Globo H,
- VK-9, un anticuerpo monoclonal IgG de ratón contra Globo H, y
- A488, anticuerpo monoclonal contra Gb5 de ratón o humano.

5 Cada uno de los anticuerpos se incubó el portaobjetos de vidrio (al cual estaban fijados los oligosacáridos) descrito anteriormente en tampón PBS con Tween 20 al 0,05 % (pH 7,4) en una cámara de humidificación con agitación durante 1 h. A continuación se lavó el portaobjetos, por turnos, tres veces con tampón PBS con Tween 20 al 0,05 % (pH 7,4), tres veces con tampón PBS (pH 7,4) y tres veces con agua. El portaobjetos se incubó después con el anticuerpo de cabra conjugado a Cy3 anti-IgM (para Mbr1) o anti-IgG (para VK-9 y A488) de ratón en la misma cámara con agitación durante 1 h. De nuevo se lavó el portaobjetos tres veces con el tampón PBS con Tween 20 al 10 0,05 % (pH 7,4), tres veces con el tampón PBS (pH 7,4) y tres veces con H₂O, y se secó. Finalmente, el portaobjetos se escaneó a 595 nm (para el anticuerpo secundario conjugado con Cy3) y a 488 nm (para el anticuerpo A488 contra el antígeno anti-SSEA-3) en un lector de fluorescencia de micromatrices (lector de micromatrices ArrayWorx).

15 Los tres anticuerpos fijados a la matriz de glucanos se describieron más arriba. El VK9 se fijó específicamente a Globo H y Bb4; el Mbr1 se fijó específicamente a Globo H y Bb4, y también se fijó a Bb3 con menos afinidad; y el A488 se fijó específicamente a Gb5. Estos resultados indican que la matriz de glucanos es capaz de capturar los anticuerpos que se fijan a Globo H y/o a sus fragmentos.

Ejemplo 2: uso de una matriz de glucanos para detectar anticuerpos contra Globo H y sus fragmentos en las pacientes con cáncer de mama.

20 Las muestras de plasma de pacientes con cáncer de mama y de individuos sanos se diluyeron 1:20 con el tampón PBS con Tween 20 al 0,05 % y SAB al 3 % (pH 7,4) y se incubaron con el portaobjetos que lleva la matriz de glucanos descrita en el ejemplo 1 anterior en una cámara de humidificación con agitación durante 1 h. Tras lavarla con el tampón PBS con Tween 20 al 0,05 % (pH 7,4), tampón PBS (pH 7,4) y agua, cada uno tres veces, el portaobjetos se incubó con el anticuerpo de cabra conjugado a Cy3 contra la IgM o la IgG de humano en la cámara de humidificación con agitación durante 1 h. A continuación, el portaobjetos se lavó tres veces con el tampón PBS 25 con Tween 20 al 0,05 % (pH 7,4), tres veces con el tampón PBS (pH 7,4) y tres veces con H₂O. Después de secarlo, el portaobjetos se escaneó a 595 nm (para el anticuerpo secundario conjugado a Cy3) en un lector de fluorescencia de micromatrices (lector de micromatrices ArrayWorx).

30 Tal y como se muestra en las tablas 1 y 2 que vienen a continuación, la proporción de las cantidades de IgG fijado a Globo H/IgG fijado a Gb5 (GH/Gb5 IgG) y de IgM fijado a Globo H/IgM fijado a Gb5 (GH/Gb5 IgM) eran mucho más altas en las muestras de plasma de las pacientes con cáncer de mama que en las muestras de plasma de los individuos sanos. Tal y como también se muestra en las dos tablas, la proporción de Bb2/Gb5 IgG, Bb4/Gb5 IgM, Bb3/Gb5 IgM y Bb2/Gb5 IgM de los pacientes con cáncer era significativamente más alta que la de los individuos sanos. Estos datos indican que las proporciones enumeradas más arriba son marcadores fiables para diagnosticar el cáncer.

