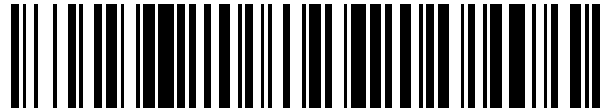


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 452**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.08.2003 E 03793149 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 1572225**

54 Título: **Fragmentos de trombospondina y usos de los mismos en ensayos clínicos para cáncer y generación de anticuerpos y otros agentes de unión**

30 Prioridad:

**23.08.2002 US 405494 P**

**21.04.2003 US 419462**

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

**10.04.2015**

73 Titular/es:

**W2 HOLDINGS, INC. (100.0%)**

**WIDENER BUILDING, SUITE 500 1339 CHESTNUT STREET**

**PHILADELPHIA, PA 19107, US**

72 Inventor/es:

**WILLIAMS, KEVIN JON**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 533 452 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

Fragmentos de trombospondina y usos de los mismos en ensayos clínicos para cáncer y generación de anticuerpos y otros agentes de unión

5

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a ensayos para los niveles sanguíneos de uno o más fragmentos de trombospondina como ensayo de diagnóstico para cánceres y otras enfermedades, el uso de dichos fragmentos y/o derivados de los mismos para generar anticuerpos específicos y otros agentes de unión y/o al uso como calibradores, competidores, y/o indicadores en un ensayo, y a los fragmentos en sí mismos.

10

### Antecedentes de la invención

La trombospondina (TSP), también conocida como TSP-1, es una glucoproteína multimérica compuesta por monómeros idénticos. Los monómeros migran a un peso molecular aparente de aproximadamente 185 kDa en geles electroforéticos de SDS-poliacrilamida en condiciones reductoras. El multímero predominante es un trímero, que migra a un peso molecular aparente de aproximadamente 450 kDa en geles no reductores. Los pesos moleculares por equilibrio de sedimentación son similares, en 135 kDa para monómeros y 420 kDa para trímeros. El peso molecular predicho a partir justo de la secuencia de restos aminoácido en el monómero es 127,524 Da, que no incluye contribuciones de glucosilación y  $\beta$ -hidroxilación. La glucoproteína trombospondina se produce por plaquetas y se libera tras la activación de las plaquetas desde  $\alpha$ -gránulos de plaquetas, junto con muchas otras proteínas, tales como factor del crecimiento derivado de plaquetas,  $\beta$ -tromboglobulina, fibronectina, fibrinógeno, y factor-4 de plaquetas (véase el Capítulo 1, "An introduction to the thrombospondins" en The Thrombospondin Gene Family por JC Adams, RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995, pág. 1-9, pero especialmente la pág. 2 ; y el Capítulo 3, "The secondary and tertiary structure of the thrombospondins," ibídem pág. 43-56, especialmente la Tabla 3.1). Se ha identificado un fragmento proteolítico N-terminal de trombospondina (véase Damas Conchi et al, Thrombosis and Haemostasis, Stuttgart, DE, vol. 86, Nº 3, pág. 887-893 (2001)), y tiene un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un fragmento de trombospondina encontrado en extractos celulares (véase Morandi et al, FEBS letters, vol. 346, nº 2-3, pág. 156-160, (1994)). Se sabe que la trombospondina está implicada en procesos biológicos tales como adhesión celular, proliferación y quimiotaxis. Los péptidos de trombospondina han demostrado inhibir la angiogénesis de la retina, y la proliferación de células endoteliales mesangiales y glomerulares (véanse Shafiee et al, Investigative ophthalmology & Visual Science, Assoc for Research in Vision and Ophthalmology, US, vol. 41, Nº 8, pág. 2378-2388 (2000) y Hugo Christian et al, Kidney International, vol. 55, Nº 6, pág. 2236-2249 (1999)), y se ha informado que diferentes fragmentos de trombospondina tienen diferentes efectos sobre la angiogenesis (véase Taraboletti et al, The FASEB Journal, vol. 14, Nº 12, pág. 1674-1676 (2000)). También se ha informado de que la trombospondina puede estar implicada en la progresión de tumores malignos y la trombospondina y fragmentos de la misma se han propuesto como agentes medicinales, por ejemplo para su uso en tratamiento de tumores (véanse el documento US 5.840.692 A, (Howard et al) y el documento US 5. 770. 563 A (Roberts et al)). Se ha informado de los fragmentos N-terminales de trombospondina como marcadores de enfermedad artrítica (véase el documento WO 98/07035 A (Ciba Geigy AG)). Además, se ha informado de que la trombospondina se expresa elevadamente en muchos tejidos malignos humanos y en el estroma y/o endotelio adyacente y se ha informado que está presente en niveles mayores que los normales en el plasma de pacientes con cáncer. (Por ejemplo, Qian y Tuszynski, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 212:199-207, 1996; de Fraipont F et al. Trends Mol. Med., 7: 401-407, 2001). Se ha informado de niveles plasmáticos elevados de trombospondina ligados a metástasis y estratificación de la enfermedad en cáncer (véase Yamashita et al, Cancer vol. 82, Nº 4, pág. 632-638 (1998), Kuroi et al, Int J Biol Markers, Vol. 16, Nº 1, pág. 5-26 (2001), Tuszynski et al, Thrombosis and Haemostatis, Vol. 67, Nº 6, pág. 607-611 (1992)).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

A pesar de lo anterior, como para cualquier ensayo de diagnóstico potencial, sería deseable aumentar la especificidad y la sensibilidad de dichos ensayos. Para ese fin, el presente inventor ha descubierto que la trombospondina está presente en la sangre y el plasma sanguíneo en cantidades relativamente pequeñas en comparación con los fragmentos de trombospondina, y este hallazgo es cierto en la sangre y plasma sanguíneo de pacientes con cáncer también. Este descubrimiento proporciona una base para las presentes invenciones referidas a nuevos ensayos de diagnóstico que son más específicos, más sensibles, más fácilmente calibrados, y en algunos casos distinguen estos fragmentos de trombospondina entre sí y de la propia trombospondina.

### Breve resumen de la invención

Son importantes aspectos de la invención métodos de diagnóstico para detectar o controlar el estado de un cáncer y que saben en la detección y cuantificación de fragmentos de trombospondina en fluidos corporales, especialmente plasma.

60

También se describen, y estrechamente relacionados a los métodos de diagnóstico, fragmentos de trombospondina que se detectan en el plasma, fragmentos de trombospondina que pueden usarse para inducir un anticuerpo de interés para su uso en un método de diagnóstico o que pueden usarse en un ensayo de diagnóstico de tipo

65

competitivo o no competitivo.

La invención proporciona un método de acuerdo con la reivindicación 1.

## 5 Fragmentos de trombospondina

En este documento se describe un fragmento de trombospondina purificado que se ha extraído de un fluido corporal, especialmente plasma, siendo dicho fragmento uno dentro de un intervalo de peso molecular seleccionado entre el grupo que consiste en 80 a 110 kDa, 40 a 60 kDa, y 20 a 35 kDa, donde el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro. Los usos de dichos fragmentos incluyen a) la inducción de un anticuerpo de interés, b) la inducción de un anticuerpo para un método de diagnóstico, c) el uso en un ensayo de diagnóstico de tipo competitivo, d) como molécula de referencia en un ensayo para un fragmento o fragmentos de trombospondina o trombospondinas de sujetos humanos, y e) la inmunización de un animal.

15 También se describe en este documento un polipéptido o polipéptido modificado, preparado por técnicas recombinantes y/o químicas, que tiene la estructura primaria idéntica que uno de dichos fragmentos purificados de trombospondina o una parte de los mismos. Dichas técnicas químicas incluyen, aunque sin limitación, glucosilación,  $\beta$ -hidroxilación, alquilación y reducción.

20 En realizaciones particulares, el peso molecular del fragmento es uno dentro de un intervalo de peso molecular seleccionado entre el grupo que consiste en 80 a 95 kDa, 47 a 53 kDa, y 27 a 33 kDa. Ejemplos específicos de pesos moleculares de fragmentos son 85, 90, 50, y 30 kDa. Preferiblemente, el fragmento es uno encontrado en plasma humano.

25 También se describe un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina o parte del mismo, siendo dicho fragmento uno que empieza entre el aminoácido I-165 (justo después del péptido N12/I) y V-263 (el inicio del dominio de homología de procolágeno), inclusive (es decir, inclusive I-165 y V-263), y acaba entre el aminoácido K-412 (el final de la región de unión a colágeno tipo-V presentada) e I-530 (el final del dominio de repeticiones tipo 1), inclusive. Se prefieren los fragmentos que empiezan entre N-230 y G-253, inclusive (en o cerca del inicio del dominio de enlaces disulfuro intercatenarios, I-241, que es primer resto cadena abajo [que significa hacia el extremo C-terminal de la proteína completa] de un sitio de escisión predicho para quimotripsina y/o una proteasa tipo quimotripsina), y finaliza entre V-400 y S-428, inclusive (en o cerca de un sitio de escisión por quimotripsina predicho, F-414, que cae dos restos después del final de la región de unión a colágeno tipo-V), siendo dicha parte de al menos 3 aminoácidos de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoácido de longitud, más preferiblemente de al menos 6 restos aminoácido).

35 Se describe en este documento un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina o parte del mismo, siendo dicho fragmento uno empieza entre el aminoácido I-165 (justo después del péptido N12/I) y V-263 (el inicio del dominio de homología de procolágeno), inclusive, y finaliza entre el aminoácido I-530 (el final de las repeticiones tipo 1) y R-733 (el final de la primera repetición tipo 3), inclusive. Preferiblemente dicho fragmento empieza entre N-230 y G-253, inclusive, y finaliza entre D-527 y S-551, inclusive, que está en o cerca de un sitio de escisión por quimotripsina predicho, F-539, en la primera repetición tipo 2; siendo dicha parte de al menos 3 aminoácidos de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoácido de longitud, más preferiblemente al menos 6 restos aminoácido).

