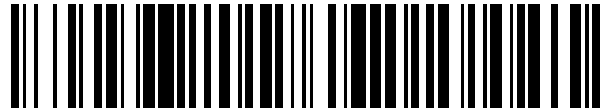


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 649**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2008 E 08860118 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2223116**

54 Título: **Panel de marcadores para el cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

10.12.2007 EP 07023897
29.09.2008 EP 08017119

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.01.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

KARL, JOHANN;
ANDRÉS, HERBERT;
GARCZAREK, URSULA;
ROLLINGER, WOLFGANG y
WILD, NORBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 527 649 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

Panel de marcadores para el cáncer colorrectal

5 Descripción detallada de la invención

La presente invención, se refiere a un procedimiento para la evaluación del cáncer colorrectal (CRC – [del inglés, colorectal cancer] -), in vitro, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración y / o la actividad de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, y de anti-p53 y / u osteopontina y / o Ferritina y, de una
 10 opcional, uno o más marcadores de CRC distintos, adicionales, y la utilización de resultado combinado de la mediciones, en la valoración del CRC. De una forma adicional, éste se refiere, de una forma especial, a un procedimiento para valorar el CRC, a partir de una muestra líquida, derivada de un individuo, procediendo a medir la seprasa y por lo menos un marcador, seleccionado de entre el grupo consistente en anti-p53, la Ferritina y la osteopontina, en la citada muestra. El procedimiento en concordancia con la presente invención, puede utilizarse,
 15 por ejemplo, en la detección temprana del cáncer, procediendo a una exploración de rastreo, en individuos asintomáticos, o bien en la vigilancia de los pacientes los cuales experimentan una cirugía.

El cáncer, continúa siendo a un reto de la salud pública, a pesar del progreso experimentado en los procesos de detección y de la terapia. Las células cancerosas, se caracterizan por la producción de proteínas marcadoras asociadas con el cáncer. Las proteínas asociadas con el cáncer, se encuentran en ambos, los tejidos, y los fluidos corporales de un individuo el cual porta células cancerosas. Estos niveles, de una forma usual, son bajos, en las etapas tempranas del progreso carcinogénico y éstos se incrementan durante la progresión de la enfermedad, y únicamente en raros casos, se observan proteínas las cuales muestren un nivel disminuido, en el curso de la progresión de la enfermedad. La detección sensitiva de estas proteínas, representa una propuesta de método para
 20 abordar el problema, el cual es ventajoso y prometedor, para la diagnosis de cáncer, de una forma particular, en la diagnosis del cáncer en etapas tempranas. Los tipos de cáncer más prevalentes, son el cáncer de mama (BC – [del inglés, breast cancer] -), el cáncer de pulmón (LC – [del inglés, lung cancer] -), y el cáncer colorrectal (CRC - [del inglés, colorectal cancer] -).

30 Las propuestas de métodos terapéuticos más importantes para los tumores sólidos, son los siguientes:

- a) la resección quirúrgica del tumor,
- b) la quimioterapia,
- c) el tratamiento con productos biológicos, tales como los consistentes en los anticuerpos antitumorales, o los anticuerpos antiangiogénicos, y
- d) una combinación de estos métodos.

La resección quirúrgica de los tumores, se encuentra ampliamente aceptada, como un primer tratamiento de línea, para los tumores sólidos, en una etapa temprana. La mayoría de los cánceres, no obstante, se detectan únicamente cuando éstos se convierten en sintomáticos, es decir, cuando los pacientes, se encuentran en una etapa más bien tardía de la progresión de la enfermedad.

El cáncer colorrectal, progresa, de una forma frecuente, desde los adenomas (pólipos), a los carcinomas malignos.

45 La clasificación por etapas del cáncer, es la clasificación de la enfermedad, en términos de extensión, de progresión, y de gravedad.

Las diferentes etapas del CRC utilizadas para clasificarlos, se realiza en concordancia con las etapas A a D de Duke. Hoy en día, el sistema TNM, es del más ampliamente utilizado, en la clasificación de la extensión anatómica del cáncer. Éste representa un sistema de clasificación uniforme, por etapas, internacionalmente aceptado. Existen tres variables básicas: T (al extensión del tumor primario), N (el estado de los nódulos linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis distante). Los criterios del sistema TNM, se publican por parte de La UICC (Unión internacional contra el cáncer -(UICC, del inglés International Union Against Cancer] -), véase a dicho efecto, Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds): TNM Classification of Malignant Tumours, sixth edition, 2002 -, Clasificación de los tumores malignos, sexta edición, 2002 -). Una vez se ha procedido a determinar el estatus de la clasificación, según el sistema TNM los pacientes, se agrupan en estados de la enfermedad, los cuales vienen designados mediante números romanos, los cuales se encuentran comprendidos dentro de unos márgenes que van desde I a IV, siendo, el número IV, el correspondiente a la etapa más avanzadas. La clasificación por etapas según el sistema TNM, y los estados de la enfermedad según la UICC, se corresponden los unas con los otros, tal y como se muestra en la siguiente tabla, tomada de Sobin L.H. y Wittekind (eds.), citados anteriormente, arriba.

Interrelación de la clasificación por etapas, según el sistema TNM, y los estados de la enfermedad, según la UICC

Etapa de la enfermedad según clasificación de la UICC	Etapa de la enf. según variable T	Etapa de la enf. según variable N	Etapa de la enf. según variable M
---	-----------------------------------	-----------------------------------	-----------------------------------

Etapa 0	Tis	N0	M0
Etapa I	T1, T2	N0	M0
Etapa IIA	T3	N0	M0
Etapa IIB	T4	N0	M0
Etapa IIIA	T1, T2	N1	M0
Etapa IIIB	T3, T4	N1	M0
Etapa IIIC	Cualquier T	N2	M0
Etapa IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Lo que es especialmente importante, es el hecho consistente en que, la diagnosis temprana del CRC, se traduce en una prognosis mucho mejor del CRC. Los tumores malignos del tramo colorrectal del intestino, surgen de los tumores benignos, es decir, de los adenomas. Así, por lo tanto, la mejor prognosis, la tienen aquéllos pacientes diagnosticados en el estado de adenoma. Los pacientes diagnosticados en etapas tan tempranas como las correspondientes a la etapa T_{is}, NO, MO ó T1-3; NO, MO, si se tratan de una forma apropiada, tienen una probabilidad de supervivencia, a los cinco años, de un porcentaje del 90 %, después de la diagnosis, comparado con tasa de supervivencia a los 5 años, de únicamente un porcentaje del 10 %, para los pacientes diagnosticados cuando la metástasis distante ya se encuentra presente.

Los procedimientos corrientes de detección, incluyendo a los procedimientos por imágenes, tales como los consistentes en los rayos x, ó la resonancia magnética por imágenes, en teoría, pueden ser por lo menos parcialmente apropiados, para su uso como una herramienta general de exploración de rastreo. No obstante, éstos son muy costosos, y no siempre disponibles, para los sistemas de la les económicamente asequibles, para los sistemas de asistencia médica, en cuento a lo referente a un uso general y extensivo, en la exploración de rastreo de masas, de un amplio número de sujetos, de una forma particular, para sujetos exentos de síntomas tumorales.

Así, de este modo, es un objeto de la presente invención, el proporcionar un procedimiento para la evaluación de tumores, el cual sea sencillo y eficiente en cuanto a lo referente a su coste, para, por ejemplo, identificar individuos sospechosos de tener un cáncer colorrectal. Para este propósito, sería deseable el poder disponer de un marcador tumoral, o de un panel de tales tipos de marcadores, los cuales sean susceptible de poderse detectar en los fluidos corporales, tales como por ejemplo el suero o el plasma.

A pesar de la extensa y siempre creciente lista de marcadores de proteínas candidatos, en el sector del CRC, hasta la fecha, no se conoce o no se ha establecido la utilidad clínica / de diagnóstico de estas moléculas. Parece ser que, en la actualidad, no se encuentra disponible ningún procedimiento basado en un fluido corporal, como muestra, el cual sea apropiado para la exploración de rastreo para el CRC.

Se encuentran disponibles tests de ensayo de diagnóstico en sangre, basados en la detección del antígeno carcinoembrionario (CEA – [del inglés carcinoembrionic antigen]-), una glicoproteína asociada a tumores. El CEA, se encuentra incrementado, en un porcentaje del 95 % de las muestras de tejido obtenidas de pacientes con cánceres colorrectales, gástricos, y de páncreas, y la mayoría de los carcinomas de mama, de pulmón, y de la cabeza y del cuello (véase, a dicho efecto, Goldenberg, D.M. et al., J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11 - 22). Se han reportado así mismo, también, unos elevados niveles de CEA, en pacientes con enfermedades no malignas y, muchos pacientes con cáncer colorrectal, tienen unos niveles normales de CEA en el suero, especialmente, durante la etapa temprana de esta enfermedad (véase, a dicho efecto, Carriquiry, L.A. y Pineyro, A., Dis. Colon Rectum 42 (1999) 921 - 929; Herrera, M.A. et al., Ann. Surg. 183 (1976) 5 - 9; Wanebo, H.J. et al., N. Engl. J. Med. 299 (1978) 448 - 451). La utilidad del CEA, según éste se mide, a parir del suero o del plasma, en la detección de recidivas, se ha reportado como siendo polémica o controvertida, y éste todavía debe aplicarse (es decir todavía no se aplica) de una forma extensa (véase, a dicho efecto Martell, R.E. et al., Int. J. Biol. Markers 13 (1998) 145 - 149; Moertel, C.G. et al., JAMA 270 (1993) 943 - 947).

A la luz de los datos disponibles, la determinación del CEA en suero, no posee ni la sensibilidad, ni tampoco la especificidad necesarias, como para facilitar su uso en un test de ensayo de exploración de rastreo, para el cáncer colorrectal en la población asintomática (véase, a dicho efecto, Reynoso, G. et al., JAMA 220 (1972) 361 - 365; Sturgeon, C., Clin. Chem. 48 (2002) 1151 - 1159).

En la actualidad, todos los métodos de exploración de rastreo para el CRC, residen en el uso de las heces, como muestra. Las muestras tomadas de las heces, tienen las ventajas implícitas consistentes en el hecho de que, su muestreo, es fácilmente posible, mediante medios no invasivos, y en el hecho de que, esta muestra, tienen cierta especificidad de tejido, a saber para el tejido intestinal. La exploración de rastreo para el CRC, a partir de un muestra de fluido corporal, por el contrario, se considera como siendo casi imposible, debido al hecho de que, el lumen intestinal, puede verse, encontrándose en el exterior (ectodermo) del cuerpo humano, como teniendo un escaso suministro de sangre. Esto, a su vez, significa obstáculos adicionales para la exploración de rastreo para el CRC, a partir de una muestra de fluido corporal, tal como el suero sanguíneo o el plasma sanguíneo.

El test de ensayo de guayacol, es actualmente el más extensamente utilizado, para el ensayo de exploración de rastreo del CRC, a partir de las heces. El test de ensayo de guayacol, no obstante, posee ambas, una escasa sensibilidad, así como también una escasa especificidad. La sensibilidad de los tests de ensayo de la sangre oculta fecal, es de ~ 26 %, lo cual significa que, un porcentaje del 74 % de los pacientes con lesiones malignas, permanece (Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41 - 55).

La visualización de lesiones precancerosas y cancerosas, representa la mejor propuesta de método para la detección temprana, pero, la colonoscopia, es invasiva, lo cual significa costos, riesgos y complicaciones (véase, a dicho efecto, Silvis, S.E. et al., JAMA 235 (1976) 928 - 930; Geenen, J.E. et al., Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231 - 235; Anderson, W.F. et al., J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126 - 1133).

La sensibilidad y la especificidad de las alternativas de diagnóstico al test de ensayo de guayacol, se ha investigado, recientemente, por parte de Sieg, A. et al., Int. J. Colorectal Dis. 14 (1999) 267 - 271. De una forma especial, se han comparado las mediciones de la hemoglobina y del complejo hemoglobina - haptoglobina, respectivamente, precedentes de un espécimen de la heces fecales. Se ha observado el hecho de que, el ensayo de la hemoglobina, tiene una sensibilidad insatisfactoria para la detección de neoplasmas colorrectales. Mientras que, el cáncer, en su estado avanzado de carcinoma, se detecta con una sensibilidad correspondiente a un porcentaje de aproximadamente un 87 %, los estados tempranos de los tumores, no se detectan con una sensibilidad suficiente. El test de ensayo del complejo de hemoglobina - haptoglobina, era más sensible en la detección de los estados tempranos del CRC. Esta detección más sensible, venía acompañada, no obstante, de una escasa especificidad. Puesto que, una escasa especificidad, no obstante, se traduce en un alto número de investigaciones secundarias innecesarias, tales como las consistentes en la colonoscopia, un ensayo con una escasa especificidad, no cumple con los requerimientos necesarios de un ensayo de exploración de rastreo generalmente aceptado.

La calprotectina, se ha descrito como siendo un biomarcador alternativo para la detección del CRC, a partir de muestras de heces fecales, en la patente estadounidense US 5.455.160 y, de una forma correspondientemente en concordancia, en la literatura científica especializada, por parte de Roseth, A.G., et al. (véase, a dicho efecto, Scand. J. Gastroenterol. 27 (1992) 793 - 798; Scand. J. Gastroenterol. 28 (1993) 1073 - 1076). Si bien la calprotectina es un marcador de enfermedades inflamatorias, su potencial como marcador para la detección del CRC, a partir de las heces, se encuentra documentada mediante varias publicaciones (véase, a dicho efecto, Johne, B., et al., Scand. J. Gastroenterol. 36 (2001) 291 - 296; Limburg, P.J., et al., Am. J. Gastroenterol. 98 (2003) 2299 - 2305; Hoff, G., et al., Gut 53 (2004) 1329 - 1333). Mientras que, la sensibilidad y la especificidad de la calprotectina, son comparables a las del inmunológico de la hemoglobina, la calprotectina, parece tener algunas características favorables para un biomarcador de diagnóstico, al compararse a la hemoglobina. Ésta se encuentra uniformemente distribuida en las heces, ésta es estable a la temperatura ambiente, haciendo ello posible el transporte por correo de la muestra, al laboratorio, y ésta no muestra ninguna interferencia con los componentes alimenticios o con los compuestos farmacéuticos (véase, a dicho efecto, Ton, H., et al., Clin. Chim. Acta 292 (2000) 41 - 54). No obstante, se detectaron unas elevadas concentraciones de la calprotectina, el heterodímero de S100A8 y S100A9, en muestras de heces fecales procedentes de pacientes que sufrían de CRC, de la enfermedad de Crohn o de la enfermedad inflamatoria del intestino. Estos resultados, se encuentran en concordancia con el rol interpretativo más general de la calprotectina, en la inflamación (véase, a dicho efecto Ryckman, C., et al., J. Immunol. 170 (2003) 3233 - 3242). Así, de este modo, el uso de la calprotectina en la gastroenterología, no se encuentra limitado a la detección del CEC, sino que, éste, se extiende a otras enfermedades, tales como la consistente, de una forma especial, en la enfermedad inflamatoria del intestino, tal y se revisa por parte Poullis, A., et al. (véase, a dicho efecto, J. Gastroenterol. Hepatol. 18 (2003) 756 - 762).