35 Tabla 1. Proporciones de la cantidad de IgG contra Globo H y sus fragmentos Bb2, Bb3 y Bb4, por Gb5, en las pacientes con cáncer de mama (n = 58) y en los individuos sanos (n = 47).

% de proporción de IgG	GH/Gb5		Bb4/Gb5		Bb3/Gb5		Bb2/Gb5	
	Sanos	Con cáncer	Sanos	Con cáncer	Sanos	Con cáncer	Sanos	Con cáncer
Media	26,92	58,31	11,91	17,84	15,22	22,54	78,02	120,8
DE	18,49	31,14	20,54	19,6	23,12	23,22	63,63	92,26
P	p < 0,0001***		p < 0,1360		p < 0,1106		p < 0,0063 **	

***: p < 0,001, extremadamente significativo;

** : p = 0,001-0,01, muy significativo.

40 Tabla 2. Proporciones de la cantidad de IgM contra Globo H y sus fragmentos Bb2, Bb3 y Bb4, por Gb5, en las pacientes con cáncer de mama (n = 57) y en los individuos sanos (n = 47).

% de proporción de IgM	GH/Gb5		Bb4/Gb5		Bb3/Gb5		Bb2/Gb5	
	Sanos	Con cáncer	Sanos	Con cáncer	Sanos	Con cáncer	Sanos	Con cáncer
Media	27,82	53,98	15,73	22,74	15,36	40,51	16,19	30,36
DE	23,42	35,41	21,60	23,98	23,30	59,76	18,83	35,44
P	p < 0,0001***		p < 0,1259*		p < 0,0043**		p < 0,0105*	

***: p < 0,001, extremadamente significativo;

** : p = 0,001-0,01, muy significativo

* : p = 0,01-0,05, significativo

5 Ejemplo 3: uso de la matriz de glucanos para seguir la respuesta inmunitaria inducida por la vacuna de Globo H

Se inmunizaron ratonas (ratonas BALB/c hembras de 6 semanas de edad, BioLASCO, Taiwán) por vía subcutánea con la vacuna de Globo H-KLH (Optimer Pharmaceuticals, Inc., San Diego, Ca.) una vez a la semana durante tres semanas. A las ratonas de control se les inyectó la solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se recogieron muestras de suero de las ratonas tratadas 10 días después de la última inmunización. Estas muestras se sometieron a diluciones seriadas a 30, 120, 240, 480, 960 y 1920 veces, y las titulaciones de los anticuerpos contra Globo H se examinaron en las muestras de suero diluidas mediante el portaobjetos con la matriz de glucanos descrita en el ejemplo 1 de más arriba ($3,5 \times 10^{-14}$ mol de oligosacáridos por punto) o mediante ELISA convencional (revestido con $1,28 \times 10^{-10}$ mol de Globo H por pocillo).

La vacuna Globo H-KLH indujo la secreción de los anticuerpos contra Globo H en las ratonas inmunizadas. Véase la tabla 3 que viene a continuación. También se ha encontrado que el ensayo con la matriz de glucanos descrito más arriba es mucho más sensible que el ELISA convencional.

Tabla 3. Respuesta inmunitaria inducida por la vacuna de Globo H determinada por el análisis con las matrices de glucano y por ELISA.

Veces de dilución	Incremento de la respuesta inmunitaria*	
	Análisis con la matrices de glucanos	ELISA
30	374,7 ± 87,83	4,01 ± 1,58
120	188,4 ± 78,93	1,92 ± 0,75
240	102,2 ± 44,21	1,08 ± 0,48
480	44,86 ± 17,05	0,20 ± 0,10
960	12,13 ± 4,08	0,30 ± 0,14
1920	3,203 ± 1,048	ND

*Calculado del siguiente modo: (intensidad de la señal posinmunitaria – intensidad de la señal preinmunitaria) / intensidad de señal de fondo