45 También se describe un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina o parte del mismo, siendo dicho fragmento uno que empieza entre el aminoácido I-165 (justo después del péptido N12/I) y V-263 (el inicio del dominio de homología de procolágeno), inclusive, y finaliza el aminoácido R-792 (el final de la tercera repetición tipo 3) e Y-982 (el tercero de los sitios de escisión por quimotripsina predichos en el dominio C-terminal), inclusive. Preferiblemente dicho fragmento empieza entre N-230 y G-253, inclusive, y finaliza entre G-787 y V-811, inclusive, que está en o cerca de un sitio de escisión por quimotripsina predicho, Y-799, en la cuarta repetición tipo 3; siendo dicha parte de al menos 3 aminoácidos de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoácido de longitud, más preferiblemente al menos 6 restos aminoácido). Los pesos moleculares de la proteína aquí se computaron usando recursos computacionales convencionales (dichos recursos están disponibles, por ejemplo, en el sitio web de la Bioinformatics Organization, Inc., [http://bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](http://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html); véase Stothard, P. 2000. El paquete de programas de manipulación de secuencia: programas JavaScript para analizar y formatear proteínas y secuencias de ADN. BioTechniques 28: 1102-1104) y se ajustaron a la alza para asumir modificaciones post-traduccionales. Los sitios de escisión predichos para quimotripsina (y cualquier proteasa estrechamente relacionada) se identificaron usando herramientas disponibles en el servidor de proteómica ExPASy (Expert Protein Analysis System) del Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (Véase <http://us.expasy.org/cgi-bin/peptidecut-ter/peptidecutter.pl>) y se limitaron a sitios predichos de al menos un 80 % de probabilidad. Los usos de dichos fragmentos y partes incluyen, aunque sin limitación, la inducción y/o selección de un anticuerpo y/u otro agente de unión de interés en un método de diagnóstico y uso en un ensayo de diagnóstico. Es de particular interés uno de los fragmentos especificados, en lugar de una parte del mismo. Un fragmento y/o parte puede incorporar o unirse a un marcador y/o un vehículo.

65

En todo el documento, siempre que se haga referencia a un fragmento o una parte del mismo (o una parte inmunorreactiva del mismo), se entiende que se prefiere el fragmento. También se entiende en toda esta solicitud que las partes inmunogénicas, partes inmunorreactivas, y/o epítomos son generalmente de seis restos aminoácido de longitud o más largos, pero una parte o epítomo ocasional puede ser más corto. Dichas partes o epítomos más cortos también se contemplan.

Cinco aspectos adicionales son:

1) Un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina, siendo dicho fragmento de al menos 6 restos aminoácido contiguos de longitud, y donde el fragmento comprende un dominio central resistente a proteasa o una parte del mismo, seleccionándose dicho dominio o parte del mismo entre el grupo que consiste en un dominio de enlaces disulfuro intercatenarios, un dominio de oligomerización, un dominio tipo procolágeno, una repetición tipo 1, una repetición tipo 2, y una repetición tipo 3, siendo dicha parte de al menos 6 restos aminoácido de longitud.

2) Un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina, siendo dicho fragmento de al menos 6 restos aminoácido contiguos de longitud, y donde el fragmento comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en TEENKE (SEC ID N° 1), CLQDSIRKVTEENKE (que incluye una Cys N-terminal añadida para ayudar a la conjugación) (SEC ID N° 2), LQDSIRKVTEENKE (SEC ID N° 3), EGEARE (SEC ID N° 4), PQMNGKPCEGEARE (SEC ID N° 5), EDTDLD (SEC ID N° 6), YAGNGIICGEDTDLD (SEC ID N° 7), CNSPSPQMNGKPCEGEARE (SEC ID N° 8), RKVTEENKELANELRRP (SEC ID N° 9), CRKVTEENKELANELRRP (que incluye una Cys N-terminal añadida para ayudar a la conjugación) (SEC ID N° 10), PQMNGKPCEGEARE (SEC ID N° 11), CEGEAR (SEC ID N° 12), y RKVTEENKE (SEC ID N° 13). (En realizaciones particulares, el fragmento comprende dos, o incluso todas las secuencias anteriores).

3) Un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina, siendo dicho fragmento de al menos 6 restos aminoácido contiguos de longitud, y donde el fragmento comprende un dominio de unión a colágeno tipo V o una parte del mismo.

4) Un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina, siendo dicho fragmento de al menos 6 restos aminoácido contiguos de longitud, y donde el fragmento comprende un epítomo para unirse al menos a uno de los siguientes anticuerpos disponibles en el mercado, cada uno de los cuales reconoce una proteína de ~450 kDa (no reducida) que se identifica específicamente como trombospondina (la numeración TSP Ab, por ejemplo, "TSP Ab-2", proviene de Lab Vision Corporation, Fremont, CA, que actualmente tiene un sitio web en <http://www.labvision.com/>; las denominaciones de clon se refieren al clon de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal particular). También se entiende que dicho fragmento incluye un fragmento que puede diseñarse para unirse a un anticuerpo monoclonal preexistente, a través del uso de análisis de exploración de péptidos, experimentos de competición, y otros métodos conocidos en la técnica (para un ejemplo de dichos métodos, véase Corada M et al. Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. Blood. 2001 Mar 15; 97(6):1679-84). También se entiende que la presente invención incluye, aunque sin limitación, usos de anticuerpos preexistentes independientes de un fragmento purificado y/o sintético, algunos de estos usos también se describen a continuación.

TSP Ab-2 (Clon D4.6): Este anticuerpo está indicado para reaccionar contra proteína reducida y no reducida, y su epítomo está en el dominio de unión a calcio de TSP (trozo C-terminal de 50 kDa del fragmento de 120 kDa de digestión con proteasa de TSP Ca-repleto). La región de unión a calcio se considera generalmente que está en las repeticiones tipo 3 (restos de TSP 698-925). Por ejemplo, se espera que TSP Ab-2 se una a trombospondina pero no al fragmento en circulación de 30 kDa. Este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento en circulación; para distinguir trombospondina de un fragmento en circulación; y/o para distinguir uno o más fragmentos entre sí. No muestra reacción cruzada con fibronectina, fibrinógeno, y factor de von Willebrand. Su unión a trombospondina se potencia por EDTA, es decir, a baja [Ca<sup>2+</sup>].

TSP Ab-4 (Clon A6.1): Este anticuerpo está indicado para reaccionar contra proteína reducida y no reducida, y su epítomo está en el dominio de unión a colágeno tipo V. Este anticuerpo se une a trombospondina, y el solicitante ha descubierto que se une a tres fragmentos principales de TSP en plasma humano. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento o fragmentos en circulación. En combinación con otro anticuerpo o agente de unión, puede usarse en un ensayo para distinguir trombospondina de un fragmento en circulación; y/o para distinguir uno o más fragmentos entre sí. Como ejemplo entendido como ilustrativo y no restrictivo, TSP Ab-4 se usa para capturar TSP y fragmentos en circulación, y después el otro anticuerpo o agente de unión se usa para la detección, pero es capaz de distinguir TSP de un fragmento o fragmentos, o un fragmento de otro. Se entiende que TSP Ab-4 también se une a trombospondina y fragmentos de trombospondina de fuentes no humanas importantes también, incluyendo aunque sin limitación perros. Por tanto, se contempla el uso de este anticuerpo y/o agente de unión similar en un ensayo para un fragmento o fragmentos de trombospondina en una muestra de una fuente no humana, tal como un perro. Este anticuerpo no muestra reacción cruzada con fibronectina, fibrinógeno, y factor de von Willebrand. Este anticuerpo inhibe la interacción trombospondina-colágeno, y su unión a trombospondina no está afectada por glucosaminoglucanos (por ejemplo, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, y heparina). También, su unión se potencia por EDTA, es decir, a baja conc. de Ca<sup>2+</sup>.

TSP Ab-5 (Clon B5.2): Este anticuerpo está indicado para reaccionar contra proteína reducida y no reducida, y su epítipo está en un fragmento de 10 kDa presente en la unión de las repeticiones tipo 2 y tipo 3. La región de unión se enumera en otra parte como los restos 674-697, pero es solamente de 24 restos y de menos de 10 kDa, de modo que el epítipo está mapeado de forma menos precisa. Se espera que este anticuerpo se una a TSP pero no al fragmento en circulación de 30 kDa. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento o fragmentos en circulación; para distinguir trombospondina de un fragmento en circulación; y/o para distinguir uno o más fragmentos entre sí. No muestra reacción cruzada con fibronectina, fibrinógeno, y factor de von Willebrand.

TSP Ab-9 (Clon MBC 200.1): Este anticuerpo está indicado para reaccionar contra proteína reducida y no reducida, y su epítipo está en el dominio N-terminal de unión a heparina de trombospondina. Por tanto, debe unirse a trombospondina pero no a los fragmentos principales en circulación. En transferencia de Western, Ab-9 reacciona con un péptido de 25 kDa (dominio de unión a heparina) procedente de digestiones con termolisina de trombospondina que no está unido por disulfuro a cualquier otra región de la molécula de trombospondina. La heparina inhibe de forma eficaz la unión de Ab-9 a trombospondina. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP; y/o para distinguir trombospondina de un fragmento o fragmentos en circulación. Este anticuerpo no es adecuado para detectar todos los fragmentos principales en la circulación.