Un método adicional alternativo al test de ensayo del guayacol, para la detección del CRC en las heces fecales, es el que se ha publicado recientemente y el cual consiste en la detección del antígeno específico del cáncer colorrectal "proteína de mantenimiento de microsoma 2" (MCM2), mediante inmunohistoquímica, en las células colónicas arrastradas al interior de las heces fecales. Debido a la reducida dimensión del ensayo, la conclusión del valor de diagnóstico para la detección del cáncer colorrectal, es preliminar. Sin embargo, no obstante, el test de ensayo, parece tener únicamente una limitada sensibilidad para detectar el cáncer de colon correspondiente al lado derecho (colon ascendente)(véase, a dicho efecto, Davies, R.J. et al., Lancet 359 (2002) 1917 - 1919).

Recientemente, se ha introducido, en el mercado, un ensayo para la detección de la insoenzima piruvato quinasa M2 (M2-PK), (véase, a dicho efecto, Schebo Biotech, Gießen, Alemania). Una comparación del test de ensayo del guayacol con los inmunoensayos para la hemoglobina y la M2PK, es, por ejemplo, el que se ha llevado a cabo por parte de Vogel, T. et al., Dtsch. Med. Wochenschr. 130 (2005) 872-877. Estos muestran el hecho de que, los ensayos inmunológicos, son superiores al test de ensayo del guayacol, y que, a una especificidad comparable, el ensayo de M2-PK, es menos sensible, en la detección del CRC, al compararse con el ensayo de la hemoglobina. Sin embargo, no obstante, los autores concluyen el hecho de que, la utilidad de ambos de estos ensayos basados en las heces fecales, es todavía cuestionable.

La identificación de un marcador de tumor temprano de CRC ó de un panel de marcadores de tumor temprano de CRC, la cual podría ayudar en la detección fiable y segura de un cáncer, o proporcionar una información temprana del pronóstico, mediante medios no invasivos, a partir de una muestra de fluido corporal, ayudaría, de gran manera,

en la diagnosis y en la exploración de rastreo para esta enfermedad. Un gran número de pacientes y de proveedores de los servicios de diagnóstico, prefieren un fluido corporal, tal como el consistente en la sangre entera, el suero o el plasma, en lugar de la manipulación y estudio de una muestra de heces fecales.

5 Es especialmente importante, el hecho de mejorar la diagnosis temprana del CRC, debido al hecho de que, para los pacientes tempranamente diagnosticados, tienen una probabilidades de supervivencia mucho más altas, si se compara con la de aquellos pacientes diagnosticados en un etapa avanzada de la enfermedad. Así, por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente, en cuanto al hecho de mejorar la diagnosis del CRC, de una forma especial, a partir de una muestra de fluido corporal.

10 Era una cometido de la presente invención, el investigar el hecho de si, puede identificarse un nuevo marcador o panel de marcadores, el cual pueda ayudar en la valoración del cáncer colorrectal (CRC), in vitro. De una forma sorprendente, se ha encontrado el hecho de que, el uso de un panel de marcadores, el cual comprenda por lo menos la medición de los resultados para la seprasa y para el anti-p53, o para la osteopontina y / o para la ferritina, es muy ventajoso para la valoración del CRC, in vitro, a partir de una muestra de fluido corporal.

15 Con objeto de que sea de una utilidad clínica, un nuevo marcador de diagnóstico, como marcador individual, debería ser comparable a otros marcadores conocidos en el arte de la técnica especializada, o mejor. O bien, un nuevo marcador, debería conducir a un progreso en la sensibilidad y / o especificidad de diagnóstico de un test de ensayo, se valora mejor, por sus características operativas para destinatario, las cuales se describirán posteriormente, abajo, en detalle. Tal y como se describirá en detalle, posteriormente, abajo, se ha encontrado, de una forma sorprendente, el hecho de que, los nuevos paneles marcadores de la presente invención, mejoran, de una forma significativa, la precisión de diagnóstico, de una forma especial, en la exploración de rastreo para el CRC.

20 En una forma preferida de presentación de la presente invención, ésta se refiere a un procedimiento para la valoración del cáncer colorrectal (CRC), in vitro, el cual comprende el proceder a medir, en una muestra, la concentración y / la actividad de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, de anti-p53 y / u osteopontina y / o Ferritina y, de una forma opcional, de uno o más marcadores de CRC distintos, adicionales, y la utilización de resultado combinado de la mediciones para la seprasa, anti-p53 y / u osteopontina y / o Ferritina y, de una forma opcional, de uno o más marcadores de CRC distintos, adicionales, en la valoración del CRC.

25 De una forma sorprendente, se ha encontrado el hecho de que, una concentración y / o actividad disminuidas de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, en un muestra de ensayo, se encuentra asociada con el riesgo y / o existencia de cáncer, de una forma especial, de un CRC. El marcador de seprasa, puede combinarse con el marcador anti-p5 3, osteopontina y / o ferritina y, en caso requerido, con otros marcadores para el CRC, tales como el CEA y / o el CYFRA21.1.

30 Una forma preferida de presentación de la presente invención, se refiere a una exploración de rastreo de masas de una población, con objeto de distinguir entre los individuos los cuales se encuentran exentos de cáncer colorrectal y los individuos los cuales podrían calificarse como casos "sospechosos", es decir, los individuos los cuales podrían tener CEC. Este último grupo de individuos, podría entonces someterse a procedimientos adicionales de diagnóstico, tales como, por ejemplo, procedimientos mediante imágenes u otros medios apropiados.

35 Una forma adicional presentación de la presente invención, se refiere a un panel de marcadores tumorales, los cuales son apropiados para la valoración del cáncer colorrectal.

40 En una forma de presentación de la presente invención, ésta está dirigida a un procedimiento para la valoración del CEC, in vitro, mediante un marcador bioquímico, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración y / o actividad de seprasa, y la utilización de tales resultados de medición, de una forma particular, la concentración o actividad determinada en la valoración del cáncer colorrectal.

45 La presente invención, está también dirigida a un procedimiento para la valoración del CRC, in vitro, mediante un marcador bioquímico, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración y / o actividad de seprasa, de un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en anti-p53, osteopontina y ferritina y uno o más marcadores adicionales distintos, y la utilización de los resultados de las mediciones, de una forma particular, de las concentraciones determinadas, en la valoración del cáncer colorrectal. Los marcadores preferidos para uso en combinación con la seprasa, el anti-p53, la osteopontina y / o la ferritina, son marcadores, los cuales son, de una forma general, marcadores tumorales (es decir, marcadores, los cuales no son específicos para un tipo individual de tumor) o, por otro lado, marcadores tumorales específicos (marcadores los cuales son específicos para un tipo individual de tumor). De una forma preferida, el uno o más marcadores adicionales distintos, son el antígeno carcinoembrionario (CEA), y / o el CYFRA21.1. De una forma preferible, estos marcadores, se utilizan en cualquier tipo de combinación, conjuntamente con la seprasa.

50 Un valor de corte para un marcador individual o una combinación de marcadores, puede determinarse a partir de un test de ensayo de un grupo de individuos sanos. De una forma preferible, el valor de corte, se ajusta de tal modo que éste resulte en una especificidad del 90 %, y se prefiere también, el que el valor de corte, se ajuste de tal modo que,

- 5 éste, resulte en una especificidad del 95 %, se prefiere también, el que el valor de corte, e ajuste de tal modo que, éste, resulte en una especificidad del 98%. Un valor para un marcador individual o una combinación de marcadores el cual se encuentre por encima del valor de corte, puede ser indicativo, por ejemplo, para la presencia de un cáncer. Tal y como podrá apreciar una persona experta en el arte de la técnica especializada, para ciertos marcadores, tales como los consistentes en la seprasa, lo mismo es válido (cierto), para un valor que se encuentre por debajo del valor de corte.
- 10 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere a un procedimiento para la valoración del CRC, el cual comprende la medición de la seprasa y del anti-p53, y la utilización de los valores de medición combinados, para la valoración del CRC.
- 15 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere a un procedimiento para la valoración del CRC, el cual comprende la medición de la seprasa y de la osteopontina, y la utilización de los valores de medición combinados, para la valoración del CRC.
- 20 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere a un procedimiento para la valoración del CRC, el cual comprende la medición de la seprasa y de la ferritina, y la utilización de los valores de medición combinados, para la valoración del CRC.
- 25 La presente invención, en una forma preferida adicional de presentación, se refiere a un procedimiento para la valoración del CRC, el cual comprende la medición de la seprasa, de la ferritina, del CEA, de la osteopontina y del anti-p53, y la utilización de los valores de medición combinados, para la valoración del CRC.
- 30 La presente invención, en una forma preferida adicional de presentación, se refiere a un procedimiento para la valoración del CRC, el cual comprende la medición de la seprasa, de la ferritina, del CEA, del CYFRA21-1, de la osteopontina y del anti-p53, y la utilización de los valores de medición combinados, para la valoración del CRC.
- 35 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende, por lo menos, la seprasa y el anti-p53, en la valoración del cáncer colorrectal.
- 40 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende, por lo menos, la seprasa y la osteopontina, en la valoración del cáncer colorrectal.
- 45 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende, por lo menos, la seprasa y la ferritina, en la valoración del cáncer colorrectal.
- 50 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende, por lo menos, la seprasa y el CEA, en la valoración del cáncer colorrectal.
- 55 La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende, por lo menos, la seprasa y el CYFRA21-1, en la valoración del cáncer colorrectal.
- 60 La presente invención, se refiere, también, al uso de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, en la valoración del cáncer de colon, en donde, una concentración y / o la actividad disminuidas de seprasa y / o fragmentos de ésta, es indicativa de un cáncer.
- 65 La presente invención, se refiere, también, al uso de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, en la valoración del cáncer de colon, en donde, una concentración y / o actividad disminuidas de seprasa y / o fragmentos de ésta, es indicativa de un cáncer de colon.
- La presente invención, se refiere, también, al uso de un reactivo para la medición de la actividad enzimática de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, en la valoración del cáncer de colon, en donde, una concentración y / o actividad disminuidas de seprasa y / o fragmentos de ésta, es indicativa de un cáncer de colon.
- La presente invención, se refiere, también, a un dispositivo el cual comprende los medios para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, o para hacer uso de las combinaciones de marcadores dadas a conocer.

La presente invención, proporciona, también, un equipo, a modo de “kit”, el cual comprende los medios para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, es decir, los medios para por lo menos medir la seprasa, y un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la osteopontina, y la ferritina.

5 La presente invención, proporciona, también, un equipo, a modo de “kit”, para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos, los reactivos requeridos para medir, de una forma específica, la seprasa y el anti-p53, respectivamente y, de una forma opcional, reactivos auxiliares para la realización de la medición.

10 La presente invención, proporciona, también, un equipo, a modo de “kit”, para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos, los reactivos requeridos para medir, de una forma específica, la seprasa y la osteopontina, respectivamente y, de una forma opcional, reactivos auxiliares para la realización de la medición.

15 La presente invención, proporciona, también, un equipo, a modo de “kit”, para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir, de una forma específica, la seprasa y la ferritina, respectivamente y, de una forma opcional, reactivos auxiliares para la realización de la medición.

20 La presente invención, proporciona, también, un equipo, a modo de “kit”, para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir, de una forma específica, la seprasa y el CYFRA21, respectivamente y, de una forma opcional, reactivos auxiliares para la realización de la medición.

25 La presente invención, proporciona, también, un equipo, a modo de “kit”, para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir, de una forma específica, la seprasa y el CEA, respectivamente y, de una forma opcional, reactivos auxiliares para la realización de la medición.

30 En una forma preferida de presentación, la presente invención, se refiere a un procedimiento para la valoración del cáncer colorrectal, in vitro, el cual comprende el proceder a medir, en una muestra, la concentración y / o la actividad de (a) un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, (b) de una forma opcional, uno o más marcadores adicionales distintos para el CRC, y (c), el uso del resultado de las mediciones de la etapa (a) y, de una forma
35 opcional, de la etapa (b), en la valoración del CRC.

En una forma preferida de presentación, la presente invención, se refiere a un procedimiento para la valoración del cáncer colorrectal (CRC), in vitro, el cual comprende el proceder a medir, en una muestra, la concentración y / o la actividad de (a) un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, (b) de anti-p53, osteopontina y / o ferritina, (c) de
40 una forma opcional, uno o más marcadores adicionales distintos para el CRC, y (d), el uso del resultado de las mediciones combinadas de la etapa (a) y de la etapa (b), y de una forma opcional, de la etapa (c), en la valoración del CRC.

En las formas preferidas de presentación de la presente invención, la concentración y / o la actividad de la seprasa, se combina con la medición de por lo menos el anti-p53, la osteopontina, o la ferritina, y el valor combinado, se correlaciona con la cuestión de diagnóstico subyacente tal como, por ejemplo, la probabilidad de la presencia o la ausencia de CRC, la etapa de la enfermedad, la progresión de la enfermedad, o la respuesta a la terapia.

La seprasa humana (alias proteína de activación de fibroblastos (FAP – [del inglés, fibroblast activation protein]-), es una glicoproteína unida a la membrana, la cual tiene actividad gelatinasa y dipeptidil peptidasa. Ésta consiste en dos unidades monoméricas idénticas (Base de datos “Uni Prot KB database” con el n° de acceso P 27487), caracterizadas por las secuencia que se facilita en la SEQ ID NO:1. El monómero de seprasa comprende 766 aminoácidos, y éste tiene un peso molecular aparente de 97 kDa (SDS-PAGE) (Pineiro-Sanchez, et al., J. Biol. Chem. 272 (1997) 7595-7601; Park, et al., J. Biol. Chem. 274 (1999) 36505-36512). Una forma soluble de la seprasa, es la enzima de segmentación de antiplasmina APCE (Lee, et al., Blood 103 (2004) 3783-3788; Lee, et al., Blood 107 (2006) 1397-1404). La secuencia de aminoácidos N-terminales de la APCE, corresponde a los residuos 24 – 38 de la seprasa, la cual, según se predice, tiene sus primeros 6 residuos N-terminales, en el citoplasma del fibroblasto, seguido por un dominio de transmembrana de 20 residuos y, a continuación, un dominio catalítico C-terminal extracelular de 734 residuos (véase, a dicho efecto, Goldstein, et al., Biochim Biophys Acta. 1361 (1997) 11-19; Scanlan, et al., Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994) 5657-5661).