Otras realizaciones

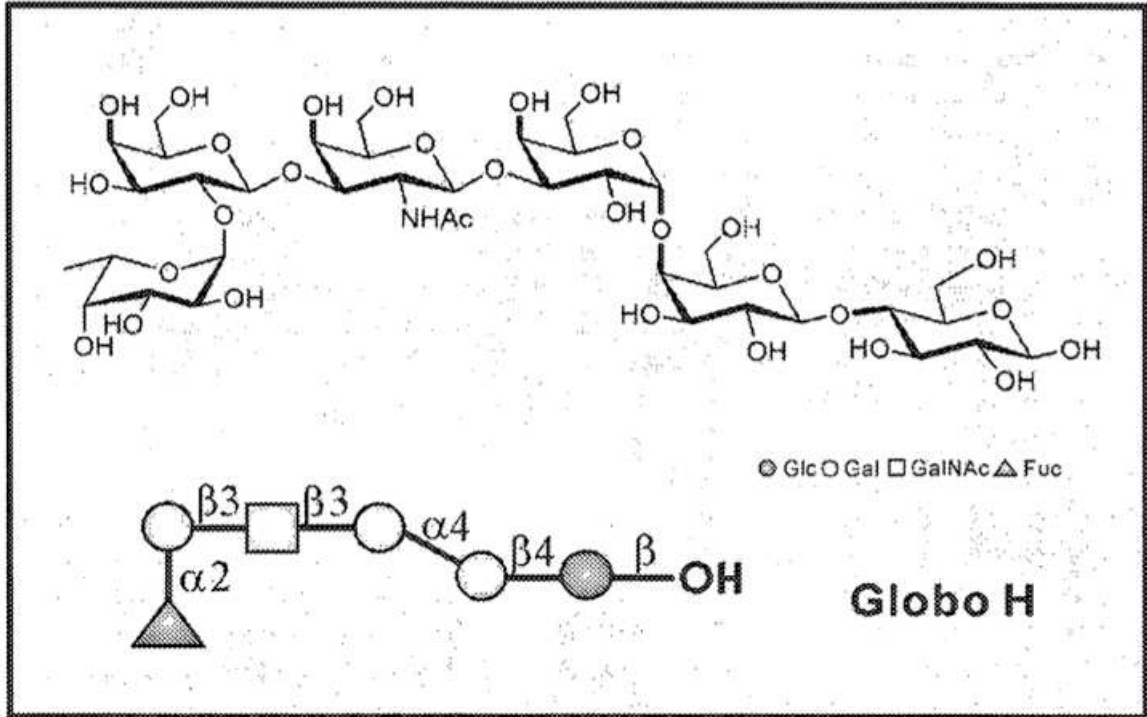
Todas las peculiaridades descritas en esta especificación se pueden combinar en cualquier combinación. Cada peculiaridad descrita en esta especificación se puede reemplazar por una peculiaridades alternativa que sirva para el mismo propósito, o uno equivalente o similar. Así pues, a menos que se mencione expresamente de otra manera, cada peculiaridad descrita es sólo un ejemplo de una serie genérica de peculiaridades equivalentes o similares.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento diagnóstico de cáncer para los cánceres que son positivos para Globo H y positivos para Gb5, que comprende
5 el suministro de una muestra que contiene anticuerpos de un sujeto del cual se sospecha que tiene cáncer, en donde dicha muestra es suero, saliva o líquido de ganglio linfático,
la incubación de la muestra con Gb5 y uno o varios de Globo H, Bb2 y Bb3 para permitir que los anticuerpos de la muestra se fijen a Gb5 y a uno o varios de Globo H, Bb2 y Bb3,
la medición de la cantidad de anticuerpos fijados a Gb5 y la cantidad de anticuerpos fijados a Globo H, a Bb2 o a Bb3, y
10 la determinación de si el sujeto tiene el cáncer basándose en la cantidad de los anticuerpos fijados,
en donde una proporción significativamente más alta de la cantidad de anticuerpos fijados a Globo H, Bb2 o Bb3 por la cantidad de anticuerpos fijados a Gb5, en comparación con la del sujeto sin cáncer, indica que el sujeto tiene un cáncer que es positivo para Globo H y positivo para Gb5.
2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la muestra es una muestra de suero.
- 15 3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el Gb5 y uno o varios de Globo H, Bb2 y Bb3 están inmovilizados sobre un dispositivo de soporte.
4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de piel, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de estómago y cáncer de páncreas.
- 20 5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama.
6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el Gb5 y uno o varios de Globo H, Bb2 y Bb3 están inmovilizados sobre un dispositivo de soporte.
7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en donde la etapa de incubación se realiza mezclando la muestra con Gb5 y Globo H.
- 25 8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el Gb5 y el Globo H están inmovilizados sobre un dispositivo de soporte.
9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en donde la etapa de incubación se realiza mezclando la muestra con Gb5 y Bb2.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el Gb5 y el Bb2 están inmovilizados sobre un
30 dispositivo de soporte.
11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en donde la etapa de incubación se realiza mezclando la muestra con Gb5 y Bb3.
12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el Gb5 y el Bb3 están inmovilizados sobre un dispositivo de soporte.
- 35 13. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 5, en donde la etapa de incubación se realiza mezclando la muestra con Gb5, Globo H, Bb2 y Bb3.
14. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en donde Gb5, Globo H, Bb2 y Bb3 están inmovilizados sobre un dispositivo de soporte.
15. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la muestra es una muestra de suero.