TSP Ab-8 (anticuerpo policlonal de conejo): Reconoce una proteína de ~450 kDa (no reducida) o 180 kDa (reducida), identificada como TSP. Este anticuerpo, que es policlonal de conejo, puede usarse para ELISA tipo sándwich para capturar o detectar y en ELISA competitivos. El solicitante ha descubierto que se une a tres fragmentos principales TSP en plasma humano. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento o fragmentos en circulación. En combinación con otro anticuerpo o agente de unión, puede usarse en un ensayo para distinguir trombospondina de un fragmento en circulación; y/o para distinguir uno o más fragmentos entre sí.

Como ejemplo entendido como ilustrativo y no restrictivo, se reconoce la diferencia entre (a) el resultado de un ensayo usando un anticuerpo o agente de unión que se une a TSP y los fragmentos principales en circulación en plasma, frente a (b) el resultado de un ensayo usando un anticuerpo o agente de unión que se une a TSP pero no a fragmentos principales. El anticuerpo o agente de unión en (a) se selecciona entre el grupo que consiste en TSP Ab-4, TSP Ab-8, TSP Ab-11, y un anticuerpo o agente de unión que se une a TSP y los fragmentos principales en circulación en plasma. El anticuerpo o agente de unión en (b) se selecciona entre el grupo que consiste en TSP Ab-3, TSP Ab-6, TSP Ab-9, y un anticuerpo o fragmento de unión que se une a TSP pero a ninguno de los fragmentos principales en circulación. Dicho ensayo en (a) detecta TSP más fragmentos; dicho ensayo en (b) detecta TSP; dicha diferencia, (a) menos (b), de este modo da una cuantificación de los fragmentos sin TSP. Asimismo, pueden reconocerse diferencias entre (c) el resultado de un ensayo usando un anticuerpo o agente de unión que se une a TSP y un subconjunto de fragmentos principales en circulación en plasma, frente al resultado de (a), anterior, para obtener una cuantificación del fragmento o fragmentos no detectados en (c). También pueden reconocerse diferencias del resultado de (c) frente a (b), anterior, para obtener una cuantificación del fragmento o fragmentos detectados en (c) pero sin la señal de TSP. El anticuerpo o fragmento de unión en (c) se selecciona entre el grupo que consiste en TSP Ab-2, TSP Ab-5, TSP Ab-1, TSP Ab-7, y un anticuerpo o agente de unión que se une a TSP y solamente un subconjunto de los fragmentos principales en circulación.

TSP Ab-11 (Clones D4.6 + A6.1 + MBC 200.1): El coctel Ab-11 está diseñado para detección sensible de trombospondina por transferencia de Western. Este coctel de anticuerpos no muestra reacción cruzada con fibronectina, fibrinógeno, y factor de von Willebrand. Como es una mezcla de TSP Ab-2, TSP Ab-4, y TSP Ab-9, detecta TSP y los tres fragmentos TSP principales en plasma humano. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento o fragmentos en circulación. En combinación con otro anticuerpo o agente de unión, puede usarse en un ensayo para distinguir trombospondina de un fragmento en circulación; y/o para distinguir uno o más fragmentos entre sí. También puede usarse en un ensayo para TSP y/o un fragmento o fragmentos TSP en una muestra de una fuente no humana, tal como un perro.

Otros anticuerpos que son útiles, aunque se han descubierto solamente como de unión a proteína no reducida incluyen, aunque sin limitación, TSP Ab-1, TSP Ab-3, TSP Ab-6, y TSP Ab-7, que se describen en más detalle a continuación inmediatamente:

TSP Ab-1 (Clon A4.1): Este anticuerpo está indicado para unirse a la mitad N-terminal de la región tipo tronco central de trombospondina. Esta región se recupera como un fragmento de 50 kDa después de digestión con quimotripsina de trombospondina. Por tanto, puede usarse Ab-1 para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento o fragmentos en circulación; distinguir trombospondina de un fragmento o fragmentos en circulación; y/o distinguir uno o más fragmentos entre sí. TSP Ab-1 no muestra reacción cruzada con fibronectina, fibrinógeno, y factor de von Willebrand. Inhibe la adhesión de células G361 de melanoma humano, queratinocitos, células de carcinoma escamoso, y células de músculo liso de rata a trombospondina. No inhibe la agregación de plaquetas inducidas por trombina. Este anticuerpo está indicado para bloquear la actividad anti-angiogénica de trombospondina inhibiendo su unión al receptor TSP/CD36.

TSP Ab-3 (Clon C6.7): Este anticuerpo está indicado para unirse al dominio de unión a plaquetas o células en el extremo C-terminal de TSP y por lo tanto debe distinguir TSP de fragmentos. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP; y/o distinguir trombospondina de un fragmento o fragmentos en circulación. Este anticuerpo no es adecuado para detectar los tres fragmentos principales en la circulación. La heparina o EDTA pueden afectar de forma marginal a la unión de Ab-3 a trombospondina. Ab-3 bloquea la aglutinación mediada por trombospondina de glóbulos rojos fijados. No muestra efecto sobre la aglutinación mediada por trombospondina de plaquetas activadas fijadas. Inhibe la agregación inducida tanto por trombina como por A23187 de plaquetas vivas (no fijadas) lavadas sin afectar a la secreción de serotonina. Ab-3 inhibe la adhesión de células G361 de melanoma a trombospondina, y bloquea la unión del dominio C-terminal a proteína asociada con integrina (IAP)/CD47.

TSP Ab-6 (Clon A2.5): Este anticuerpo ha demostrado inmunoprecipitar trombospondina. Este anticuerpo no muestra reacción cruzada con fibronectina, fibrinógeno, y factor von Willebrand. Su epítipo se localiza en el dominio de unión a heparina de trombospondina, y por lo tanto, la heparina inhibe de forma eficaz la unión de Ab-6 a trombospondina. Por tanto, este anticuerpo puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP; y/o distinguir trombospondina de un fragmento o fragmentos en circulación. Este anticuerpo no es adecuado para detectar los tres fragmentos principales en la circulación. El ácido hialurónico y el sulfato de condroitina no muestran inhibición a baja concentración e inhiben solamente de forma parcial sobre el intervalo de concentración al cual la heparina suprime la unión. La trombospondina se une con alta afinidad a un glucolípido sulfatado o sulfátido encontrado en membranas de glóbulos rojos y plaquetas. Ab-6 bloquea la unión de trombospondina a sulfátidos a bajas concentraciones. Ab-6 inmunoprecipita un péptido de 25 kDa (dominio de unión a heparina) en digestiones con quimotripsina de trombospondina que no está unida por puentes disulfuro a cualquier otra región de la molécula trombospondina. Este anticuerpo inhibe la hemaglutinación de eritrocitos humanos fijados con glutaraldehído, tratados con tripsina por trombospondina purificada. También inhibe la aglutinación de plaquetas activadas fijadas por trombospondina. No inhibe la agregación inducida por trombina o A23187 de plaquetas vivas lavadas. Ab-6 no se une a trombospondina reducida o alquilada o trombospondina transferida a membrana de nitrocelulosa después de SDS-PAGE.

TSP Ab-7 (Clon HB8432): Este anticuerpo está indicado para unirse a repeticiones tipo 2. Por tanto, Ab-7 puede usarse para detectar y/o cuantificar TSP y/o un fragmento o fragmentos en circulación; distinguir trombospondina de un fragmento o fragmentos en circulación; y/o distinguir uno o más fragmentos entre sí. No muestra reacción cruzada con fibronectina o cualquier otra proteína sérica o plaquetaria excepto trombospondina. Su epítipo se localiza en las repeticiones tipo EGF (tipo 2) en la región de tronco de trombospondina humana (núcleo unido por disulfuro que permanece después de digestión con tripsina).

Todos los anticuerpos enumerados anteriormente pueden adquirirse en Lab Vision Corporation, Fremont, CA actualmente con un sitio web en <http://www.labvision.com/>. Véase también la bibliografía publicada tal como, para TSP Ab-4, Galvin NJ et al. Interaction of human thrombospondin with types I-V collagen: direct binding and electron microscopy. J Cell Biol. 1987 May.; 104(5): 1413-22). También se entiende que pueden generarse también anticuerpos alternativos contra cualquiera de los epítipos mencionados anteriormente.

5) Un fragmento purificado y/o sintético de trombospondina, siendo dicho fragmento de al menos 6 restos aminoácido contiguos de longitud, y donde el fragmento no comprende al menos una región de unión a fibrinógeno seleccionada entre el grupo que consiste en (1) un dominio de unión a fibrinógeno dentro de un fragmento de 210 kDa de TSP, donde dicho fragmento de 210 kDa está compuesto por tres fragmentos de 70 kDa que contienen la región de enlaces disulfuro intercatenarios, la región de homología de procolágeno, y las repeticiones tipo 1 y tipo 2, (2) una región de unión a fibrinógeno en el dominio amino-terminal de trombospondina, (3) una región de unión a fibrinógeno en un dominio de unión a heparina amino-terminal de 18 kDa de trombospondina, y (4) una región correspondiente al péptido sintético NI2/I que abarca los restos de aminoácido 151-164 (I-151 a P-164) del dominio N-terminal de trombospondina-1. En una realización particular, el fragmento no comprende ninguna de las regiones de unión a fibrinógeno en el grupo.