Piñero-Sánchez et al. (citados anteriormente arriba), descubrieron el hecho de que, una expresión incrementada de la seprasa, de correlaciona con el fenotipo invasivo de las células del melanoma y del carcinoma humanos. Henry et al., Clin. Cancer Res. 13 (2007) 1736-1741, describen el hecho de que, los pacientes humanos con cáncer de colon, los cuales tienen los niveles altos de seprasa estromal, tienen más probabilidades de tener un progresión agresiva de la enfermedad y un desarrollo potencial de metástasis o de recidiva. I

Iwasa et al., 2005, dan a conocer el hecho de que, la expresión incrementada de la actividad seprasa, se encuentra asociada con la metástasis de los nódulos linfáticos, en el cáncer colorrectal humano.

5 Así, de este modo, ninguno de los documentos correspondientes al arte de la técnica especializada anteriormente citados, arriba, sugiere el hecho de que, una concentración y / o actividad disminuida de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, en los fluidos corporales, sería indicativo de un cáncer.

10 De una forma sorprendente, se encontró, en la presente invención, el hecho de que, una determinación de la concentración y / o la actividad de, por ejemplo, la actividad enzimática de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste, de una forma particular, de APCE, en un fluido corporal, permite la valoración de una enfermedad cancerosa, tal como, por ejemplo, una enfermedad de cáncer de pulmón, de mama o de colon, o de riñón y, de una forma particular, de una enfermedad de cáncer de pulmón. De una forma todavía más sorprendente, se encontró el hecho de que, una concentración y / o actividad disminuidas de seprasa o de fragmentos de ésta, en un muestra, al compararse con los controles normales, es indicativo de un riesgo de existencia de un cáncer.

Tal y como se utiliza aquí, en este documento, cada uno de los términos que se mencionan a continuación, tienen el significado asociado con éste, en esta sección.

20 Los artículos “un” y “una”, se utilizan aquí, en este documento, para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, “un marcador”, significa un marcador o más de un marcador. El término “por lo menos”, se utiliza aquí, en este documento, para indicar el hecho de que, de una forma opcional, pueden encontrarse presentes uno o más objetos. A título de ejemplo, un panel de marcadores el cual comprende por lo menos (los marcadores) seprasa y CYFRA 21-1, puede comprender, de una forma opcional, uno o más marcadores adicionales distintos.

La expresión “uno o más”, significa de 1 a 50, de una forma preferible, de 1 a 20, prefiriéndose, también, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, ó 15.

30 El término “marcador” o “marcador bioquímico”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una molécula a ser utilizada como diana u objetivo, para analizar una muestra de ensayo de un paciente. Los ejemplos de tales tipos de dianas moleculares, son proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador, en la presente invención, se contemplan como incluyendo variantes de origen natural de dichas proteínas, así como también, fragmentos de dicha proteína o de dicha variante, de una forma particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables, comprenden, de una forma preferible, por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos del citado polipéptido marcador. Una persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocerá el hecho de que, las proteínas las cuales se liberan por parte de las células, o que se encuentran presentes en la matriz extracelular, pueden dañarse, por ejemplo, durante la inflamación, o que podrían degradarse o segmentarse en dichos fragmentos. Ciertos marcadores, se sintetizan en una forma inactiva, los cuales pueden subsiguientemente activarse mediante proteólisis. Tal y como podrán apreciar aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, proteínas o fragmentos de éstos, pueden también encontrarse presentes, como una parte de un complejo. En el sentido de la presente invención, tal tipo de complejo, puede también utilizarse como un marcador. Las variantes de un polipéptido marcador, se codifican mediante el mismo gen, pero, éstas, difieren en cuanto a lo referente a su punto isoeléctrico (=PI) o su peso molecular (=MW), o ambos, por ejemplo, como resultado de un proceso alternativo del RNA ó pre-mRNA. La secuencia de aminoácidos de una variante es, en un porcentaje del 95 %, ó más, idéntica a la correspondiente secuencia del marcador. De una forma adicional, o de una forma alternativa, un polipéptido marcador, o una variante de éste, puede portar una modificación post-translacional. Son ejemplos no limitativos de modificaciones post-translacionales, la glicosilación, la acilación y / o la fosforilación.

50 Un “marcador del cáncer” y, de una forma particular, un “marcador de cáncer de colon o cáncer colorrectal”, en el sentido de la presente invención, es cualquier marcador, el cual, si se combina con la combinación de marcadores, la cual comprende seprasa y un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la osteopontina, y la ferritina, añade una información relevante en la valoración del CRC. La información, se considera como relevante o de un valor añadido si, a una especificidad dada, puede mejorarse la sensibilidad, o si a una sensibilidad dada, puede mejorarse la especificidad, respectivamente, para la valoración del CRC, mediante la inclusión del citado marcador en una combinación de marcadores, que comprende ya el marcador de seprasa, y un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la osteopontina, y la ferritina. En la forma preferida de presentación de la presente invención, para la valoración del CRC, la mejora en la sensibilidad o en la especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa, a un nivel de significancia de $p = 0,05, 0,02, 0,01$ ó inferior.

65 El término “muestra”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una muestra biológica, obtenida para el propósito de la evaluación in vitro. En los procedimientos en concordancia con la presente invención, la muestra, o la muestra de un paciente, puede comprender, de una forma preferible, cualquier fluido corporal. Las muestras de ensayo preferidas, incluyen a la sangre entera, al suero y al plasma, siendo, el plasma o el suero, los mayormente preferidos.

El término “valoración del cáncer” y, de una forma particular, “valoración del cáncer de colon”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se usa para indicar el hecho de que, el procedimiento en concordancia con la presente invención, (solo, o conjuntamente con otros marcadores o variables, tales como, por ejemplo, los criterios presentados por parte de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer – [de sus siglas en inglés]-) (véase anteriormente, arriba)), ayudarán por ejemplo al médico especialista, a establecer o a confirmar la ausencia o la presencia del CRC, o ayudarán, por ejemplo, al médico especialista, en la prognosis, en la detección de la recurrencia o recidiva (seguimiento de control de los pacientes, después de la cirugía), y / o en el seguimiento de control del tratamiento, especialmente, de la quimioterapia.

Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, cualquier tipo de valoración de esta clase, se realiza in vitro. A continuación, la muestra del paciente, se desecha. La muestra del paciente, se utiliza solamente para el procedimiento de diagnóstico in vitro, en concordancia con la presente invención y, el material de la muestra del paciente, no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. De una forma típica, la muestra, es una muestra líquida de, por ejemplo, sangre entera, suero o plasma.

El término “medición”, comprende, de una forma preferible, una medición cualitativa, semi-cualitativa ó cuantitativa d un marcador, en una muestra. En una forma preferida de presentación, las mediciones, en un procedimiento en concordancia con la presente invención, son mediciones cuantitativas.

Seprasa:

En concordancia con la presente invención, el término “polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste”, se refiere a polipéptidos monoméricos o multiméricos, refiriéndose, éste, de una forma particular, a polipéptidos diméricos. De una forma adicional, el término “polipéptido de seprasa y / fragmentos de éste”, se refiere, de una forma particular, a formas solubles de seprasa y / o fragmentos de ésta, se refiere, de una forma preferible, a formas solubles de seprasa y / o fragmentos de ésta, de una forma particular, a la enzima de segmentación de la antiplasmina (APCE), así como a la seprasa y / o fragmentos de seprasa, en forma de un complejo, con otro polipéptido.

Los polipéptidos de seprasa, de una forma particular, las formas solubles de polipéptidos de seprasa y / o fragmentos de éstos,, se detectan, de una forma preferible, en muestras apropiadas, de una forma particular, en fluidos corporales. Las muestras preferidas, son los fluidos corporales, tales como la sangre, el plasma, el suero, el esputo y la orina. De una forma preferible, la muestra, se deriva de un sujeto humano, tal como, por ejemplo, un paciente con un tumor, o una persona que se encuentra en riesgo de tener un tumor, o una persona sospechosa de tener un tumor.

En concordancia con la presente invención, se determina la concentración y / o la actividad de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste. En una forma de presentación de la presente invención, el marcador de seprasa, se mide, de una forma específica, a partir de una muestra, mediante el uso de un agente de unión específico.

Pueden utilizarse varios procedimientos de inmunodiagnóstico, para alcanzar un resultado comparable a los logros de la presente invención. Así, por ejemplo, pueden utilizarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Tales tipos de estrategias, comprenden, entre otros, el uso de péptidos sintéticos, los cuales representen un epítipo de seprasa, para la inmunización. De una forma alternativa, puede utilizarse la inmunización con DNA, también conocida como la vacuna de DNA.

De una forma preferible, la seprasa, se detecta en un formato de ensayo del tipo sándwich. En un ensayo de este tipo, se procede, por un lado, a utilizar un primer agente de unión específico, para capturar la seprasa y, por otro lado, se utiliza un segundo agente de unión específico, el cual se encuentra marcado, para ser directamente o indirectamente detectable. Los agentes de unión específicos utilizados en el formato de ensayo del tipo sándwich, pueden ser anticuerpos, dirigidos, de una forma específica, contra la seprasa. Por otro lado, la detección, puede llevarse a cabo procediendo a utilizar diferentes anticuerpos de captura y marcados, es decir, anticuerpos los cuales reconocen diferentes epítipos, en el polipéptido de seprasa. Por otro lado, un ensayo del tipo sándwich, puede también llevarse a cabo, con un anticuerpo de captura y de marcaje, el cual esté dirigido contra el mismo epítipo de seprasa. En esta forma de presentación, pueden detectarse únicamente formas diméricas y multiméricas de seprasa.

En concordancia con una forma adicional de presentación de la presente invención, el marcador de seprasa, se mide, de una forma específica, a partir de una muestra, mediante la utilización de un régimen de ensayo el cual sea apropiado para la detección de la actividad enzimática de la seprasa. La actividad enzimática, puede determinarse, por ejemplo, mediante zimografía, mediante la utilización de zimogramas de gelatina. La actividad peptidasa, puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos fluorescentes, mediante la utilización de apropiados sustratos de péptidos marcados. Los ensayos para la medición de la actividad seprasa, se describen, por ejemplo, por parte de Lee et al. (2006), mencionado anteriormente, arriba.

Osteopontina (OPN):

La OPN, se encuentra en el plasma, la orina, la leche y la bilis normales (US 6,414,219; US 5,695,761; Denhardt, D.T. y Guo, X., FASEB J. 7 (1993) 1475-1482; Oldberg, A., et al., PNAS 83 (1986) 8819-8823; Oldberg, A., et al., J. Biol. Chem. 263 (1988) 19433-19436; Giachelli, C.M., et al., Trends Cardiovasc. Med. 5 (1995) 88-95). La proteína OPN humana y el cDNA de ésta, se han aislado y secuenciado (Kiefer M.C., et al., Nucl. Acids Res. 17 (1989) 3306).

Las funciones de la OPN en la adhesión celular, la quimiotaxis, la supresión de la interleucina 10 (IL-10) la angiogénesis dependiente del estrés, la prevención de la apoptosis, y el crecimiento independiente del anclaje de las células tumorales, mediante la regulación de las interacciones célula – matriz y la señalización celular, mediante el enlace o unión con receptores de integrina y de CD44. Mientras que la expresión constitutiva de la OPN, existe en varios tipos de células, se ha detectado la expresión inducida, en los linfocitos T, en las células epidérmicas, en las células óseas, en los macrófagos, y en las células tumorales, en procesos de remodelado o reestructuración, tales como los consistentes en la inflamación, la isquemia – reperfusión, la resorción ósea, y la progresión tumoral (revisado por parte de Wai, P.Y. y Kuo, P.C., J. Surg. Res. 121 (2004) 228-241).

Es conocido el hecho de que, la OPN, interactúa con un gran número de receptores de integrina. Se ha reportado la expresión incrementada de la OPN, en un gran número de cánceres humanos, y se han identificado sus receptores cognados o específicos (integrinas av-b3, av-b5, y av-b1, y CD44). En estudios realizados in vitro, por parte de Irby, R.B., et al., Clin. Exp. Metastasis 21 (2004) 515-523, se indica el hecho de que, ambas, la expresión de la OPN endógena (vía transfección estable), así como de la OPN exógena (añadida a un medio de cultivo), mejoraban la motilidad y la capacidad invasiva de las células cancerosas del colon, in vitro. La OPN, parecía regular la motilidad a través de la interacción con CD44. La expresión de la OPN, reducía, también, la adhesión intercelular (homotípica), lo cual se considera como una característica de las células cancerosas metastásicas. La transfección estable de cuatro líneas celulares de cáncer de colon escasamente tumorígenas, con OPN, dio también, como resultado, una tumorigenicidad mejorada, in vivo, con una proliferación incrementada del recuento de micro-vasos CD31-positivos, concordante con el grado de expresión de la OPN. Los fragmentos de la OPN, pueden también utilizarse en un procedimiento en concordancia con la presente invención.

Mor, G., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 7677 – 7682, reportan sobre un test de ensayo de sangre (suero), para la diagnosis temprana del cáncer epitelial del ovario, basado en la cuantización simultánea de la OPN y de tres analitos adicionales distintos. D

En una forma preferida de presentación de la presente invención, ésta se refiere a un procedimiento para la valoración del CRC in vitro, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de osteopontina y de seprasa, combinando los valores medidos y utilizando el valor combinado en la valoración del CRC.

Antígeno carcinoembrionario (CEA)

El CEA (antígeno carcinoembrionario), es una glicoproteína monomérica (peso molecular, aproximadamente 180.000 Dalton), con un componente variable de hidratos de carbono de aproximadamente un porcentaje del 45 - 60% (Gold. P. y Freedmann, S.O., J. Exp Med 121 (1965) 439 - 462). El CEA, como el AFP, pertenece al grupo de antígenos carcinofetales que se producen durante el período embrionario y fetal. La familia de genes CEA, consiste en aproximadamente 17 genes activos, en dos subgrupos. El primer grupo, contiene CEA y antígenos no específicos de reacción cruzada (NCA - del inglés, Non specific Cross-reacting Antigens -); el segundo grupo, contiene las glicoproteínas específicas del embarazo (PSG - del inglés, Pregnancy-Specific Glycoproteins -).

El CEA, se encuentra, principalmente, en el tracto gastrointestinal fetal y el suero fetal. Éste se origina, también, en ligeras cantidades, en el tejido intestinal, pancreático, y hepático de adultos sanos. La formación de CEA, se reprime, después del nacimiento y, correspondientemente en concordancia, los valores del CEA en suero, son difícilmente mesurables en pacientes adultos sanos.