Fig. 1

A.



B.

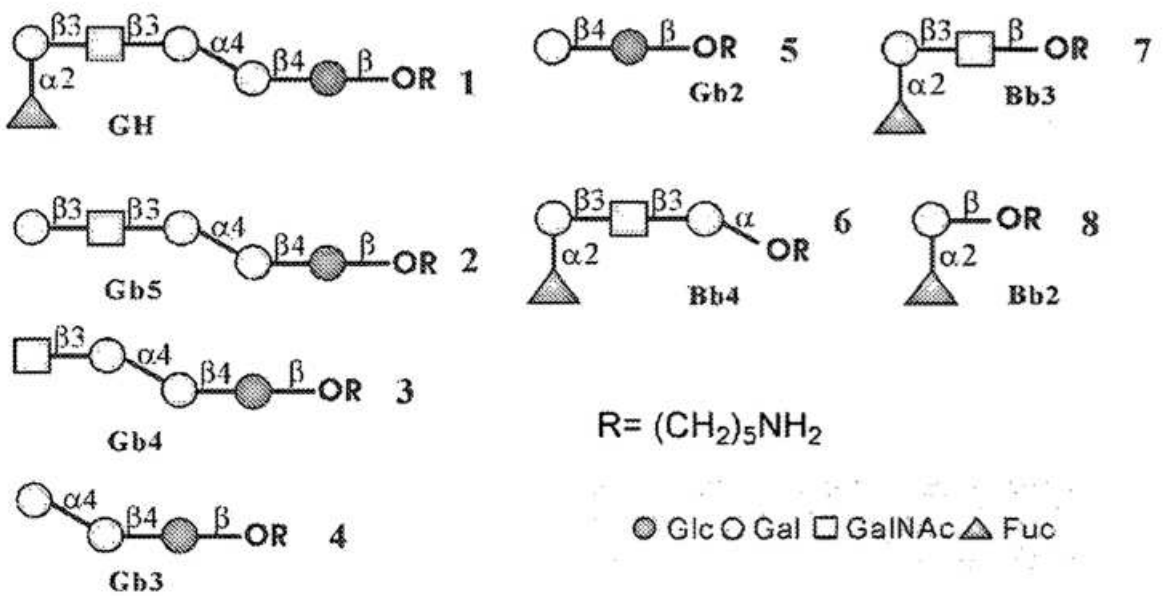


Fig. 2