Para cada uno de los 5 aspectos adicionales, el peso molecular del fragmento de trombospondina no excede de 110 kDa; alternativamente no excede de 55 kDa; o alternativamente no excede de 35 kDa, donde el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro. Los fragmentos de los 5 aspectos adicionales descritos pueden usarse para inducir anticuerpos (y/u otras moléculas de unión) de interés en los métodos de diagnóstico o pueden usarse en ensayos de diagnóstico, por ejemplo, como calibradores, indicadores, y/o competidores. Se entiende que un fragmento puede derivatizarse, por ejemplo, para incorporar y/o acoplarse a un marcador y/o un vehículo.

Un fragmento que puede ser tan pequeño como de 6 restos aminoácido de longitud es preferiblemente inmunorreactivo. Un método típico para inmunizaciones comprende acoplar el péptido a un vehículo, tal como hemocianina de lapa californiana u ovalbúmina. Dichos acoplamientos a un vehículo también se contemplan en la presente invención.

La inclusión del dominio principal resistente a proteasa central en la definición de los fragmentos proviene de consideraciones analizadas en otra parte de este documento. Se considera que este dominio comprende

localizaciones en la proteína trombospondina madura seleccionadas entre el grupo que consiste en: un dominio de enlaces disulfuro intercatenarios (alrededor de Cys-252 y Cys-256, preferiblemente restos 241-262); el dominio de homología de procolágeno (restos 263-360); las repeticiones tipo 1 (restos 361-530); las repeticiones tipo 2 (restos 531-673); existe un corto segmento (restos 674-697) entre el dominio de repeticiones tipo 2 y el dominio de repeticiones tipo 3; y después las repeticiones tipo 3 (restos 698-925); véase la Figura 1 de esta solicitud para ejemplos de fragmentos resistentes a proteasa que se han remitido después de digestiones artificiales *in vitro*; Capítulo 2, "The primary structure of the thrombospondins" en in The Thrombospondin Gene Family por JC Adams, RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995, pág. 11-42, particularmente pág. 12; y Capítulo 6, "Mechanistic and functional aspects of the interactions of thrombospondins with cell surfaces," *ibidem*, pág. 105-157, particularmente pág. 115. Los enlaces disulfuro intercatenarios (en la región de restos 241-262) a menudo se conservan en fragmentos resistentes a proteasa. El término "madura", como se usa aquí para hacer referencia a la secuencia de la proteína trombospondina madura, significa sin la secuencia de péptidos señal de 18 a 22 restos, que aquí se supone de 18 restos, siguiendo The Thrombospondin Gene Family por JC Adams et al. 1995; véase la secuencia de trombospondina humana completa dada a continuación en este texto; véase también la Figura 1 de esta solicitud, y las discusiones de la misma. No obstante, se entiende que el archivo de GenBank NM\_003246.1, también enumerado como GI:4507484, actualmente identifica los restos nucleotídicos "112..204" como codificante del péptido señal, que implica un péptido señal de 31 restos aminoácido).

La identificación de estos péptidos, TEENKE (SEC ID N° 1), LQDSIRKVTEENKE (SEC ID N° 3), EGEARE (SEC ID N° 4), PQMNGKPCEGEARE (SEC ID N° 5), EDTDLD (SEC ID N° 6), YAGNGIICGEDTDLD (SEC ID N° 7), CNSPSPQMNGKPCEGEARE (SEC ID N° 8), RKVTEENKELANELRRP (SEC ID N° 9), PQMNGKPCEGEARE (SEC ID N° 11), QEGEAR (SEC ID N° 12), y RKVTEENKE (SEC ID N° 13) se archivó por exámenes computarizados de trombospondina, los exámenes se hicieron por petición en fuentes comerciales para identificar regiones inmunogénicas (epítomos), pero estos exámenes identificaron muchos péptidos con regiones inmunogénicas, y por tanto los exámenes se siguieron por selección de péptidos y/o epítomos relevantes basándose en el conocimiento de fragmentos de trombospondina en circulación. Se identificaron de forma similar otros péptidos y/o epítomos enumerados en esta solicitud.

Un criterio de que el fragmento comprende una parte inmunogénica y/o inmunorreactiva de un dominio de unión a colágeno tipo V proviene de las propiedades publicadas (por ejemplo, Galvin NJ et al. Interaction of human thrombospondin with types I-V collagen: direct binding and electron microscopy. J Cell Biol. 1987 Mayo;104(5):1413-22) del anticuerpo TSP Ab-4 disponible en el mercado usado a continuación para detectar fragmentos de trombospondina de interés en el plasma.

El dominio de unión a colágeno V de trombospondina se ha mapeado en la secuencia de aminoácidos correspondiente a la región entre la valina(333) y la lisina(412) (V-333 a K-412, usando los símbolos de una letra V y K para sus respectivos aminoácidos), inclusive, de trombospondina-1 humana (Takagi T et al. A single chain 19-kDa fragment from bovine thrombospondin binds to type V collagen and heparin. J Biol Chem 268:15544-15549, 1993; como se ha mencionado anteriormente, los números aquí se refieren a la proteína trombospondina madura, es decir, sin la secuencia de péptidos señal de 18 a 22 restos, que aquí se supone que es de 18 restos). Esta región incluiría una parte de la región de homología de procolágeno de trombospondina y todo o casi todo de la primera repetición tipo 1 de trombospondina (véase Capítulo 2, "The primary structure of the thrombospondins" en The Thrombospondin Gene Family por JC Adams, RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995, pág. 11-42, pero especialmente pág. 24).

El criterio de que el fragmento comprende un epítomo para unirse al anticuerpo TSP Ab-4 disponible en el mercado proviene del hecho de que el anticuerpo TSP Ab-4 se usó a continuación para detectar de forma satisfactoria fragmentos de trombospondina de interés en el plasma, incluyendo el plasma de pacientes con cáncer. De forma significativa, este anticuerpo TSP Ab-4 se describe como de unión al dominio de unión a colágeno tipo V de trombospondina.

Para referencias respecto a la región de unión a fibrinógeno dentro de un fragmento de 210 kDa de TSP compuesto por tres fragmentos de 70 kDa que contienen la región de enlaces disulfuro intercatenarios, la región de homología de procolágeno, y las repeticiones tipo 1 y tipo 2, véase pág. 24 de Adams et al. The Thrombospondin Gene Family; cita 53 en el mismo, que es Lawler J et al. Thrombin and chymotrypsin interactions with thrombospondin. Ann N Y Acad Sci. 1986; 485: 273-87; y citas inmediatamente debajo. Referencias adicionales para las regiones de unión a fibrinógeno a excluir incluyen: para una región en un dominio de unión a heparina amino-terminal de 18 kDa de trombospondina (llamado TSP18), véase Bonnefoy A et al.: A model of platelet aggregation involving multiple interactions of thrombospondin-1, fibrinogen, and GPIIb/IIIa receptor. J Biol Chem. 2001 Feb 23;276(8):5605-12. Para una región correspondiente al péptido sintético N12/I que abarca los restos de aminoácido 151-164 del dominio N-terminal de trombospondina-1, véase Volland C et al.: Platelet-osteosarcoma cell interaction is mediated through a specific fibrinogen-binding sequence located within the N-terminal domain of thrombospondin 1. J Bone Miner Res. 2000 Feb; 15(2):361-368. Citas para dos dominios de unión a fibrinógeno incluyen la pág. 24 de Adams et al. The Thrombospondin Gene Family (y citas 51-54 del mismo), y para el papel de las repeticiones tipo 1 se incluye Panetti TS et al.: Interaction of recombinant procollagen and properdin modules of thrombospondin-1 with heparin and fibrinogen/fibrin. J Biol Chem. 1999 Ene. 1; 274(1):430-7.

La trombospondina es una proteína glucosilada. Por lo tanto, dependiendo de la parte de trombospondina que se considere, los fragmentos de trombospondina de la invención pueden estar glucosilados o no glucosilados. Sitios potenciales para cadenas carbohidrato N-ligadas incluyen N-230 (en el dominio N-terminal), N-342 (en el dominio de homología de procolágeno), N-503 (en el dominio de repeticiones tipo 1), N-690 (en la región entre los dominios de repeticiones tipo 2 y tipo 3), N-1033 (en el dominio C-terminal), y N-1049 (en el dominio C-terminal). También debe entenderse que existen uniones específicas de sacáridos C- y O-ligados, particularmente en el dominio de repeticiones tipo 1 (véase Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher DF, Peter-Katalinic J: C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. J Biol Chem. 2001 Mar 2;276(9):6485-6498). También se entiende que puede suceder  $\beta$ -hidroxilación de trombospondina (tal como en N-592, que está en el dominio de repeticiones tipo 2; véase la Figura 2.2a en Adams JC et al. The Thrombospondin Gene Family, 1995, pág. 16), y que cualquiera de estas modificaciones puede incorporarse, o no, en fragmentos de trombospondina y/o péptidos de la presente invención.

Entidades no glucosiladas de particular interés son péptidos sintéticos.

En realizaciones particulares, los fragmentos de trombospondina de la invención se derivatizan de modo que comprendan y/o se unan a un marcador detectable y/o un vehículo. En realizaciones particulares, el marcador se selecciona entre el grupo que consiste en un marcador radiactivo, un marcador fluorescente, un marcador químico, un marcador colorimétrico, un marcador enzimático, un marcador no fluorescente, un marcador no radiactivo, un resto de biotina, y un resto de avidina. En realizaciones particulares, el vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en una perla, una microesfera, una microesfera codificada, una matriz sólida, una hemocianina de lapa californiana, una albúmina, enlace a un agente reticulante, una marca epitópica, y un epítipo.

Se entiende que un fragmento sintético o purificado de trombospondina de la invención retiene su identidad como fragmento de la invención incluso si se ha derivatizado mediante la adición de material adicional, tal como marcador detectable, o a través de conjugación con otra molécula, o sintetizándolo como parte de una proteína quimérica, por nombrar solamente tres de muchos posibles ejemplos.