Se encuentran, frecuentemente, altas concentraciones de CEA, en casos de adenocarcinoma colorrectal (véase, a dicho efecto, Fateh-Modhadam, A. et al. (eds.), Tumormarker und ihr sinnvoller Einsatz, - Marcadores tumorales en su aplicación conveniente y razonable -, Juergen Hartmann Verlag GmbH, Marloffstein-Rathsberg (1993), ISBN-3-926725-07-9). Unas ligeras a moderadas elevaciones del CEA (raramente > 10 ng / ml), acontecen, en un porcentaje del 20 - 50% de enfermedades benignas del intestino, del páncreas, del hígado y de los pulmones (por ejemplo, cirrosis hepática, hepatitis crónica, pancreatitis, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, enfisema)(Stieber, P. y Fathe-Moghadam, A., mencionado anteriormente, arriba). Los fumadores, tienen también valores elevados del CEA.

La indicación principal, para las determinaciones del CEA, es el diagnóstico y control de la terapia, y el control de seguimiento de los pacientes afectados de carcinoma colorrectal. Las determinaciones del CEA, no se recomiendan, para la exploración de rastreo del cáncer, en la población general. Las concentraciones de CEA, dentro del rango normal, no excluyen la posible presencia de una enfermedad maligna.

Los anticuerpos, en el ensayo elaborado por parte de la firma Roche Diagnostics, reacciona con el CEA y (como en casi la totalidad de procedimientos de detección del CEA), con el antígeno de meconio (NCA2). La reactividad cruzada con el NCA1, es del 0,7% (Hammarstrom, S., et al., Cancer Res. 49 (1989) 4852 - 4858; y Borner, O.P., Tumor Biol. 12 (1991) 9 - 15). El CEA, se midió con un analizador del tipo Elecsys®, utilizando el producto número 117731629, en concordancia con las instrucciones del fabricante.

CYFRA 21-1:

En un ensayo para "CYFRA 21-1", éste mide específicamente un fragmento soluble de citoqueratina 19, como presente en la circulación. La medición de CYFRA 21-1, se basa, de una forma típica, en dos anticuerpos monoclonales (Bodenmueller, H., et al., Int. J. Biol. Markers 9 (1944) 75-81). En el ensayo de CYFRA 21-1 de Roche Diagnostics, Alemania, se utilizan los dos anticuerpos monoclonales específicos (KS 19.1 y BM 19.21), y se mide un fragmento soluble de citoqueratina 19, que tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 Dalton. Las citoqueratinas, son proteínas estructurales que forman las subunidades de filamentos intermediarios epiteliales. Hasta ahora, se han identificado veinte polipéptidos de citoqueratina diferentes. Debido a sus modelos patrón de distribución específica, éstos son eminentemente apropiados para su uso como marcadores de diferenciación, en la patología tumoral. Los polipéptidos de citoqueratina intacta, son escasamente solubles, pero pueden detectarse fragmentos solubles en el suero (Bodenmueller, H., et al., anteriormente citado, arriba).

El CYFRA 21-1, es un marcador bien establecido para el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCL - [del inglés, Non-Small-Cell Lung Carcinoma] -). La principal indicación para CYFRA 21-1, es el control del curso del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCL)(Sturgeon, C. Clinical Chemistry 48 (2002) 1151 - 1159).

En la diagnosis primaria, unos altos niveles de CYFRA 21-1, indican un estado tumoral avanzado, y una prognosis reducida, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (van der Gaast, A., et al., Br. J. Cancer 69 (1994)525 - 528). Un valor normal o únicamente ligeramente elevado, no excluye la presencia de un tumor. Se ha documentado una terapia satisfactoria, mediante una rápida caída del nivel de CYFRA 21-1 en suero, dentro de los márgenes normales. Un valor constante del valor de CYFRA 21-1, ó un descenso ligeramente suave, o lento en el valor de CYFRA 21-1, indica una eliminación incompleta de un tumor o la presencia de múltiples tumores, con las correspondientes consecuencias terapéuticas y del pronóstico. La progresión de la enfermedad, se muestra a menudo de una forma más temprana, mediante valores incrementantes de CYFRA 21-1, que mediante la sintomatología clínica y procedimientos de obtención y procesado de imágenes.

Raramente, se encuentran unos valores ligeramente elevados (de hasta 10 nm / ml), en enfermedades benignas del hígado, y de fallos renales, marcadas. No existe ninguna correlación con el seco, con la edad o con el hecho de fumar. Los valores para el CYFRA 21-1, no se encuentran tampoco afectados por el embarazo.

Los valores para el CYFRA-21-1, se miden, de una forma preferible, mediante un analizador del tipo Elecsys®, mediante la utilización de un producto de Roche, con el número 11820966, en concordancia con las instrucciones del fabricante.

Ferritina:

La ferritina es una macromolécula con un peso molecular de al menos 440 kD (en relación al contenido de hierro), y ésta consiste en una carcasa proteica (apoferritina) de 24 subunidades y un núcleo de hierro que contiene una media de aproximadamente 2500 iones de Fe³⁺ (en la ferritina hepática y esplénica) (Wick, M. et al., Ferritin in Iron Metabolism -Diagnosis of Anemias, - Ferritina en el metabolismo del hierro – Diagnosis de anemias -, segunda edición, Springer-Verlag (1995), ISBN 3-211-82525-8 e ISBN 0-387-82525-8). La ferritina tiende a formar oligómeros y cuando ésta se presenta en exceso, en las células de los órganos de almacenamiento, existe entonces una tendencia a la condensación a hemosiderina semicristalina, en los lisosomas.

Pueden distinguirse por lo menos 20 isoformas, con la ayuda del enfoque isoeléctrico (véase, a dicho efecto, Arosio, P. et al., Heterogeneity of ferritin II: Immunological aspects, - Heterogeneidad de la ferritina II: Aspectos inmunológicos -, en: Albertini A., Arosio P., Chiancone E., Drysdale J. (editores), Ferritins and isoforms as biochemical markers, - Ferritinas e isoformas como marcadores bioquímicos -, Elsevier, Ámsterdam (1984) páginas 33-47). Esta microheterogeneidad se debe a las diferencias en los contenidos de las subunidades de H₂ y de L levemente básica. Las isoformas básicas son responsables de la función de almacenamiento de hierro a largo plazo y éstas se encuentran, principalmente, en el hígado, en el bazo y en la médula ósea (Kaltwasser, J.P. et al., Serumferritin: Methodische und Klinische Aspekte, - Seroformina: Aspectos en cuanto a los métodos y clínicos -, Springer Verlag (1980)). Las isoformas ácidas, se encuentran, principalmente, en el miocardio, en la placenta, y en el tejido tumoral. Éstas presentan un contenido férrico menor y, presumiblemente, actúan como intermediarias en la transferencia del hierro, en varios procesos de síntesis (Morikawa, K. et al., Leuk. Lymphoma 18 (1995) 429-433; Borch-Johnson, B., Analyst 120 (1995) 891-903; Cook, J. et al., Adv. Exp. Med. Biol.356 (1994) 219-228).

La determinación de la ferritina, es un método adecuado para determinar la situación metabólica del hierro. La determinación de la ferritina, en el inicio de la terapia, proporciona una medida representativa de las reservas corporales de hierro. Clínicamente, se ha demostrado el hecho de que, un valor límite de 20 µg / l (ng / ml) es de utilidad en la detección de la deficiencia prelatente de hierro. Este valor, proporciona un indicador fiable del agotamiento de las reservas de hierro, las cuales pueden movilizarse para la síntesis de la hemoglobina. Cuando el nivel de ferritina es elevado y se puede excluir la posibilidad de un trastorno de distribución, ello se trata de una manifestación de sobrecarga férrica en el cuerpo. Como valor umbral o límite de ferritina, se utiliza un valor de 400 µg / l (ng/ml). También se observan valores elevados de ferritina en los siguientes tumores: leucemia aguda, enfermedad de Hodgkin y los carcinomas de pulmón, hígado y próstata. Se ha demostrado el hecho de que, la determinación de la ferritina, es de utilidad en las metástasis hepáticas. Algunos estudios realizados, indican el hecho de que, un porcentaje del 76 % de todos los pacientes con metástasis hepáticas, presentan unos valores de ferritina superiores a los 400 µg / l (ng / ml). Algunas razones para estos valores elevados, podrían ser la necrosis celular, el bloqueo de la eritropoyesis o la síntesis incrementada en el tejido tumoral.

Por otro lado, se describió, como característico, el hecho de que, en los cánceres gastrointestinales, no se incrementaban los niveles séricos de ferritina (véase, a dicho efecto, Niitsu, Y. et al., *Rinsho Ketsueki* 21 (1980) 1135-1143). Adicionalmente, además, se ha reportado el hecho de que, los niveles medios de ferritina sérica, son significativamente menores, en los pacientes con cáncer colorrectal avanzado, que en los controles (Kishida, T. et al., *J. Gastroenterol.* 29 (1994) 19-23). El descenso de los niveles séricos de ferritina, viene provocado por el sangrado continuo y, esta pérdida de sangre, se encuentra relacionada con el tamaño y la localización del tumor (Li, F. et al., *J. Gastroenterol.* 34 (1999) 195-199).

La ferritina, se mide, de una forma preferible, en un analizador del tipo Elecsys®, mediante la utilización del producto de Roche, con el número de producto 11820982, en concordancia con la instrucciones del fabricante.

Anti-p53:

Los anticuerpos de p53, se descubrieron hace 25 años, durante el transcurso de la exploración de rastreo de antígenos asociados con tumores, en el cáncer de mama, sin el conocimiento de las mutaciones del gen p53 (véase, a dicho efecto, Crawford, L. et al., *Int. J. Cancer* 30 (1982) 403-408). El supresor tumoral p53, es una fosfoproteína, apenas detectable en el núcleo de las células normales (véase, a dicho efecto, Benchimol, S. et al., *EMBO J.* 1 (1982) 1055-1062). En el estrés celular, de una forma particular, en el estrés celular inducido por un daño en el DNA, el p53, puede detener la progresión del ciclo celular, permitiendo así, de este modo, el hecho de que, el DNA, se repare, o que éste puede conducir a la apoptosis. En las células celulares las cuales portan un p53 mutante, esta proteína ya no es capaz de controlar la proliferación celular, lo cual tiene como resultado un reparación ineficaz de DNA (véase, a dicho efecto, Levine, A. *Cell* 88 (1997) 323-331). Los cambios más comunes del p53 en el cáncer humano, son las mutaciones sin sentido puntuales, las cuales se encuentran en los cánceres de colon, de estómago, de mama, de pulmón, del cerebro y del esófago (véase, a dicho efecto, Greenblatt, M. et al., *Cancer Res.* 54 (1994) 4855-4878). Se estima el hecho de que, las mutaciones del p53, es el evento genético más frecuente, en los cánceres humanos, y éstos significan un porcentaje de más del 50 % de los casos. Existe una gran correlación entre la frecuencia de anticuerpos p53 y la frecuencia de mutaciones de p53, argumentándose el hecho de que, las mutaciones del p53, se encuentran involucradas en la aparición de estos anticuerpos (véase, a dicho efecto, Soussi, T. *Cancer Res.* 60 (2000) 1777-1788). Los anticuerpos de P53, se encuentran en los pacientes humanos afectados de cáncer, con una especificidad correspondiente a un porcentaje del 96 %, pero, la sensibilidad de dicha detección, es únicamente la correspondiente a un porcentaje del 30 %.

De una forma preferible, el anti-p53, se mide mediante la utilización de dos péptidos inumuno-dominantes, del tipo salvaje de la proteína, p53 (véase, a dicho efecto, Lubin et. al., *Cancer Res.* 53 (1993) 5872-5876).

Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, los polipéptidos tales como los consistentes en la seprasa, se miden, de una forma preferible, mediante la utilización de uno o más agentes de unión específicos. Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para la seprasa, una lectina de unión a la seprasa, o un anticuerpo a la seprasa. Un agente de unión específico tiene, por lo menos, una afinidad de 10^7 l / mol, para su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico, tiene, de una forma preferible, una afinidad de 10^8 l / mol, o, también, de una forma preferible, una afinidad de 10^9 l / mol, para su molécula diana. Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, el término específico, se utiliza para indicar el hecho de que, otras biomoléculas presentes en la muestra, no se unen, de una forma significativa, al agente de unión específico para la seprasa. De una forma preferible, el nivel de enlace o unión, a una biomolécula distinta que la molécula diana, tiene como resultado un afinidad de enlace o unión, la cual es de un valor de cómo mucho únicamente de un porcentaje del 10 %, ó inferior, de únicamente un porcentaje del 5 %, ó inferior, de únicamente un porcentaje del 2 % ó inferior, o únicamente un porcentaje del 1 %, ó inferior, de la afinidad de la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferido, cumplirá con ambos, un criterio mínimo para la afinidad, así como también para la afinidad.

Un agente de unión específico, de una forma preferible, es un anticuerpo el cual es reactivo con la seprasa. El término anticuerpo, se refiere a un anticuerpo policlonal, a un anticuerpo monoclonal, a fragmentos de unión al

antígeno, de tales tipos de anticuerpos, a los anticuerpos de cadena individual, así como a las construcciones genéticas, las cuales comprenden el dominio de enlace de un anticuerpo.

5 Puede utilizarse cualquier fragmento que retenga los criterios anteriormente mencionados, arriba, de un agente de unión específico. Los anticuerpos, se generan, según el estado actual de la técnica de los procedimientos correspondientes al arte de la técnica especializada, de la forma que se describe, por ejemplo, en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, (Práctica y teoría de los inmunoensayos de enzimas, 11), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, en la totalidad del libro y, especialmente, en las páginas 43 - 78). De una forma adicional, las personas expertas en el arte especializado de la técnica, están bien informadas sobre los procedimientos basados en los inmunoabsorbentes, los cuales pueden utilizarse para un aislamiento específico de los anticuerpos. Mediante la utilización de estos procedimientos, puede mejorarse la calidad de los anticuerpos policlonales y, así, de este modo, su rendimiento, en los inmunoensayos. (véase, a dicho efecto, Tijssen, P., mencionado anteriormente, arriba, páginas 108 - 115).

15 En cuanto a lo referente a los logros alcanzados, según se da a conocer en la presente invención, para su ejecución, pueden utilizarse los anticuerpos monoclonales, así como los anticuerpos policlonales, de la forma que éstos se han hecho crecer en conejos. No obstante, y de una forma evidente, pueden también utilizarse anticuerpos policlonales, procedentes de diferentes especies, tales como, por ejemplo, ratas o conejillos de indias. Puesto que, los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualesquiera cantidades requeridas, con unas propiedades constantes, éstos representan unas herramientas de trabajo ideales, en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. La generación y el uso de anticuerpos monoclonales a la seprasa, en un procedimiento en concordancia con la presente invención, representan, respectivamente, todavía otras formas preferidas de representación. Los ejemplos preferidos de los anticuerpos apropiados para la detección de la seprasa, se encuentran descritos en Piñeiro – Sánchez et al., mencionado anteriormente, arriba, tales como, por ejemplo, los anticuerpos D8, D28 y D43.