#### Agentes de unión

La detección de los fragmentos de trombospondina o la trombospondina habitualmente requiere el uso de agentes que se unirán a ellos. Dichos agentes pueden ser anticuerpos de múltiples cadenas, anticuerpos de cadena sencilla, proteínas que no son anticuerpos, moléculas no proteicas, o derivados o combinaciones de los mismos. Los anticuerpos policlonales y monoclonales son normalmente inmunoglobulinas, es decir, anticuerpos de múltiples cadenas. En el caso de inmunoglobulina-G (IgG), cada molécula de anticuerpo consiste en un par de cadenas pesadas y un par de cadenas ligeras. Los anticuerpos de múltiples cadenas son normalmente de fuentes de mamífero o aves. Los anticuerpos de cadena sencilla y los no anticuerpos se analizan a continuación.

El término "anticuerpos" por sí mismos, cuando no se especifican como anticuerpos de cadena sencilla, se refiere a anticuerpos de 4 cadenas, aquellos con dos cadenas polipeptídicas pesadas y dos ligeras. A modo de ejemplo, esto incluye aunque sin limitación las clases IgG de anticuerpos, pero también otras clases, tales como las que existen en multímeros superiores, tales como IgM. También se contemplan IgA e IgY.

El término "proteína" pretende incluir no solamente moléculas normalmente mencionadas como proteínas sino también aquellas que pueden mencionarse como polipéptidos.

#### Métodos para detectar los fragmentos de trombospondina distinguiendo al mismo tiempo, o sin distinguir, de la propia trombospondina

En un aspecto, la invención incluye un ensayo para detectar un fragmento de trombospondina de la invención donde el ensayo distingue el fragmento de trombospondina de la propia trombospondina. Los fragmentos de trombospondina de particular interés son los encontrados en seres humanos y están dentro de un intervalo seleccionado entre el grupo que consiste en 80 a 100 kDa, 40 a 55 kDa y 20 a 30 kDa, donde el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro. Más preferiblemente se seleccionan entre el grupo que consiste en un fragmento de ~85 kDa a 90 kDa, un fragmento de ~50 kDa, y un fragmento de ~30 kDa. El ensayo puede detectar justo uno de estos fragmentos, o una combinación de 2 o más.

En casos donde la concentración de formas de mayor peso molecular, incluyendo la propia trombospondina, es baja en una muestra (tal como en las muestras mostradas en las Figuras 3 y 4, resultados de análisis de transferencia de Western usando anticuerpo TSP Ab-4), la detección de fragmentos sin excluir necesariamente trombospondina es un enfoque también contemplado por la presente invención. Pueden conseguirse bajas concentraciones de trombospondina en muchos casos evitando o reduciendo la activación de plaquetas durante la recogida y/o almacenamiento de muestras (véase a continuación para métodos contemplados). Este aspecto de la presente invención comprende varias ventajas sobre métodos convencionales de detección que han usado agentes de unión contra la molécula completa de trombospondina (y estos agentes de unión se han limitado a anticuerpos). Dichas ventajas incluyen, aunque sin limitación, el uso de agentes de unión que están dirigidos específicamente contra los



fragmentos de interés y no partes de la molécula trombospondina fuera de estos fragmentos, el uso de péptidos y/o fragmentos de trombospondina relevantes para generar dichos agentes de unión (tales como anticuerpos), el uso de péptidos y/o fragmentos de trombospondina relevantes como calibradores de ensayo, y el uso de péptidos y/o fragmentos de trombospondina relevantes como indicadores de ensayo.

Cualquiera de los varios enfoques aceptables puede usarse para el ensayo de un fragmento de trombospondina (o fragmentos) donde el ensayo lo distingue de trombospondina, y más de uno de estos pueden usarse en un ensayo dado. En un enfoque, el ensayo comprende una etapa donde el fragmento se separa físicamente de la trombospondina. Generalmente ese enfoque se combina con una etapa en que la presencia del fragmento o la trombospondina se muestra por su reacción con un agente específico de unión. En realizaciones particulares, la técnica de separación física se selecciona entre el grupo que consiste en electroforesis en gel, diálisis, cromatografía, cromatografía por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmutafinidad, adsorción, inmunoadsorción, enfoque isoelectrico, espectrometría de masas, centrifugación, sedimentación, flotación, precipitación, inmunoprecipitación, y filtración en gel.

En un segundo enfoque, el ensayo distingue el fragmento (o fragmentos) basado en uno o más epítomos (aquí "epítomo" significa una diana a la que un agente de unión, es decir, un anticuerpo o un no anticuerpo, se une) en el fragmento que no están presentes en trombospondina, incluyendo aunque sin limitación un epítomo en un extremo de un fragmento y un epítomo que se presenta por un fragmento pero está resguardado en trombospondina.

En un tercer enfoque, el ensayo distingue el fragmento (o fragmentos) basado en uno o más epítomos en trombospondina que no está presentes en el fragmento. Como ejemplo ilustrativo pero no restrictivo, un epítomo compartido por trombospondina y un fragmento de trombospondina se usa para obtener una cuantificación de un total, trombospondina más fragmento o fragmentos de trombospondina, del cual después se sustrae una cuantificación de trombospondina obtenida usando un epítomo presente en trombospondina pero no presente en un fragmento. La diferencia entre las dos cuantificaciones es una cuantificación de la cantidad de fragmento. Como ejemplo, los epítomos en trombospondina pero no en al menos un fragmento del grupo de un fragmento de 80 a 100 kDa, un fragmento de 40 a 55 kDa, o un fragmento de 20 a 35 kDa presente en plasma pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en un epítomo de fuera del dominio principal central resistente a proteasa, un epítomo en el dominio N-terminal, un epítomo en el dominio N-terminal de unión a heparina, una secuencia de unión a heparina en el dominio N-terminal, una secuencia de unión a heparina en el dominio N-terminal seleccionada entre el grupo que consiste en los restos 23-32 (RKGSGRRLVK), los restos 23-29 (RKGSGRR), y los restos 77-83 (RQMKKTR) de la proteína madura (véase el Capítulo 2, "The primary structure of the thrombospondins" en *The Thrombospondin Gene Family* por JC Adams, RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995, pág. 11-42, pero especialmente pág. 13 y Tabla 2.1; Capítulo 6, "Mechanistic and functional aspects of the interactions of thrombospondins with cell surfaces", *ibidem* pág. 105-157, pero especialmente pág. 108 y 114; Lawler J et al. Expression and mutagenesis of thrombospondin. *Biochemistry*. 1992 Feb. 4; 31(4):1173-80; y Cardin AD y Weintraub HJ. Molecular modeling of protein-glicosaminoglican interactions. *Arteriosclerosis*. 1989 Ene.-Feb.; 9(1):21-32), una secuencia de unión a heparina en el dominio N-terminal seleccionada entre el grupo que consiste en los restos 22-29 (ARKGSGRR), los restos 79-84 (MKKTRG), y los restos 178-189 (RLRIAKGGVNDN) de la proteína madura (revisado en la sección Discusión de Voland C et al.: Platelet-osteosarcoma cell interaction is mediated through a specific fibrinogen-binding sequence located within the N-terminal domain of thrombospondin 1. *J Bone Miner Res*. 2000 Feb.; 15(2):361-368), un epítomo en el dominio C-terminal, un epítomo en el dominio C-terminal de unión celular, un epítomo de trombospondina no encontrado en un fragmento plasmático, un epítomo de trombospondina no encontrado en un fragmento plasmático de 80 a 100 kDa, un epítomo de trombospondina no encontrado en un fragmento plasmático de 40 a 55 kDa, y un epítomo de trombospondina no encontrado en un fragmento plasmático de 20 a 35 kDa, donde todos los pesos moleculares en kDa son aquellos después de reducción. Se entiende que la ausencia de un fuerte dominio de unión a heparina funcional de un fragmento de trombospondina en plasma será un factor que permita su acumulación en plasma (muchas proteínas de unión a heparina o heparán se eliminan del plasma muy rápidamente; véase por ejemplo, Wallinder L et al. Rapid removal to the liver of intravenously injected lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Oct. 26; 575(1):166-73).

Los epítomos pueden dividirse en tres grupos. Grupo 1: un epítomo compartido por trombospondina y un fragmento de trombospondina presente en plasma es preferiblemente uno que está contenido dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en TEENKE (SEC ID N° 1), CLQDSIRKVTWEENKE (que incluye una Cys N-terminal añadida para ayudar a la conjugación) (SEC ID N° 2), LQDSIRKVTWEENKE (SEC ID N° 3), EGEARE (SEC ID N° 4), PQMNGKPCGEARE (SEC ID N° 5), EDTDL (SEC ID N° 6), YAGNGIICGEDTDL (SEC ID N° 7), CNSPSPQMNGKPCGEARE (SEC ID N° 8), RKVTEENKELANELRRP (SEC ID N° 9), CRKVTEENKELANELRRP (SEC ID N° 10), PQMNGKPCGEARE (SEC ID N° 11), CEGEAR (SEC ID N° 12), RKVTEENKE (SEC ID N° 13), o una parte de al menos 3 restos aminoacilo de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoacilo de longitud, más preferiblemente al menos 6 restos aminoacilo) de dicha secuencia de aminoácidos.

Grupo 2: un epítomo en trombospondina pero no en un fragmento de 80 a 100 kDa, de 40 a 55 kDa, y/o de 20 a 35 kDa presente en plasma es preferiblemente uno contenido dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en TERDDD (SEC ID N° 24), DFSGTFINTERDDD (SEC ID N° 25), ERKDHS (SEC ID

Nº 26), TRGTLALERKDHS (SEC ID Nº 27), CTGTLALERKDHS (SEC ID Nº 28) (que incluye una Cys N-terminal añadida para ayudar a la conjugación), DDKFQD (SEC ID Nº 29), ANLIPPVPDDKFQD (SEC ID Nº 30), CANLIPPVPDDKFQD (SEC ID Nº 31) (que incluye una Cys N-terminal añadida para ayudar a la conjugación), DCEKME (SEC ID Nº 32), EDRAQLYIDCEKMEN (SEC ID Nº 33) (aunque se entiende que esta secuencia y sus fragmentos afectan a la secuencia del péptido N12/I de unión a fibrinógeno), CGTNRIPESGGDNSVFD (SEC ID Nº 34), NRIPESGGDNSVFD (SEC ID Nº 35), GWKDFTAYR-WRLSHRPKTG (SEC ID Nº 36), CGWKDFTAYRWRLSHRPKTG (SEC ID Nº 37) (que incluye una Cys N-terminal añadida para ayudar a la conjugación), o una parte de al menos 3 restos aminoácido de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoácido de longitud, más preferiblemente al menos 6 restos aminoácido) de dicha secuencia de aminoácidos.

Pueden añadirse diversas modificaciones, tales como una Cys C-terminal, a un péptido de interés para permitir una conjugación más fácil con una proteína vehículo tal como KLH, ovalbúmina, y otras. Esto es particularmente cierto para los siguientes péptidos: RKVTEENKELANELRRP (SEC ID Nº 9), LQDSIRKVTEENKE (SEC ID Nº 3); TRGTLALERKDHS (SEC ID Nº 27), y ANLIPPVPDDKFQD (SEC ID Nº 30), y estas modificaciones proporcionan estrategias alternativas de conjugación para NRIPESGGDNSVFD (SEC ID Nº 35) y otras.

En enfoques referidos a lo anterior, el fragmento puede distinguir fragmentos entre sí, basado en métodos de separación física y/o dianas compartidas y/o no compartidas del agente de unión. Por tanto, por ejemplo, puede usarse cromatografía por exclusión de tamaño y/o electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida para separar los fragmentos de ~85 a 90, ~50, y ~30 kDa entre sí, para una cuantificación separada (un ejemplo de esto se muestra en la Figura 3, con la cuantificación presentada en la Tabla 2). Además, por ejemplo, puede usarse un epítipo (que significa una diana de agente de unión) en el fragmento de ~85 a 90 kDa que no está contenido en los fragmentos de ~50 y/o ~30 kDa para ensayarlo por separado, y/o puede usarse para sustraer su contribución de un total para obtener resultados que reflejen los fragmentos más pequeños.

Grupo 3: un epítipo adicional, útil como diana de agente de unión para distinguir un fragmento de TSP de longitud completa, y/o distinguir dos fragmentos de diferentes tamaños es preferiblemente uno contenido dentro de una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en DDDDNDKIPDDRDNC (SEC ID Nº 14), DDDDNDKIPDDRDNC[NH<sub>2</sub>] (SEC ID Nº 15), DDDDNDK (SEC ID Nº 16), NLPNSGQEDYDKDG (SEC ID Nº 17), CNLPNSGQEDYDKDG (SEC ID Nº 18), EDYDKD (SEC ID Nº 19), CPYHNPDQADTDNNGEGD (SEC ID Nº 20), CRLVNPDPQKDSGD (SEC ID Nº 21), DQKDSGD (SEC ID Nº 22), CPYVNPANQADHDKDGKGD (SEC ID Nº 23), o una parte de al menos 3 restos aminoácido de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoácido de longitud, más preferiblemente al menos 6 restos aminoácido) de dicha secuencia de aminoácidos.

También se entiende que algunos péptidos que contienen un epítipo compartido por trombospondina y un primer fragmento de trombospondina presente en plasma pueden contener un epítipo que no está compartido por un segundo fragmento de trombospondina presente en plasma. Dichos péptidos son útiles en muchas aplicaciones descritas en este documento, incluyendo aunque sin limitación distinguir trombospondina de dicho segundo fragmento de trombospondina, distinguir dicho primero de dicho segundo fragmento de trombospondina, detectar y/o cuantificar trombospondina, detectar y/o cuantificar dicho primer fragmento de trombospondina, detectar y/o cuantificar dicho segundo fragmento de trombospondina (en un ensayo de combinación descrito en otra parte en este documento), y producir un agente de unión. Dichos péptidos, que forman un subconjunto del grupo 1, pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en EGEARE (SEC ID Nº 4), PQMNGKPCEGEARE (SEC ID Nº 5), EDTDLD (SEC ID Nº 6), YAGNGIICGEDTLD (SEC ID Nº 7), CNSPSPQMNGKPCEGEARE (SEC ID Nº 8), PQMNGKPCEGEARE (SEC ID Nº 11), CEGEARE (SEC ID Nº 12), o una parte de al menos 3 restos aminoácido de longitud (preferiblemente al menos 4 restos aminoácido de longitud, más preferiblemente al menos 6 restos aminoácido) de dicha secuencia de aminoácidos.

También se entiende que la presente invención también incluye moléculas de anticuerpo y no de anticuerpos que se unen a estos péptidos, otros péptidos de trombospondina especificados en este documento, fragmentos de los mismos, y péptidos que contienen fragmentos de los mismos; así como ensayos que usan un reactivo de esta lista. Se entiende que puede emplearse un anticuerpo o un no anticuerpo que distingue trombospondina de un fragmento, o un fragmento de otro, para purificar por afinidad trombospondina o un fragmento.

En realizaciones de particular interés, se toma o recoge una muestra de material (tejido líquido, tejido sólido, orina, sudor, fluido cefalorraquídeo, un fluido corporal, sangre o un componente sanguíneo, o deposición; más preferiblemente plasma sanguíneo) de un organismo (un ser humano o animal no humano, preferiblemente un mamífero o un ave en el caso de animales no humanos) y se somete al ensayo. Las invenciones descritas en este documento no solamente se aplican a fragmentos de trombospondina humana, sino también a fragmentos de trombospondina no humana. Por ejemplo, existe la necesidad de detectar la presencia de o controlar el estado de la enfermedad, tal como un cáncer, en ganado, caballos de carreras, mascotas, y otros animales económica y/o emocionalmente importantes. Las presentes invenciones cumplen estas necesidades.

En un conjunto de realizaciones, el ensayo detecta la presencia de, o controla el curso de, enfermedades y afecciones que pueden afectar a los niveles plasmáticos de fragmentos de trombospondina. Dichas enfermedades incluyen, aunque sin limitación, muchas que en la técnica previa se asumía que afectaban a los niveles plasmáticos

de trombospondina: un cáncer, fallo renal, enfermedad renal, dermatitis atópica, vasculitis, vasculitis aguda, aloinjerto renal, asma alérgica, diabetes mellitus, infarto de miocardio, enfermedad hepática, esplenectomía, dermatomiositis, poliarteritis nodosa, lupus sistémico eritematoso, lupus eritematoso, síndrome de Kawasaki, vasculitis no específica, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide, síndrome de vasculitis, púrpura de Henoch-Schonlein, púrpura trombocitopénica, púrpura, una afección inflamatoria, una afección asociada con coagulación, una afección asociada con activación de plaquetas, una afección asociada con activación intravascular de plaquetas, una afección asociada con consumo de plaquetas, trombocitopenia inducida por heparina, coagulación intravascular diseminada, coagulación intravascular, coagulación extravascular, una afección asociada con activación endotelial, una afección asociada con producción y/o liberación de trombospondina y/o un fragmento de trombospondina, urticaria, ronchas, angioedema, una reacción a fármacos, una reacción a antibióticos, una reacción a aspartamo, dermatitis atópica, eccema, hipersensibilidad, esclerodermia, afecciones asociadas con taponamiento de vasos, una afección asociada con un criofibrinógeno, una afección asociada con una crioglobulina, y una afección asociada con un anticuerpo anti-cardiolipina.

15 En realizaciones de particular interés, el ensayo para fragmentos de trombospondina se hace para detectar la presencia de, o controlar el estado de, un cáncer en un ser humano y/o en un animal no humano. En realizaciones adicionales de interés, el ensayo se hace para medir el grado de activación de plaquetas.