25 Para los efectos de medición de un panel de marcadores en concordancia con la presente invención, se procede a incubar un alícuoto de la muestra obtenida, procedente de un individuo, con un agente de unión específico para los diferentes marcadores del panel de marcadores, bajo unas condiciones que sean apropiadas, para la formación de un complejo de agente de unión y marcador. Tales tipos de condiciones, no necesitan ser especificadas, debido al hecho de que, la persona experta en el arte especializado de la técnica, puede fácilmente identificar, sin ningún esfuerzo inventivo, tales tipos de condiciones apropiadas de incubación. La cantidad del complejo de agente de unión y marcador, se mide y se utiliza, en la valoración del cáncer, de una forma preferible, del CRC. Tal y como podrá apreciarse por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, existen numerosos procedimientos para medir la cantidad de complejo específico de agente de unión y el marcador, todos ellos descritos en detalle, en libros de texto relevantes (compárese, por ejemplo, con Tijssen P., mencionado anteriormente, arriba, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

40 En el caso en el que, el marcador de interés, sea un anticuerpo o un auto-anticuerpo se encuentran entonces a disposición varios procedimientos de detección, con los cuales se encuentra plenamente familiarizada, la persona experta en el arte especializado de la técnica. Los procedimientos no limitativos y preferidos utilizados en la detección de los anticuerpos, o dado el caso, de los auto-anticuerpos, son los consistentes en el procedimiento de ensayo sándwich, indirecto, o el procedimiento sándwich de doble antígeno (DAGS – [del inglés, double-antigen-sandwich method]-). En el procedimiento sándwich indirecto el (auto-)anticuerpo (primer anticuerpo), se encuentra unido al (auto-)antígeno del primer anticuerpo. En un procedimiento del tipo DAGS, el ensayo, se establece para proporcionar dos antígenos, comprendiendo, cada uno de ellos, un epítipo para el (auto-)anticuerpo, en donde, uno de los dos antígenos, se encuentra unido a una fase sólida, o éste es capaz de unirse a una fase sólida, y en donde, el segundo antígeno, se encuentra marcado de una forma susceptible de poderse detectar. En el caso en el que, el (auto-)anticuerpo se encuentre presente éste creará un puente, el cual puenteará el primer y el segundo antígeno, y así, de este modo, el complejo formado, podrá detectarse / medirse.

55 En una forma preferida de presentación, la presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el CRC, in vitro, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de seprasa, y la utilización de la concentración determinada, en la valoración del CRC.

60 En una forma preferida adicional de presentación, la presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el CRC, in vitro, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de seprasa, y de por lo menos de anti-p53, de osteopontina, o de ferritina, la combinación de la(s) concentración(es) y / o la(s) actividad(es) determinada(s), y la utilización del valor combinado, en la valoración del CRC.

65 Los inventores de la presente invención, han sido capaces, de una forma sorprendente, de detectar un concentración y / o actividad disminuidas del marcador de seprasa, en un significativo porcentaje de muestras derivadas de pacientes con cáncer de colon. De nuevo, de una forma sorprendente, éstos han sido capaces de demostrar el hecho de que, la concentración y / o actividad disminuidas de seprasa, en tal tipo de muestra obtenida de procedencia de un individuo, puede utilizarse en la valoración del CRC. De una forma todavía más sorprendente,

éstos han sido capaces de demostrar el hecho de que, la concentración y / o actividad disminuidas de seprasa, en tal tipo de muestra obtenida de procedencia de un individuo, puede combinarse con por lo menos una medición de anti-p53, ferritina y / u osteopontina, y utilizarse en la valoración del CRC.

5 El escenario ideal para la diagnosis, sería una situación, en donde, un evento o proceso individual, causaría la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, la diagnosis correcta, puede ser muy dificultosa, especialmente, cuando, la etiología de la enfermedad, no se entiende en su totalidad, tal como es el caso para muchos tipos de cáncer, tal como, por ejemplo, el CRC. Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, ningún marcador bioquímico, es un diagnóstico con un porcentaje del 100 % de especificidad y, al mismo tiempo, con un porcentaje del 100 % de sensibilidad, para una enfermedad multifactorial dada, como, por ejemplo, para el CRC. Más bien, los marcadores bioquímicos, tales como, por ejemplo, los consistentes en los CYFRA 21-1, ó el CEA, o tal y como se muestra aquí, ciertas combinaciones de marcadores, las cuales comprendan la seprasa, pueden utilizarse para valorar, con una cierta probabilidad, o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, la ausencia, o la gravedad de una enfermedad. Así, por lo tanto, en la diagnosis clínica de rutina, generalmente, se consideran varios síntomas y marcadores biológicos, conjuntamente, en la diagnosis, el tratamiento y el gobierno y control de la enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos, pueden determinarse individualmente o, en una forma preferida de la presente invención, éstos pueden medirse simultáneamente, mediante la utilización de un chip o de la tecnología de matrices (arrays) a base de cuentas. Las concentraciones de los biomarcadores, se combinan, entonces, para la interpretación.

En la valoración del cáncer del RCR, el marcador de seprasa, o un panel el cual comprenda la seprasa y por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en anti-p53, ferritina, y osteopontina, será ventajoso, en uno o más de los siguientes aspectos: exploración de rastreo; adyuvante de diagnóstico; prognosis; seguimiento de control de la terapia tal como la quimioterapia, radioterapia, e inmunoterapia.

Exploración de rastreo:

30 La exploración de rastreo, se define como la aplicación sistemática de un test de ensayo para identificar individuos, tales como, por ejemplo, individuos de riesgo, para los indicadores de una enfermedad, tal como, por ejemplo, la presencia de un cáncer. De una forma preferible, la población de exploración de sondeo, se encuentra compuesta por individuos que se conocen como encontrándose en un riesgo mayor, con respecto al riesgo medio, de cáncer. Así, por ejemplo, una población de exploración de rastreo, para CRC, puede encontrarse compuesta por individuos los cuales se conoce que tienen un mayor riesgo, que el riesgo medio, para el CRC, tales como las personas de 45 años de edad y por encima, o de 50 años de edad y por encima, o con una historia familiar de CRC.

En una forma preferida de presentación de la presente invención, el fluido corporal, tal como la sangre entera, el suero, o el plasma, es el que se utiliza, como muestra, en la exploración de rastreo para el cáncer colorrectal.

40 Para muchas enfermedades, nunca, ningún marcador bioquímico, en la circulación, cumplirá con los criterios de sensibilidad y de especificidad requeridos para los propósitos de exploración de rastreo. Esto parece ser también ser cierto para el cáncer y, de una forma particular, para el cáncer de colon. Debe esperarse el hecho de que deberá utilizarse un panel de marcadores el cual comprenda una pluralidad de marcadores, en la exploración de rastreo para el cáncer. Los datos establecidos en la presente invención, indican el hecho de que el marcador de seprasa, de una forma preferible, conjuntamente con un marcador consistente en anti-p53, ferritina, y osteopontina, formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado para los propósitos de exploración de rastreo para el CRC. La presente invención, se refiere, por lo tanto, al uso de la seprasa, como un marcador de un panel de marcadores del CRC, tal como, por ejemplo, un panel de marcadores que comprenda la seprasa, conjuntamente con un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p-53, la ferritina y la osteopontina, para los propósitos de la exploración de rastreo del RCR. Con referencia a la forma preferida de presentación de exploración de rastreo para el CRC, la presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprenda la seprasa, y el CYFRA21-1, ó un panel de marcadores, el cual comprenda la seprasa el CEA, o un panel de marcadores, el cual comprenda la seprasa y uno o más marcadores seleccionados de entre el grupo consistente en el anti-p53, la ferritina, la osteopontina, el CYFRA21-1 y el CEA.

Adyuvante de diagnóstico:

60 Los marcadores, pueden ser de ayuda tanto para la diagnosis diferencial de una enfermedad benigna o, respectivamente, maligna, en un órgano particular, ayudando a distinguir entre diferentes tipos histológicos de tumor, o para establecer unos valores de línea de base de los marcadores, antes de la cirugía.

65 Hoy en día, los procedimientos importantes que se utilizan en la detección del cáncer, son los consistentes en las exploraciones de radiología y / o de tomografía computerizada (CT) (colonoscopia virtual). Las pequeñas regiones de tejido sospechoso, pueden visualizarse, mediante el empleo de estos procedimientos. No obstante, muchas de estas regiones, - más de un porcentaje del 90 %, con la CT, representan cambios de tejidos benignos, y únicamente

una minoría de los ganglios, representan tejido canceroso. El uso de un panel de marcadores, el cual comprenda seprasa y un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la ferritina y la osteopontina, puede ser de ayuda en la diferenciación de regiones benignas, con respecto a las regiones malignas.

5 Puesto que, el marcador consistente en la seprasa, como marcador individual, puede ser superior a otros marcadores, tales como, por ejemplo, en el caso del CRC, los consistentes en CEA o el CYFRA21-1, debe esperarse el hecho de que, la seprasa, sola, conjuntamente con otros marcadores preferidos, tal y como se describen en la presente invención, se utilizarán como un adyuvante de diagnóstico, especialmente, procediendo a establecer un valor de línea de base, antes de la cirugía. La presente invención, se refiere así, de este modo, al uso
10 de la seprasa o de combinaciones de marcadores, las cuales comprenden la seprasa, para establecer un valor de línea de base, antes de la cirugía, para el cáncer.

Prognosis:

15 Los indicadores de prognosis, pueden definirse como aspectos o rasgos distintivos clínicos, patológicos, o bioquímicos de pacientes afectados de cáncer y de sus tumores, aspectos éstos, los cuales predicen, con una cierta probabilidad, el desenlace o resultado de la enfermedad. Su uso principal, es el consistente en ayudar a planificar, racionalmente, el gobierno y control de la enfermedad, es decir, el evitar un tratamiento deficiente de la enfermedad agresiva y un tratamiento deficiente de las enfermedades indolentes o no dolorosas, respectivamente.

20 Ya que, un panel de marcadores en concordancia con la presente invención, contribuye de una forma significativa a la diferenciación de los pacientes afectados de CRC, con respecto a los controles sanos, debe esperarse el hecho de que, éste, ayudará en la valoración de la prognosis, en pacientes que sufren del CRC. El nivel preoperatorio de seprasa, se combinará, con la mayor probabilidad, con uno o más marcadores adicionales, distintos, para el CRC y / o el sistema de clasificación por etapas TNM. En una forma preferida de presentación, un panel de marcadores en concordancia con la presente invención, se utiliza en la prognosis de los pacientes con CRC.
25

Seguimiento de control de quimioterapia:

30 Diversos informes reportados, han descrito el uso del CEA, en el seguimiento de control del tratamiento de pacientes con LC (véase, a dicho efecto, por ejemplo, Fukasawa T. et al., Cancer & Chemotherapy (1986) 13:1862-1867) ó cáncer colorrectal respectivamente. La mayor parte de estos estudios, eran retrospectivos, no aleatorios, y contenían un reducido número de pacientes. Tal y como es el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios con CEA, sugerían el hecho de que: a) los pacientes con una disminución en los niveles de CEA, mientras recibían quimioterapia, tenían, generalmente, un mejor desenlace o resultado, que aquéllos pacientes cuyos niveles de CEA, fracasaron en cuanto a lo referente a su descenso y b), para casi la totalidad de los pacientes, los incrementos en los niveles de CEA, se encontraban asociados con una progresión de la enfermedad.
35

40 Se espera el hecho de que, el panel de marcadores para el CRC en concordancia con la presente invención, a saber, un panel de marcadores el cual comprenda la seprasa, será por lo menos tan bueno, como marcador para el seguimiento de control de la quimioterapia, en el CRC, como lo es el CEA. La presente invención, por lo tanto, se refiere, también, a un panel de marcadores, el cual consista en el anti-p53, la ferritina y / o la osteopontina, en el seguimiento de control de los pacientes afectados de cáncer, de una forma preferible, de pacientes afectados de CRC, que se estén tratando con quimioterapia. En el seguimiento y control de la terapia, en una forma de presentación, las mediciones para las seprasa y para por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la ferritina y / o la osteopontina y, de una forma opcional, CYFRA 21-1 y / o CEA, se combinarán y se utilizarán en el seguimiento de control de la terapia del CRC.
45

Seguimiento:

50 Una gran porcentaje de pacientes con CRC, los cuales experimentaron una resección quirúrgica, enfocada a una eliminación completa del tejido canceroso, desarrollaron, posteriormente, enfermedad recurrente o metastásica. La mayoría de estas recaídas, acontecen dentro los primeros 2 – 3 años, después de la cirugía. Puesto que, la enfermedad recurrente / metastásica es invariablemente fatal, si ésta se detecta demasiado tarde, se han realizado considerables investigaciones, enfocadas a la detección de recaída del cáncer, en una etapa temprana y, así, de este modo, potencialmente tratable.
55

60 Por consiguiente, muchos pacientes afectados de cáncer, tales como, por ejemplo, pacientes afectados de CRC, experimentan un programa de seguimiento de control postoperatorio, el cual de una forma frecuente, incluye el seguimiento de control con CEA. Así, de este modo, el seguimiento de control de pacientes con CRC, después de la cirugía, es no de los sectores más importantes de uso, para un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad de la seprasa, en los pacientes con CRC investigados, es probable que, la seprasa sola, o en combinación con uno o más marcadores adicionales distintos, sea de gran ayuda en el seguimiento de pacientes afectados de CRC, especialmente de pacientes afectados de CRC, después de la cirugía. El uso de un panel de marcadores que comprenda la seprasa, y uno o más marcadores adicionales distintos, del CRC, en el seguimiento de los pacientes con CRC, representa una forma de presentación adicionalmente preferida de la presente invención.
65

Una forma de presentación adicionalmente preferida de la presente invención, se refiere al uso de un panel de marcadores, el cual comprenda la seprasa, y por lo menos un marcador seleccionado de entre grupo consistente en el anti-p53, la ferritina y / o la osteopontina, en el seguimiento de control de los pacientes con CRC.

5 La presente invención, se refiere, también al uso de la seprasa en la valoración del CRC.

Tal y como se ha discutido anteriormente, arriba, ciertas formas preferidas de presentación de la presente invención, se refieren a los valores de medición para la seprasa y para por lo menos un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la ferritina, y / o la osteopontina, a la combinación de estos valores de medición, y al uso de los valores combinados en la valoración del CRC.

Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, existen varias forma de usar las mediciones de dos o de más marcadores, con objeto de mejorar la cuestión de diagnóstico la cual se encuentra bajo investigación. En un método propuesto, bastante sencillo, pero, no obstante, a menudo efectivo, se asume un resultado positivo, si una muestra, es positiva, para por lo menos uno de los marcadores investigados. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando se procede a la diagnosis de una enfermedad infecciosa, tal como el SIDA.