20 En mediciones de los niveles plasmáticos de los fragmentos, se prefiere que el plasma se obtenga por un método que evite o reduzca la activación de plaquetas y/o la activación de un componente de la cascada de coagulación durante la recogida y/o almacenamiento de muestra; y/o por un método que evite o reduzca la escisión de trombospondina en fragmentos (o fragmentos en fragmentos más pequeños) durante la recogida y/o almacenamiento de muestras. La activación de plaquetas y/o la activación de un componente de la cascada de coagulación durante la recogida y/o almacenamiento de muestras puede provocar la liberación de trombospondina, pero también la activación de proteasas (incluyendo aunque sin limitación una proteasa de la cascada de coagulación) que pueda escindir la trombospondina y algunos fragmentos de trombospondina, complicando de este modo el ensayo. Para evitar o reducir la activación de plaquetas durante la recogida y/o almacenamiento de muestras, el método puede ser uno que no comprenda el uso de un torniquete. También para evitar o reducir la activación de plaquetas y/o la activación de la coagulación durante la recogida y/o almacenamiento de muestras, el método puede comprender, por ejemplo, una etapa seleccionada entre el grupo que consiste en: (1) uso de una aguja grande, (2) descarte de la parte inicial de la sangre recogida, (3) uso de una aguja recubierta, (4) uso de un tubo recubierto, (5) almacenamiento de la muestra entre -1 °C y -5 °C, y (6) separación de plasma en 30 minutos de recogida de muestras. También para evitar o reducir la activación de plaquetas y/o la actividad proteasa durante la recogida y/o almacenamiento de muestras, el método puede comprender el uso de un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un inhibidor de plaquetas, un inhibidor de proteasa, un inhibidor de serina proteasa, un inhibidor enzimático, un inhibidor de una enzima que es dependiente de cationes divalentes, una heparina, un fragmento de heparina, un heparán, un anticoagulante, un inhibidor de COX, un inhibidor de una molécula de adhesión celular, un inhibidor de un receptor superficial, un inhibidor de glucoproteína, un inhibidor de un receptor de glucoproteína IIb/IIIa, un inhibidor de trombina, un inhibidor de desgranulación, un quelante, un compuesto citrato, teofilina, adenosina, y dipiridamol (vacutainers Diatube H que contienen citrato, teofilina, adenosina, y dipiridamol están disponibles en el mercado en Becton Dickinson; véase Bergseth G et al. A novel enzyme immunoassay for plasma thrombospondin: comparison with beta-thromboglobulin as platelet activation marker in vitro and in vivo. Thromb. Res. 99:41-50, 2000). También se contemplan dispositivos que minimizan la activación de plaquetas y/o la actividad proteasa en una muestra e incluyen, aunque sin limitación, un tubo de recogida que contiene un cóctel de inhibidores de plaquetas y/o coagulación, un tubo de recogida que contiene un inhibidor de proteasa, un tubo de recogida que contiene un inhibidor de una proteasa que es o deriva de un componente sanguíneo, y un dispositivo que descarta o permite el fácil descarte de una parte inicial de sangre recogida. Estos métodos también pueden aplicarse a muestras de otros fluidos corporales.

50 Un aspecto relacionado de la invención es un ensayo de diagnóstico de combinación (especialmente para cáncer) que comprende al menos dos tipos de ensayos de diagnóstico, siendo uno de dichos ensayos el ensayo para un fragmento de trombospondina (o fragmentos) o una parte (o partes) del mismo en plasma, no estando basado el otro ensayo en un fragmento de trombospondina o parte. En un conjunto de realizaciones, el ensayo no basado en un fragmento de trombospondina o parte del mismo se selecciona entre el grupo que consiste en un ensayo de imágenes, un ensayo radiográfico, un ensayo de medicina nuclear, un ensayo de imágenes de resonancia magnética, un ensayo de sangre, una biopsia, un ensayo genético, un ensayo de guayacol, un ensayo para sangre oculta en heces, y un ensayo para sangre fecal, un ensayo de cáncer no basado en un fragmento de trombospondina o parte del mismo, un ensayo de enfermedad no basado en un fragmento de trombospondina o parte del mismo, y una endoscopia. En realizaciones particulares de los métodos anteriores, un fragmento de trombospondina comprende un marcador detectable (al menos durante alguna parte del método).

65 La detección puede ser parte, por ejemplo, de un proceso de selección. Dicha selección podría incluir una comparación frente a un valor de referencia, implicar una comparación frente a un valor previo del mismo individuo; y/o hacerse repetida y/o periódicamente (por ejemplo, una vez al año, una vez cada seis meses, o una vez cada 2, 3, 4, 5 ó 10 años). Se entiende que la selección puede realizarse en seres humanos y/o en animales no humanos.

Los métodos anteriores son ensayos para detectar un fragmento de trombospondina de la invención donde el ensayo distingue, o no distingue, un fragmento de trombospondina de trombospondina, o un fragmento de trombospondina de otro fragmento de trombospondina. En cualquier caso, dichos fragmentos pueden mencionarse como fragmentos "diana" para los propósitos del ensayo. En muchos casos es deseable que el método también  
 5 comprenda una etapa o procedimiento de calibrado, en que cantidades conocidas de un fragmento de trombospondina (tal como un péptido) se someten al método. Dichos fragmentos de "calibrado" están opcionalmente marcados de forma detectable. Es posible realizar los ensayos en que los fragmentos diana y de calibrado comprenden diferentes marcadores detectables (o donde uno está marcado de forma detectable y el otro no).

10 Se entiende que la interferencia resultante de la unión de fibrinógeno a un dominio N-terminal de trombospondina no tiene probabilidades de afectar a la detección de fragmentos de trombospondina relacionados con el dominio central resistente a proteasa (que carece del dominio N-terminal). No obstante, los ensayos de trombospondina podrían estar afectados (por tanto, se contempla la evitación de esa región del extremo N-terminal, cuando se ensaya la trombospondina, y/o la dilución, retirada, inhibición, y/o compensación de otro modo de las moléculas interferentes).

15 Sustancias potencialmente interferentes adicionales, inferidas de informes de que estas moléculas están presentes en plasma y que se unen a TSP, son plasminógeno, proteínas ricas en histidina incluyendo glucoproteína rica en histidina, y fibronectina (véase, por ejemplo, Walz DA et al., Semin Thromb Hemost. 13(3):317-025 (1987); Vanguri VK et al., Biochem J. 2000 Abr. 15; 347(Pt 2):469-73). Para la unión de glucoproteína rica en histidina, se han implicado dos regiones de trombospondina: repeticiones tipo 1 (Simantov et al. J Clin Invest. 2001 Ene., 107(1):45-52) y un dominio de unión a heparina de TSP (Vanguri VK et al., 2000). Se espera que el dominio de unión a heparina de trombospondina esté ausente de los fragmentos en circulación.

20 Para compensar las sustancias interferentes en ensayos para fragmentos de trombospondina, se contempla la dilución, retirada, inhibición, y/o compensación de otro modo de las moléculas interferentes. Como ejemplo ilustrativo, pero no limitante, se contempla la inclusión de un inhibidor de interacciones de trombospondina-fibrinógeno. Dicho inhibidor se selecciona entre el grupo que consiste en péptido sintético N12/I que abarca los restos de aminoácido 151-164 del dominio N-terminal of trombospondina-1 (véase Voland C et al.: Platelet-osteosarcoma cell interaction is mediated through a specific fibrinogen-binding sequence located within the N-terminal domain of thrombospondin 1. J Bone Miner Res. 2000 Feb.; 15(2):361-8), y un anticuerpo contra el fragmento de escisión por bromuro de cianógeno compuesto por los restos 241-476 del extremo carboxilo-terminal de la cadena alfa de fibrinógeno (véase Tuszynski GP et al.: The interaction of human platelet thrombospondin with fibrinogen. Thrombospondin purification and specificity of interaction. J Biol Chem. 1985 Oct. 5; 260(22):12240-5).

### 35 Anticuerpos de cadena sencilla y no anticuerpos

La creación de anticuerpos convencionales (también mencionado en este documento simplemente como "anticuerpos" en oposición a "anticuerpos de cadena sencilla"; y un ejemplo de un anticuerpo convencional es IgG, que está compuestos por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) es simplemente uno de varios métodos que  
 40 se basan en líneas generales en el enfoque aleatorio, semi-aleatorio, dirigido, combinatorio, y/u otros medios para la generación de grandes cantidades de péptidos y/o no péptidos diversos, que después va seguida de un procedimiento de selección para identificar dentro de esta gran cantidad aquellos péptidos y/o no péptidos que se unen a una diana y/o un epítipo dentro de una diana. La selección puede después estar seguida de métodos para mejorar los péptidos y/o no péptidos para conseguir una mejor afinidad y/o especificidad. Estos péptidos y/o no péptidos diversos pueden ser anticuerpos convencionales de múltiples cadenas (policlonales o monoclonales), anticuerpos de cadena sencilla, o no anticuerpos, incluyendo aunque sin limitación péptidos, productos de presentación en fagos, aptámeros, ADN, ARN, o ADN o ARN modificado. También se contemplan receptores de y/o proteínas de unión a trombospondina (tal como un receptor de CSVTCG, una molécula de unión a CSVTCG, CD36, angiocidina, subunidad reguladora 4 no ATPasa del proteasoma 26S, y/o factor anti-secretor).

50 Un procedimiento bien conocido para la generación de grandes cantidades de péptidos diversos es a través de la presentación en fagos, que después va seguida de selección y pueden refinarse adicionalmente a través de otras técnicas tales como evolución molecular (véase, por ejemplo, Flores-Flores, C. et al., Development of human antibody fragments directed towards synaptic acetylcholinesterase using a semi-synthetic phage display library. J Neural Transm Suppl. 2002; (62):165-179; Qian, M.D, et al., Anti GPVI human antibodies neutralizing collagen-induced platelet aggregation isolated from a recombinant phage. Human. Antibodies. 2002; 11(3):97-105). Pueden prepararse construcciones scFv uniendo dominios variables de cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) juntos mediante un enlazador polipeptídico (por ejemplo, véase Asvadi P et al. Expression and functional analysis of recombinant scFv and diabody fragments with specificity for human RhD. J Mol Recognit 15:321-330, 2002). Los péptidos generados después seleccionados (y entonces posiblemente mejorados) mediante este enfoque se han usado en ensayos ELISA y tipo ELISA de sus dianas (por ejemplo, véase Schlattner U et al. Isoenzyme-directed selection and characterization of anti-creatine kinase single chain Fv antibodies from a human phage display library. Biochim Biophys Acta. 2002 Dic. 12; 1579(2-3): 124-32; Oelschlaeger P et al. Fluorophor-linked immunosorbent assay: a time- and cost-saving method for the characterization of antibody fragments using a fusion protein of a single-chain antibody fragment and enhanced green fluorescent protein. Anal Biochem. 2002 Oct. 1; 309(1):27; Nathan S et al. Phage display of recombinant antibodies toward Burkholderia pseudomallei exotoxin. J Biochem Mol Biol Biophys.