No obstante y de una forma frecuente, se procede a evaluar la combinación de marcadores. De una forma preferible, los valores medidos para los marcadores de un panel de marcadores, como, por ejemplo, para la seprasa y el anti-p53, se combinan matemáticamente, y, el valor combinado, se correlaciona con la cuestión de diagnóstico subyacente. Los valores de los marcadores, pueden combinarse mediante cualquier estado apropiado del procedimiento matemático. Los procedimientos que son bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores, a un enfermedad, emplean procedimientos tales como los consistentes en el análisis discriminario (DA), (a saber, DA lineal, DA de los cuadrados, DA regularizado), procedimientos de Kernel (a saber, SVM), Procedimientos no paramétricos (a saber, clasificadores o algoritmos del vecino más próximo k), PLS (Mínimos cuadrados parciales (PLS, del inglés Partial Least Squares), Procedimientos basados en árboles de decisión (a saber, la Regresión logística, los procedimientos del tipo CART, los procedimientos aleatorios de bosques de decisión – Random Forest Method -, los procedimientos de Boosting / Bagging), los Modelos lineales generalizados (a saber, la Regresión logística), los procedimientos a base de componentes principales (a saber, SIMCA), Modelos aditivos generalizados, Procedimientos basados en la lógica difusa, Procedimientos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, no tendrán problema alguno en la selección de un procedimiento apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. De una forma preferible, el procedimiento apropiado, es el consistente en correlacionar la combinación de marcadores de la invención, como, por ejemplo, a la ausencia o la presencia del CRC, se selecciona de entre los procedimientos consistentes en el análisis discriminante (DA)(a saber, el análisis discriminante regularizado, lineal, de los cuadrados), procedimientos de Kernel (a saber, SVM), Procedimientos no paramétricos (a saber, clasificadores o algoritmos del vecino más próximo k), PLS (Mínimos cuadrados parciales (PLS, del inglés Partial Least Squares), Procedimientos basados en árboles de decisión (a saber, la Regresión logística, los procedimientos del tipo CART, los procedimientos aleatorios de bosques de decisión – Random Forest Method -, los procedimientos de Boosting / Bagging), o los Modelos lineales generalizados (a saber, la Regresión logística). Los detalles referentes a estos procedimientos estadísticos, se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., et al, J. of Computational and Graphical Statistics, - Estadísticas gráficas y de computación -, 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H. , J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, - Los elementos del aprendizaje estadístico -, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., Stone, C. J. (1984) Classification and regression trees, - Clasificación y árboles de regresión -, California; Wadsworth; Breiman, L., Random Forests, - Procedimientos aleatorios de bosques de decisión -, Machine Learning, 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, - La evaluación estadística de tests de ensayo médicos, para la clasificación y la predicción -, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); y Duda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, - Clasificación de modelos patrón -, Wiley Interscience, 2ª Edición (2001).

Una forma preferida de presentación de la presente invención, es la consistente en el uso de un corte multivariante optimizado, para la combinación subyacente de marcadores biológicos, y proceder a la discriminación del estado A, con respecto al estado B, como por ejemplo, la discriminación de enfermo, con respecto a sano. En este tipo de análisis, los marcadores, ya no son independientes, sino que éstos, forman un panel de marcadores.

La precisión de un procedimiento de diagnóstico, se describe, de la mejor forma, por mediación de sus características operativas del receptor (ROC – [del inglés receiver-operating characteristics]–)(véase, especialmente, a dicho efecto, Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC, es un gráfico con todos los pares de sensibilidad / especificidad resultantes de variar de una forma continua el umbral de decisión de rango entero de los datos observados.

Los resultados clínicos de un test de ensayo de laboratorio, depende de su precisión de diagnóstico, o de la capacidad de clasificar sujetos de una forma correcta, en grupos clínicamente relevantes. Las mediciones precisas de diagnóstico de los tests de ensayo, capacitan para distinguir, de una forma correcta, dos condiciones diferentes

de los sujetos investigados. Tales tipos de condiciones son, por ejemplo, la salud o la enfermedad, o enfermedad benigna con respecto a enfermedad maligna.

5 En cada caso, el gráfico ROC, representa el solapado entre dos distribuciones, procediendo a trazar el gráfico de la sensibilidad con respecto a, $1 -$ la especificidad del rango completo de los umbrales de decisión. En el eje de las y, se encuentra la sensibilidad o fracción positiva cierta [definida como (número de resultados del test de ensayo positivos, verdaderos) / (número de resultados del test de ensayo positivos, verdaderos + número de resultados del test de ensayo negativos, falsos)]. Éste se ha referenciado, también, como siendo positivo, en presencia de una enfermedad o condición. Éste se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje de las x, se encuentra la fracción positiva falsa, ó $1 -$ la especificidad [definida como (número de resultados del test de ensayo positivos, falsos) / (número de resultados del test de ensayo negativos, verdaderos + número de resultados del test de ensayo positivos, falsos)]. Éste es un índice de la especificidad y éste se calcula, enteramente, a partir del subgrupo no afectado. Debido al hecho de que las fracciones positivas verdaderas y falsas, se calculan enteramente por separado, mediante la utilización de los resultados de los tests de ensayo, procedentes de los dos subgrupos diferentes, el gráfico ROC, representa un par sensibilidad / $1 -$ especificidad, correspondiente a un umbral particular de decisión. Un test de ensayo con una discriminación perfecta (sin solapado en las dos distribuciones de resultados), tiene un gráfico ROC el cual pasa a través de la esquina superior izquierda, en donde, la fracción positiva verdadera, es del un 1,0 % ó de un 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción positiva falsa, es 0 (especificidad perfecta). El registro teórico para un test de ensayo, sin ninguna discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos), es una línea en diagonal, a 45° , desde la esquina inferior izquierda, a la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos, se encuentran entre estos dos extremos. (Si el gráfico ROC se encuentra completamente por debajo de esa diagonal a 45° , esto se remedia fácilmente, procediendo a invertir el criterio de "positividad" de "mayor de", por "menor de" o viceversa). Cualitativamente, cuanto más cercano se encuentra el gráfico, a la esquina superior izquierda, mayor es la precisión total del test de ensayo.

25 Una forma preferida de cuantificación la precisión del diagnóstico de un test de ensayo de laboratorio, es la consistente en expresar su resultado mediante un número individual. Un parámetro total de este tipo, es por ejemplo el denominado "error total" o, de una forma alternativa, "área bajo la curva = AUC". La medición global más usual, es el área que se encuentra bajo el gráfico ROC. Por convención, éste área, es siempre $\leq 0,5$ (en el caso en que no lo sea, se puede proceder a invertir la norma de decisión, para realizarlo de este modo. los valores, se encuentran comprendidos dentro de un rango situado entre 1,0 (separación perfecta del los valores del test de ensayo, de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente de los dos grupos de test de ensayo). El área, no depende únicamente de una porción particular del gráfico, tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad a un 90 % de especificidad, sino del gráfico en su totalidad. Esto es una expresión descriptiva, cuantitativa, de cuán cercano es el gráfico ROC, con respecto al que es perfecto (área = 1,0).

40 En una forma preferida de presentación de la presente invención, ésta se refiere a un procedimiento para mejorar la precisión de diagnóstico para el CRC, versus controles sanos, mediante la medición, en una muestra, de la concentración de por lo menos la seprasa y un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la ferritina y / o la osteopontina, respectivamente, combinando matemáticamente las concentraciones determinadas, y correlacionando el valor combinado a la presencia o ausencia de CRC, resultando, la mejora, en que se clasifican correctamente más pacientes que están en riesgo de sufrir de CRC o que están afectados de CRC, versus controles sanos, al compararse con una clasificación basada en cualquier marcador individual investigado solo.

45 En una forma preferida de presentación en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores seprasa y un marcador seleccionado de entre el grupo consistente en el anti-p53, la ferritina y / o la osteopontina, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la valoración del CRC.

50 En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores seprasa y CYFRA21-1, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la valoración del CRC.

55 En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores seprasa y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la valoración del CRC.

60 En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se combinan por lo menos los valores de medición para los biomarcadores seprasa, CEA, anti-p53 y ferritina, para la valoración de la CRC.

En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se combinan por lo menos los valores de medición para los biomarcadores seprasa, CEA, anti-p53 y osteopontina, para la valoración de la CRC.

En un procedimiento preferido en concordancia con la presente invención, se determinan por lo menos, los resultados de medición para la seprasa, el CEA, el anti-p53, el CYFRA1-21, y la osteopontina, éstos se combinan matemáticamente y, esta combinación de marcadores, se usa en la valoración del CRC.

5 En un procedimiento preferido en concordancia con la presente invención, se determinan por lo menos, los resultados de medición para la seprasa, el CEA, el anti-p53, el CYFRA1-21, y la ferritina, éstos se combinan matemáticamente y, esta combinación de marcadores, se usa en la valoración del CRC.

10 En un procedimiento adicionalmente preferido en concordancia con la presente invención, se determinan por lo menos, los resultados de medición para la seprasa, el CEA, el anti-p53, el CYFRA1-21, la osteopontina y la ferritina, éstos se combinan matemáticamente y, esta combinación de marcadores, se usa en la valoración del CRC.

15 Los ejemplos que se facilitan a continuación, se proporcionan con objeto de ayudar a entender la presente invención, cuyo auténtico alcance, se establece en las reivindicaciones anexas. Se entenderá el hecho de que pueden realizarse modificaciones, en los procedimientos expuestos, sin apartarse del espíritu de la invención.

Descripción de las figuras

Figura 1 Diagrama de flujo de los pacientes seleccionados en el estudio

Figura 2 Esquema para la optimización de algoritmos

Figura 3 Selección de marcadores en validación cruzada. La figura 3, muestra el hecho de que, en 100 ejecuciones estadística, ambos, la seprasa y el CEA, se seleccionan mediante el procedimiento estadístico, cada uno de ello, y cada vez, y que, la ferritina y la OPN, se seleccionaron 99 y 98 veces, respectivamente.

Ejemplo 1

Espécimen clínico

30 Se procedió a recolectar las muestras de suero, prospectivamente, en dos estudios de múltiples centros europeos. El primer estudio, reunía a pacientes en unidades de gastroenterología, en una población de exploración de rastreo de riesgo medio, los cuales experimentaron un chequeo preventivo mediante colonoscopia. Se procedió a realizar una colonoscopia a cada participante, y en los centros participativos, utilizándose una preparación y una sedación, en cada lugar. Se procedió a recolectar muestras de suero, poco tiempo antes de que se realizara la colonoscopia. Se procedió al registro del tamaño y la localización de cada lesión. Los expertos en patología, examinaron cada espécimen de resección quirúrgica, "in situ", con objeto de determinar la diagnosis y la etapa respectiva. Debido a la baja incidencia de un porcentaje de aproximadamente un 0,05 % de pacientes con CRC, entre la población de exploración de rastreo preventiva, los pacientes afectados de cáncer, se reunieron en un segundo estudio prospectivo, en diferentes unidades quirúrgicas. En este estudio, se procedió, así mismo, a recolectar muestras de suero, antes de la cirugía o de la colonoscopia. La diagnosis del cáncer colorrectal, se confirmó, mediante la clasificación patológica por etapas, de cada paciente, por parte de los expertos en patología, en cada lugar. Se procedió a revisar los protocolos de investigación, para ambos estudios, y éstos se aprobaron, mediante comités éticos apropiados, y todos los participantes, entregaron un consentimiento escrito mediante formulario.

45 Se procedió a recopilar las muestras clínicas procedentes de ambos estudios de múltiples centros, para la evaluación de los marcadores anteriormente mencionados, arriba, (véase la figura 1), dando como resultado un cohorte de control "A" y un cohorte de control "B", respectivamente, a saber:

A: Cohorte de control, con 266 pacientes. (No se incluyeron, el estudio del cohorte de control, pacientes con adenoma o enfermedades inflamatorias del intestino).

50 **B:** Cohorte con CRC, con 301 pacientes con cáncer colorrectal por escrito en las muestras de suero,

Recolección de sangre /suero

55 Se procedió a introducir muestras de sangre extraída, al interior de un tubo de suero, y se dejó que ésta coagulase, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 1 hora, y hasta 2 horas, a la temperatura ambiente. Después de haber procedido a la centrifugación, el sobrenadante (suero), se congeló a una temperatura de - 25 °C, en alícuotos de 1 ml, y se procedió a su transferencia, dentro de un transcurso de tiempo de dos semanas, a congelador, a una temperatura de - 70 °C. Antes de proceder a su medición, las muestras de suero, se descongelaron, y se re- alícuotaron, en volúmenes más pequeño, a afectos de conveniencia, y éstas se volvieron a congelar. Las muestras, se descongelaron, entonces, inmediatamente antes del análisis. Así, por lo tanto, se procedió a congelar cada muestra del conjunto, y a descongelarla, únicamente dos veces, antes del análisis.

Ejemplo 2

65 Inmunoensayos para la detección de marcadores tumorales

2.1 Ensayos Roche Elecsys®

Se procedió a adquirir los equipos a modo de kit del tipo Elecsys®, para los siguientes marcadores tumorales: CEA, CA 15-3, CA 19-9, CA125, CA 72-4, Ferritina, β -hCG, NSE, AFP y CYFRA21-1 (Citoqueratina-19). Todos los ensayos, se llevaron a cabo en concordancia con el sistema Elecsys® 2010 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Las concentraciones medidas mediante el instrumento, se utilizaron para calcular / generar, los datos de AUC, los cuales se muestran en la Tabla 1.

2.2 Ensayos en placa de microtitulación

Se procedió a desarrollar ensayos de microtitulación, internos, para los marcadores seprasa, osteopontina y anti-p53.

2.2.1 Osteopontina (OPN)

Para la captura y la detención del antígeno, se utilizaron dos anticuerpos diferentes. Estos anticuerpos, se seleccionaron para tener dos diferentes epítomos no solapados. Los epítomos de los dos anticuerpos utilizados, se encuentran entre el aminoácido 167 y el término carboxi de la secuencia de osteopontina (Kiefer, M.C. et al., Nucl. Acids Res. 17 (1989) 3306). Se procedió a biotilar un anticuerpo, y éste se utilizó como anticuerpo de captura. El segundo anticuerpo, se digoxigeniló. El anticuerpo digoxigenilado, se detectó, entonces, mediante la utilización de un anticuerpo secundario anti-DIG, apropiado.

Procedimiento de ensayo:

Se procedió a incubar placas de microtitulación de 96 pozos, con 100 μ l de anticuerpo policlonal anti-OPN, biotinilado, durante un transcurso de tiempo 60 minutos, a razón de 10 μ g / ml, en 10 mM de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, 1% BSA y 0,1% Tween 20. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces, con solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,4, y 0,1% Tween 20. Se procedió, a continuación, a incubar los pozos, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, bien ya fuere con una dilución en serie de la proteína recombinante, como antígeno estándar, o bien ya fuere con muestras de plasma diluidas, procedentes de los pacientes. Después de la unión de la OPN, las placas, se lavaron tres veces, con PBS, 0,1% Tween 20. Para la detección específica de la OPN unida, se procedió a incubar los pozos, con 100 μ l de anticuerpo policlonal anti-OPN, digoxigenilado, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a razón de 10 μ g / ml, en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1 % BSA, 0,9 % NaCl y 0,1% Tween 20. A continuación, se procedió a lavar las placas, tres veces, con objeto de retirar el anticuerpo no unido. En una etapa siguiente, los pozos, se incubaron con 20 mU / ml de conjugados POD anti-digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo 1633716), durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween 20. Se procedió, a continuación, a lavar las placas, tres veces, con el mismo tampón. Para la detección de los complejos antígeno – anticuerpo, se procedió a incubar los pozos, con 100 μ l de solución ABTS Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo 11685767) y se procedió a medir el valor de OD, después de un transcurso de tiempo de 30 – 60 minutos, a 405 nm, con un lector de ELISA.

2.2.2 anti-p53

La medición de los autoanticuerpos anti-p53, se llevó a cabo por duplicado, en un formato de test de ensayo indirecto, para las placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Se procedió a disolver dos péptidos biotinilados inmunoreactivos

Bi-p53(11-35): Biotin-EPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSP (SEQ ID NO: 2) y

Bi-p53 (41-60): Biotin-DDLMLSPDDIEQWFTEDPGP (SEQ ID NO: 3), respectivamente,

en PBS/ 0,05 % Tween 20 (50 ng / ml, cada uno de ellos), y se inmovilizaron en la placa de microtitulación recubierta con estreptavidina (100 μ l / pozo, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a una temperatura de 30° C, y mediante agitación). Después de haber procedido a lavar con PBS / 0,05 % Tween 20, se procedió a incubar las muestras diluidas de suero con contenido de autoanticuerpos, con la fase sólida (Dilución: 1 : 50 con PBS / 0,05 % Tween 20; Volumen: 100 μ l / pozo, 120 minutos, 30° C, mediante agitación). Después del lavado con PBS / 0,05 % Tween 20, se procedió al marcaje de la i.e. unida, con Conjugado anti-IgG-POD humano, en una dilución. (Dilución en PBS / 0,05 % Tween 20; 150 μ l / pozo; la incubación, se llevó a cabo durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a una temperatura de 30° C, bajo la acción de agitación). Después del lavado, el conjugado unido, se detectó mediante la utilización de tetrametilbenzidina / peróxido de hidrógeno (TMB), como substratos (200 μ l / pozo; 15 minutos; 30° C; mediante agitación). La reacción enzimática, se interrumpió, mediante la adición de 1 M ácido sulfúrico, a razón de 50 μ l / pozo. El color, se cuantificó fotométricamente, a 450 nm, mediante la utilización de 620 nm, como longitud de onda de referencia. Los valores de OD a 450 nm, se convirtieron en U / ml, mediante un curva estándar, mediante la utilización de un suero de cáncer, altamente positivo. 1000 U / ml de suero de cáncer diluido, proporcionaron aproximadamente 3,0 OD a 450 nm, en las condiciones de ensayo anteriormente descritas, arriba.

2.2.3 Seprasa

Como moléculas de unión específica a la seprasa, se utilizaron dos anticuerpos antiseprasa monoclonales, de la rata (clones D8 y D28) (Pineiro-Sanchez et al., M.L. et al., J. Biol. Chem. 12 (1997) 7595-7601).

Biotinilación de la IgG monoclonal de la rata:

Se procedió a llevar la IgG de la rata (clon D28) a 10 mg / ml, en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl. Se añadieron, por ml de solución de IgG, 50 µl de Biotin-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg / ml en DMSO). Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, a la temperatura ambiente, se procedió a cromatografiar la muestra, en Superdex 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl). Se procedió, posteriormente, a recolectar las fracciones las cuales contenían la IgG biotinilada.

Digoxigenilación de IgG monoclonal de la rata:

Se procedió a llevar la IgG de la rata (clon D%) a 10 mg / ml, en 10 mM NaH₂PO₄/NaOH, 30 mM NaCl, pH 7,5. Se añadieron, por ml de solución de IgG, 50 µl éster de N-hidroxisuccinimida del ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-aminocapróico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, No. de Cat. 1 333 054) (3,8 mg/ml in DMSO). Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, a la temperatura ambiente, se procedió a cromatografiar la muestra, en Superdex 200 (10 mM NaH₂PO₄/NaOH, pH 7,5, 30 mM NaCl). Se procedió, posteriormente, a recolectar las fracciones las cuales contenían la IgG biotinilada.

Se procedió a llevar a cabo un test de ensayo ELISA de seprasa, en muestras de suero y de plasma humano:

Para la detección de la seprasa en suero o plasma humano, se procedió a desarrollar un test de ensayo ELISA sándwich. Para la captura y la detección del antígeno, se utilizaron alícuotos anticuerpos monoclonales D28 anti-seprasa, conjugados con biotina, y D8 conjugado con digoxigenina (véase anteriormente, arriba).

Se procedió a mezclar las muestras (75 µl) con 150 µl de reactivo de anticuerpo, las cuales contenían, cada una de ellas, 0,375 µg de anticuerpos de D28-biotina y de D28-digoxigenina, en un tampón de incubación (el cual comprendía, entre otros aditivos, 40 mM fosfato, 200 mM tartrato sódico, 10 mM EDTA, 0,1 % Tween 20, y ajustado a un valor pH 7,4). Después de haber procedido a la incubación, durante un transcurso de tiempo de dos horas, se procedió a transferir 2 x 100 µl de la mezcla, al interior de pozos separados de una placa de microtitulación recubierta con estreptovidina, y se procedió a incubar, durante un transcurso de tiempo adicional de otra hora. Las placas, se lavaron tres veces con tampón de lavado (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20). En una etapa siguiente, los pozos, se incubaron con 30 mU / ml de conjugado HRP anti-digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, N° de Catálogo # 1633716) en Tampón de conjugado Universal ("Universal Conjugate Buffer" de la firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de catálogo # 11684825), durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, y a continuación, se procedió al lavado, de la misma forma que se ha descrito anteriormente, arriba. Se procedió, a continuación, a incubar los pozos, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, con 100 µl de solución de sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de catálogo # 12034425). Mediante la adición de ácido sulfúrico 2N (50 ml), se interrumpió el desarrollo de color y éste cambió, desde un color azul, a un color amarillo. Se procedió a medir el valor de OD, a 450 nm, con un lector ELISA (véase anteriormente, arriba).

Todas las incubaciones, se llevaron a cabo a la temperatura ambiente. Las muestras de suero o de plasma humano, se pre-diluyeron con tampón de incubación, a una concentración final correspondiente a un valor del 0,15 %. Para realizar la calibración, se procedió a utilizar un lote o partida, como patrón estándar. Éste se diluyó, mediante tampón de incubación, a una concentración final del 0,09 / 0,18 / 0,27 / 0,36 / 0,45 %, con objeto de realizar calibraciones con valores proporcionados de una forma arbitraria de 0,03 / 0,06 / 0,09 / 0,12 / 0,15 Unidades / ml, respectivamente.

La ecuación para la curva de equilibrio, se calculó mediante análisis de regresión lineal, y se utilizó para convertir el valor de lectura de la absorbancia, de un pozo, en el correspondiente valor de concentración. Este resultado, se multiplicó por el factor de pre-dilución, con objeto de obtener la concentración arbitraria de seprasa de la muestra respectiva, en sí misma.

Ejemplo 3

Resultados univariantes de todos los marcadores

Todas las muestras de suero, se asignaron, de una forma aleatoria, y todo se procedió a medir todos los marcadores, en nuestro laboratorio. Para cada ensayo en la placa de microtitulación, se procedió a valorar los marcadores, de una forma independiente, en diferentes alícuotos de la muestra, por duplicado, y la concentración media, se utilizó para los análisis adicionales. Por otro lado, se procedió a medir la totalidad de los parámetros de Elecsys®, a partir de un alícuoto individual, en una determinación individual.

Se procedió a calcular el valor de corte, para cada ensayo, en el control colectivo A, mediante el cálculo del cuantil correspondiente al 95 %, dando como resultado una especificidad del 95 %. El potencial de diagnóstico de los biomarcadores, se evaluó mediante, o bien ya se procediendo a calcular las curvas de las características operativas del receptor (ROC – [del inglés receiver-operating characteristics]–), o bien ya sea la sensibilidad clínica a la presente especificidad del 95% (véase la Tabla 1).

5

Tabla 1

Análisis ROC y sensibilidades de todos los marcadores individuales (30 CRC, 266 controles, a una especificidad del 95) %				
Marcador	Ensayo	AUC (%)	Sensibilidad de todas las etapas de UICC (%)	Sensibilidad de la etapas de UICC I – III (%)
CEA	Elecsys	77	43,9	30,9
CA 15-3	Elecsys	53	4,0	3,4
CA 125	Elecsys	56	17,6	10,3
CA 19-9	Elecsys	64	22,6	15,0
CA 72-4	Elecsys	66	20,6	12,9
CYFRA21-1	Elecsys	78	35,5	22,3
Ferritina	Elecsys	65	23,9	27,0
NSE	Elecsys	57	14,0	6,4
AFP	Elecsys	56	6,6	5,6
β-hCG	Elecsys	51	3,7	3,4
OPN	Roche-MTP	77	30,2	23,2
Anti-p53	Roche-MTP	57	20,0	18,8
Seprasa	Roche-MTP	79	42,4	45,4
S100 A12	Roche-MTP	69	20,3	12,9
HGF	MTP	70	30,4	24,7
TIMP-1	MTP	66	26,8	15,6
IL-6	MTP	74	30,6	23,6
IL-8	MTP	76	27,9	15,4

10

15

Algunos marcadores, mostraban un valor de AUC por encima del 70%, a saber, el CEA, el CYFRA21-1, la osteopontina, la seprasa y los marcadores de inflamación IL-6 e IL-8. Es importante el tomar debida nota en cuanto al hecho de que, la ferritina y la seprasa, se encontraban, ambas, regularizadas hacia abajo, en el CRC, mientras que, otros marcadores, en general, se encontraban incrementados, en los pacientes con CRC.

20

Con objeto de estimular la situación de exploración de rastreo, se procedió así mismo, también, a calcular las sensibilidades, para todas las etapas del cáncer, sin la etapa IV según la clasificación de la UICC. Éste cálculo, indica, de una forma clara, el hecho de que, los candidatos marcadores consistentes en la ferritina, el anti-p53 y la seprasa, no se encuentran influenciados mediante la eliminación de la etapa IV correspondiente a la clasificación de la UICC. Observando a la dependencia de la etapa de estos 3 marcadores, no se encontraron unas diferencias significativas. La seprasa y el anti-p3, respectivamente, revelaron la más altas sensibilidades en la etapa I de la clasificación según la UICC. Otros marcadores, se encuentran fuertemente influenciados mediante la etapa tumoral, y mostraron las sensibilidades más altas, para los pacientes, en la etapa IV, al como el CEA (véase la Tabla 2).

25

Tabla 2

Sensibilidades de los marcadores individuales para los pacientes en diferentes etapas del CRC, al 95 % de especificidad				
Marcador	Sensibilidad (%) UICC I	Sensibilidad (%) UICC II	Sensibilidad (%) UICC III	Sensibilidad (%) UICC IV
CEA	13,2	36,8	34,2	88,2
CA 19-9	11,3	16,2	17,1	48,5
CYFRA21-1	13,2	26,5	23,7	80,9
Ferritina	13,2	30,9	34,2	13,2
OPN	13,2	22,1	27,6	54,4
Anti-p53	16,0	17,9	15,8	24,2
Seprasa	36,0	49,3	51,3	31,8
S100 A12	9,4	13,2	13,2	45,6
HGF	18,9	23,5	25,3	50,0
TIMP-1	13,2	16,2	17,3	64,7
IL-6	13,2	30,9	19,7	54,4
IL-8	7,8	19,7	17,3	71,2

Ejemplo 4

20 Combinaciones de marcadores / análisis estadístico y resultados

Se procedió a utilizar la Regresión Logística Penalizada (PLR – [del inglés Penalized Logistic Regresión] -), como modelo matemático para las combinaciones de marcadores, según se implementa en el conjunto de herramientas R penalizada, del tipo “ - R-toolbox) "penalized" – ” (<http://cran.r-project.org/>). Se procedió a dividir el colectivo de muestras, de una forma aleatoria, en un conjunto de instrucción (2/3 de la muestras) y un conjunto de test de ensayo (1/3 de la muestras). Para la asignación de los pacientes a los dos conjuntos de muestra, se consideraron las variables tales como las consistentes en la edad, el sexo, el sitio de recolección, y la distribución de las etapas tumorales. La optimización de los algoritmos (a saber, la selección del tipo de penalización y su parámetro de penalización), se llevó a cabo mediante 100 ejecuciones, en el diseño de validación cruzada de Monte-Carlo, en el conjunto de instrucción.

En cada ejecución de validación cruzada de Monte-Carlo, se seleccionaron, de una forma aleatoria, dos tercios de todos los casos de CRC y de control, del conjunto de instrucción, como conjunto de sub-instrucción. Se procedió a aplicar la PLR, al conjunto de sub-instrucción, con objeto de generar una regla de diagnóstico. Se determinó un valor límite ó umbral, en las probabilidades de casos posteriores estimados, en los controles del conjunto de sub-instrucción, con objeto de lograr una especificidad aparente del 95 % ó del 98 %, para la regla de diagnóstico multivariante. Esta regla, se aplicó, a continuación, a tercio restante de los datos (sub-conjunto de test de ensayo), con objeto de estimar la sensibilidad y la especificidad de un umbral o valor límite dado. Este procedimiento, se repitió un número de 100 veces.

Un análisis íntimo de las ejecuciones individuales de la validación cruzada, reveló el hecho de que, en 100 ejecuciones estadísticas, ambos, la seprasa y el CEA, se seleccionaron mediante procedimiento estadístico cada uno de ellos y, cada vez, mientras que, la ferritina y la OPN se habían seleccionado 99 y 98 veces, respectivamente (véase la figura 3). El Cyfra 21 – 1 y el anti-p53, se seleccionaron 74 y 70 veces, respectivamente, mientras que, la totalidad de los otros marcadores sometidos a test de ensayo, se seleccionaron únicamente menos de 20 veces, o nunca se seleccionaron.

Todos los resultados multivariantes del colectivo con CRC y del colectivo de control, en el conjunto de instrucción, se reportan, por consiguiente, como sensibilidades medias de la validación cruzada. La regla de diagnóstico final y sus valores límite o umbral, se estudian, con el algoritmo optimizado, mediante la utilización de los datos de instrucción, y éstos se aplican al conjunto de test de ensayo, el cual se utiliza para la valoración de la regla de diagnóstico generada.

Tabla 3

Resultados de la mejor combinación de marcadores consistente en seprasa, CEA, ferritina, OPN, anti-p53 y CYFRA21-1.					
95 % de especificidad preajustada	Conjunto de instrucción			Conjunto de ensayo	
	Sensibilidad (%) Sub-conjunto de instrucción	Sensibilidad (%) Sub-conjunto de ensayo	Sensibilidad (%) Sub-conjunto de ensayo	Sensibilidad	Especificidad
Casos de CRC 0 - IV	75	71	95	71	96
Casos de CRC 0 - III	68	63	94	69	96
98 % de especificidad preajustada					
Casos de CRC 0 - IV	65	62	98	60	97
Casos de CRC 0 - III	59	54	98	53	98

* Mediana de los conjuntos de sub-instrucción ó los sub-tests de ensayo, procedentes de las ejecuciones de validez cruzada de Monte-Carlo.

- 5 Los resultados recopilados en la Tabla 3, muestran, claramente, el hecho de que, mediante la combinación de 6 marcadores, la sensibilidad, puede mejorarse de una forma significativa, en comparación con el mejor marcador individual de seprasa, sin ninguna pérdida de especificidad. Estos resultados en las muestras de suero, son comparables o mejores que los resultados obtenidos con un ensayo FOBT inmunológico (Morikawa T. et. al., Gastroenterology 2005; 129:422-428).
- 10 Con objeto de estimar la importancia de cada candidato marcador, en la regla de diagnóstico final, se procedió a valorar cada combinación teóricamente posible de estos marcadores. Para este propósito, se procedió a utilizar las muestras del conjunto de instrucción, y se calculó la sensibilidad de cada combinación de marcadores, básicamente de la misma forma que en la regla final, pero, sin embargo, encontrando el algoritmo únicamente con los datos del subconjunto de marcadores considerado. Se procedió a calcular la sensibilidad del carcinoma colorrectal (únicamente las etapas I a III de la enfermedad, según clasificación de la UICC, sin la etapa IV), para una especificidad preajustada del 95 % y el 98 %, respectivamente, en los datos de instrucción. Los valores absolutos de estas denominadas sensibilidades aparentes, se someten así, de este modo, a sobreadaptación, proporcionando, la diferencia de la "regla final" efectiva, con respecto a la sensibilidad efectiva, la firme percepción, de una forma susceptible de poderse interpretar, en cuanto a la importancia de los marcadores individuales, ya que ésta, toma
- 15
- 20 apropiadamente en consideración, la estructura de correlación de los marcadores.

Tabla 4

Resultados de las diferentes combinaciones de marcadores, en los tests de ensayo de instrucción							
Seprasa	CEA	Ferritina	Anti-p53	OPN	CYFRA 21-1	Sensib. (%) al 95 % de espec.	Sensib. (%) al 98 % de espec.
X						51,7	32,4
X	X					60,7	40,7
X		X				55,2	45,5
X			X			60,0	37,2
X				X		51,7	37,2
X					X	45,5	43,4
X	X	X	X	X	X	69,0	61,4
X	X	X	X	X		67,6	61,4
X	X	X	X		X	67,6	51,7
X	X	X		X	X	67,6	56,6
X	X		X	X	X	66,9	53,1
X		X	X	X	X	58,6	51,0
X	X	X	X	X	X	51,7	44,8

- 25 Los mejores resultados, pueden obtenerse mediante la combinación de los seis marcadores mencionados en la Tabla 4. Dejando un marcador fuera de la combinación de seis marcadores, la sensibilidad, desciende ligeramente, con la excepción del CYFRA21-1, a una especificidad preajustada del 98 %. Por otro lado, dejando el marcador más dominante, la seprasa, incluso la combinación de la totalidad de los otros cinco marcadores, conduce una sensibilidad comparable al que se ha logrado únicamente con la seprasa. Los datos recopilados en la Tabla 4,

muestran, también, el hecho de que, la mejor combinación de 2 marcadores, es dependiente del nivel de especificidad requerido. A un 95 % de especificidad, la mejor combinación de 2 marcadores, es la consistente en la seprasa + el CEA y en la seprasa + el anti-p53, mientras que, a una especificidad del 98 %, la combinaciones de la seprasa + el CEA, y de la seprasa + CYFRA21-1, son las más importantes. Resulta también obvio, a raíz de los datos presentados en la Tabla 4, el hecho de que, a un alto límite de especificidad del 98 %, son necesarios más marcadores, con objeto de obtener los mejores resultados, con respecto a una alta sensibilidad. Después de dejar fuera un marcador, del panel de seis marcadores, a una especificidad preajustada del 98 %, la disminución de la sensibilidad, es más alta, si se compara con el correspondiente descenso de un límite de especificidad ajustado del 95 %.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> Panel de marcadores para el cáncer colorrectal

<130> 25319 WO

<150> EP 07023897.7
<151> 2007-12-10

<150> EP 08017119.2
<151> 2008-09-29

<160> 3

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 766
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala
1 5 10 15

Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr
 20 25 30

ES 2 527 649 T3

Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
 35 40 45
 Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser
 50 55 60
 Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn
 65 70 75 80
 Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp
 85 90 95
 Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln
 100 105 110
 Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr
 115 120 125
 Thr Ala Ser Tyr Asp Ile Tyr Asp Leu Asn Lys Arg Gln Leu Ile Thr
 130 135 140
 Glu Glu Arg Ile Pro Asn Asn Thr Gln Trp Val Thr Trp Ser Pro Val
 145 150 155 160
 Gly His Lys Leu Ala Tyr Val Trp Asn Asn Asp Ile Tyr Val Lys Ile
 165 170 175
 Glu Pro Asn Leu Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Trp Thr Gly Lys Glu Asp
 180 185 190
 Ile Ile Tyr Asn Gly Ile Thr Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Val Phe
 195 200 205
 Ser Ala Tyr Ser Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Thr Phe Leu Ala
 210 215 220
 Tyr Ala Gln Phe Asn Asp Thr Glu Val Pro Leu Ile Glu Tyr Ser Phe
 225 230 235 240
 Tyr Ser Asp Glu Ser Leu Gln Tyr Pro Lys Thr Val Arg Val Pro Tyr
 245 250 255
 Pro Lys Ala Gly Ala Val Asn Pro Thr Val Lys Phe Phe Val Val Asn
 260 265 270

ES 2 527 649 T3

Thr Asp Ser Leu Ser Ser Val Thr Asn Ala Thr Ser Ile Gln Ile Thr
 275 280 285

Ala Pro Ala Ser Met Leu Ile Gly Asp His Tyr Leu Cys Asp Val Thr
 290 295 300

Trp Ala Thr Gln Glu Arg Ile Ser Leu Gln Trp Leu Arg Arg Ile Gln
 305 310 315 320

Asn Tyr Ser Val Met Asp Ile Cys Asp Tyr Asp Glu Ser Ser Gly Arg
 325 330 335

Trp Asn Cys Leu Val Ala Arg Gln His Ile Glu Met Ser Thr Thr Gly
 340 345 350

Trp Val Gly Arg Phe Arg Pro Ser Glu Pro His Phe Thr Leu Asp Gly
 355 360 365

Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile
 370 375 380

Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly
 385 390 395 400

Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr
 405 410 415

Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr
 420 425 430

Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu
 435 440 445

Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu
 450 455 460

Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr
 465 470 475 480

Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp
 485 490 495

Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln Met Pro Ser Lys
 500 505 510

ES 2 527 649 T3

Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe Trp Tyr Gln Met
 515 520 525

Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
 530 535 540

Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Thr Val Phe Arg
 545 550 555 560

Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val Ala
 565 570 575

Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met His
 580 585 590

Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu Asp Gln Ile Glu
 595 600 605

Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp Asn Lys Arg Ile
 610 615 620

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu
 625 630 635 640

Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
 645 650 655

Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly
 660 665 670

Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val
 675 680 685

Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His
 690 695 700

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser
 705 710 715 720

Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr
 725 730 735

Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr
 740 745 750

Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro
 755 760 765

ES 2 527 649 T3

<210> 2
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido Bi-p53(11-35)

<400> 2

Glu Pro Pro Leu Ser Gln Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu
1 5 10 15

Pro Glu Asn Asn Val Leu Ser Pro Leu
 20 25

<210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> péptido Bi-p53 (41-60)

<400> 3

Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu
1 5 10 15

Asp Pro Gly Pro
 20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para la valoración del cáncer colorrectal (CRC), in vitro, el cual comprende el proceder a medir, en una muestra de sangre entera, de suero, o de plasma, la concentración y / o la actividad de
- (a) un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste,
 - (b) anti-p53, osteopontina y / o ferritina,
 - (c) de una forma opcional, uno o más marcadores adicionales distintos para el CRC, y
 - (d), el uso del resultado de las mediciones combinadas de la etapa (a) y de la etapa (b), y de una forma opcional,
- 10 de la etapa (c), en la valoración del CRC, en donde, una concentración reducida para la seprasa, una concentración reducida para la ferritina, un concentración incrementada para el anti-p53, y una concentración incrementada para la osteopontina, es indicativa para el CRC.
- 15 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, se combinan por lo menos los resultados de medición para la seprasa y el anti-p53, para la valoración del CRC.
- 3.- El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, se combinan por lo menos los resultados de medición para la seprasa y la osteopontina, para la valoración del CRC.
- 20 4.- El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, se combinan por lo menos los resultados de medición para la seprasa y la ferritina, para la valoración del CRC.
- 5.- El procedimiento de la reivindicación 1, en donde, el opcionalmente uno o más marcadores adicionales distintos, se seleccionan de entre el grupo consistente en el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el CYFRA21-1.
- 25 6.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y 5, en donde, se combinan por lo menos los resultados de medición para la seprasa, el CEA, la osteopontina y la ferritina.
- 30 7.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde, se combinan por lo menos los resultados de medición para la seprasa, el CEA, el anti-p53, el CYFRA21-1, el CEA y la ferritina.
- 8.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 7, en donde, se procede a medir la concentración de un polipéptido de seprasa y / o fragmentos de éste y / o de complejos, los cuales comprenden seprasa y / o un fragmento de ésta.
- 35 9.- Uso, in vitro, de un panel de marcadores, el cual comprende por lo menos los resultados de medición para la seprasa y el anti-p53, para la valoración del CRC.
- 40 10.- Uso, in vitro, de un panel de marcadores, el cual comprende por lo menos los resultados de medición para la seprasa y la osteopontina, para la valoración del CRC.
- 11.- Uso, in vitro, de un panel de marcadores, el cual comprende por lo menos los resultados de medición para la seprasa y la ferritina, para la valoración del CRC.
- 45 12.- Uso, in vitro, de un panel de marcadores, el cual comprende por lo menos los resultados de medición para la seprasa, el CEA, el anti-p53, y la ferritina, para la valoración del CRC.
- 13.- Uso, in vitro, de un panel de marcadores, el cual comprende por lo menos los resultados de medición para la seprasa, el CEA, el anti-p53, el CYFRA21-1, el CEA y la ferritina, para la valoración del CRC.
- 50 14.- Un equipo, a modo de "kit", el cual comprende anticuerpos para la medición de los marcadores de las reivindicaciones 1 – 8 o para la medición de los paneles de marcadores en concordancia con los usos de las reivindicaciones 9 a 13.

Fig. 1

Diagrama de flujo para los pacientes seleccionados para el estudio

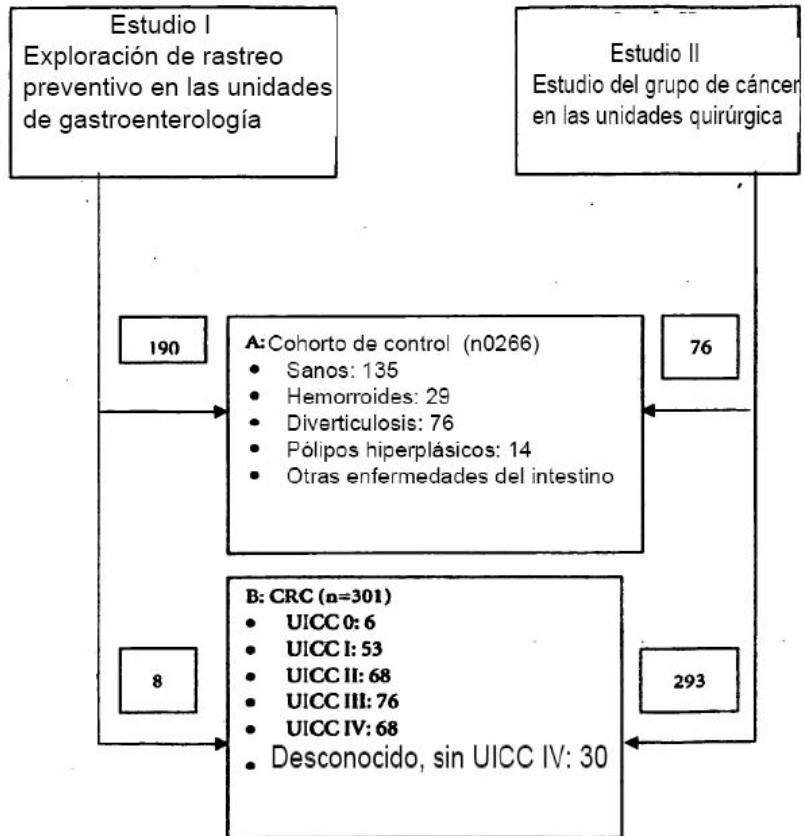


Fig. 2

Esquema para la optimización de algoritmos

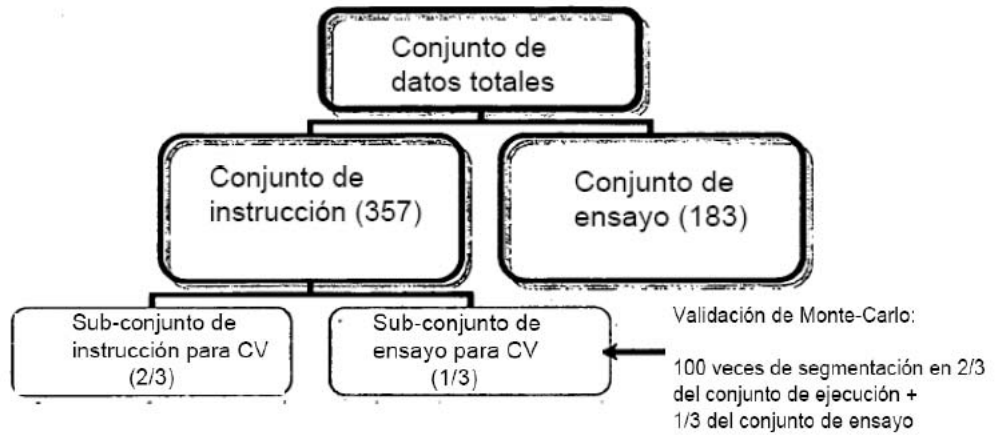


Fig. 3