2002 Feb.; 6(1):45-53; Lu D et al. Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments. *J Immunol Methods*. 2002 Sep. 15; 267(2): 213-26; Zhang W et al. Production and characterization of human monoclonal anti-idiotypic antibodies to anti-dsDNA antibodies. *Lupus*. 2002; 11(6):362-9; Reiche N et al. Generation and characterization of human monoclonal scFv antibodies against *Helicobacter pylori* antigens. *Infect Immun*. 2002 Ago.; 70(8): 4158-64; Rau D et al. Single-chain Fv antibody-alkaline fosfatase fusion proteins produced by one-step cloning as rapid detection tools for ELISA. *J Immunoassay Immunochem*: 2002; 23(2): 129-43; y Zhou B et al. Human antibodies against spores of the genus *Bacillus*: a model study for detection of and protection against anthrax and the bioterrorist threat. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Abr. 16; 99(8): 5241-6; Baek H et al., An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. *Nucleic Acids Res*. 2002 Mar. 1; 30(5):e18).

Las construcciones scFv pueden basarse en anticuerpos, como en la mayoría de las referencias anteriores, en receptores de células T (por ejemplo, Epel M et al. A functional recombinant single-chain T cell receptor fragment capable of selectively targeting antigen-presenting cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2002 Dic.; 51(10): 565-573), o en otras secuencias. Se han usado diferentes proteínas de la cubierta del fago para presentar los péptidos diversos (véase Gao C et al. A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Oct. 1; 99(20):12612-6). Para un ejemplo de construcciones de fusión, véase Lu D et al. Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments. *J Immunol Methods*. 2002 Sep. 15; 267(2): 213-26.

Para un ejemplo de evolución molecular para mejorar la afinidad de unión, véase Rau D et al. Cloning, functional expression and kinetic characterization of pesticide-selective Fab fragment variants derived by molecular evolution of variable antibody genes. *Anal Bioanal Chem*. 2002 Ene.; 372(2): 261-7. Ejemplos de otras modificaciones "para mejorar la afinidad o avidéz, respectivamente [incluyen] mutar restos cruciales de regiones determinantes de complementariedad o aumento de la cantidad de sitios de unión creando moléculas dimericas, triméricas o multiméricas" (la cita es de un artículo de revisión, Pini A y Bracci L, Phage display of antibody fragments. *Curr Protein Pept Sci*. 2000 Sep.; 1(2): 155-169). El conjunto inicial de moléculas diversas puede enriquecerse usando secuencias de animales o seres humanos expuestas a o que expresan anticuerpos contra la diana (véase de nuevo Zhang W et al. *Lupus* 2002; y Reiche N et al. *Infect Immun* 2002).

Los anticuerpos de cadena sencilla también pueden generarse usando *Escherichia coli* (véase Sinacola JR y Robinson AS, Rapid folding and polishing of single-chain antibodies from *Escherichia coli* inclusion bodies, *Protein Expr Purif*. 2002 Nov.; 26(2): 301-308).

Los no anticuerpos también incluyen aptámeros y no anticuerpos que comprenden aptámeros. Los aptámeros son moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado (por ejemplo, de combinaciones aleatorias) basado en su capacidad de unirse a otra molécula (analizado por ejemplo en el sitio web del [Ellington lab](http://ellingtonlab.org), en el [Institute of Cellular and Molecular Biology](http://icmb.utexas.edu), en la [University of Texas at Austin](http://aptamer.icmb.utexas.edu), <http://aptamer.icmb.utexas.edu>), donde dicha molécula puede ser un ácido nucleico, un compuesto orgánico pequeño, o una proteína, péptido, o péptido modificado (tal como trombospondina o una parte de la misma). Una baliza de aptámero es un ejemplo de un no anticuerpo que comprende un aptámero (véase Hamaguchi N et al., Aptamer beacons for the direct detection of proteins. *Anal. Biochem*. 2001 Jul. 15; 294(2): 126-131).

La angiocidina es un receptor de adhesión de células tumorales específico de CSVTCG, véase la solicitud de patente WO 0105968, también los números de acceso de proteína de NCBI [CAC32386.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CAC32386.1) y/o [CAC32387.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CAC32387.1) (correspondientes a los números de acceso de nucleótido [AX077201](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AX077201) y [AX077202](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AX077202)), estando las secuencias de aminoácidos especificadas por esos dos números de acceso de proteína en la fecha de presentación de esta solicitud, incorporadas en este documento por referencia. Se entiende que el ADNc del factor anti-secretor contiene secuencia esencialmente idéntica de nucleótidos (por ejemplo, nº de acceso [U24704](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/U24704), 99 % coincidente por alineación BLAST) a la de angiocidina, como la secuencia de nucleótidos para la subunidad de proteasoma (prosome, macropaina) 26S, no ATPasa, 4 (PSMD4; por ejemplo, nº de acceso [NM\\_002810](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002810), también 99 % coincidente por BLAST). El factor anti-secretor tiene la misma secuencia de aminoácidos que angiocidina, excepto que [AX077201](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AX077201) tiene un inserto de 9 pb en comparación con [AX077202](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AX077202), lo que significaría tres restos aminoácido adicionales en la proteína codificada. Por tanto, los términos en este documento se usan de forma intercambiable. El sumario NCBI para [NM\\_002810](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_002810) es el siguiente: "El proteasoma 26S es un complejo proteinasa multicatalítico con una estructura muy ordenada compuesta por 2 complejos, un núcleo 20S y un regulador 19S. El núcleo 20S está compuesto por 4 anillos de 28 subunidades no idénticas; 2 anillos están compuestos por 7 subunidades alfa y 2 anillos están compuestos por 7 unidades beta. El regulador 19S está compuesto de una base, que contiene 6 subunidades ATPasa y 2 subunidades no ATPasa, y una tapadera, que contiene hasta 10 subunidades no ATPasa. Los proteasomas están distribuidos en todas las células eucariotas a una alta concentración y escinden péptidos en un proceso dependiente de ATP/ubiquitina en una vía no lisosómica. Una función esencial de un proteasoma modificado, el inmunoproteasoma, es el procesamiento de péptidos MHC clase I. Este gen codifica una de las subunidades no ATPasa de la tapadera de regulador 19S. Se han descritos dos transcritos alternativos que codifican dos isoformas diferentes. Se han identificado pseudogenes en los cromosomas 10 y 21. Transcrito variante: esta variante (1) codifica la proteína más larga (isoforma 1)." Otros nombres para la proteína del archivo de acceso de la proteína ([NP\\_002801.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NP_002801.1)) incluyen "isoforma 1 de la subunidad 4 no ATPasa de proteasoma 26S; factor antisecretor

1; subunidad S5a de proteasa 26S; proteína S5a/factor antiseoretor; proteína de unión a cadena de multiubiquitina; subunidad reguladora 4 no ATPasa de proteasoma 26S".

Métodos para producir anticuerpos contra los fragmentos

5 Se describe un método para producir anticuerpos contra un fragmento de trombospondina indicado anteriormente y/o parte del mismo, comprendiendo el método administrar dicho fragmento o parte a un organismo (especialmente un mamífero o un ave) capaz de producir anticuerpos. Se entiende que dicho anticuerpos pueden comprender anticuerpos monoclonales y/o anticuerpos policlonales. Para anticuerpos monoclonales se entiende que se usan normalmente células del organismo en la producción de hibridomas. Para la producción de anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, se entiende que puede conjugarse cualquiera de los fragmentos de trombospondina y/o partes a una molécula vehículo, incluyendo aunque sin limitación hemocianina de lapa californiana y albúmina sérica bovina, para facilitar la respuesta del anticuerpo.

15 También se describen una célula y una línea celular para producir los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente. Ejemplos de dichas células incluyen, aunque sin limitación, hibridomas, líneas celulares transfectadas, y células infectadas.

Kits

20 Los kits referidos anteriormente son aspectos en sí mismos de la invención. Dichos kits son, por ejemplo, aquellos que facilitan la determinación de la presencia de, y/o la cantidad de, y/o la concentración de, un fragmento o fragmentos de trombospondina en un material recogido o recabado de un organismo. Dichos kits opcionalmente comprenden un fragmento o fragmentos de trombospondina, o una parte o partes de los mismos, de la invención. Dichos kits pueden comprender un agente o agentes de unión específicos para un fragmento de trombospondina, o parte del mismo, de interés. Opcionalmente comprenden agentes de unión que reaccionarán con trombospondina pero no un fragmento o fragmentos, y/o una parte o partes de los mismos, de interés. Opcionalmente comprenden agentes de unión que distinguen entre trombospondina y un fragmento, y/o entre un fragmento y otro. Si se pretenden para tejido sólido, los kits pueden comprender un medio de homogenización para extraer un fragmento en una solución, que opcionalmente también puede proporcionarse. Los agentes de unión de la presente invención también pueden usarse para otros métodos de detección bien conocidos, incluyendo aunque sin limitación inmunohistoquímica.

35 Agentes de unión preferidos son proteínas, aunque también se contemplan no proteínas. Dichas proteínas incluyen tanto anticuerpos como no anticuerpos.

Opcionalmente, los kits comprenden un medio para separar o distinguir un fragmento o fragmentos (o partes de los mismos) de trombospondina. Los kits can también incluyen un fragmento de trombospondina, un péptido derivado de dicho fragmento, o un fragmento o péptido derivatizado, para facilitar la detección y calibrado.

40 En un conjunto de realizaciones, los kits están adaptados para su uso en un ensayo automatizado, tal como uno que usa un autoanalizador clínico.

45 Aspectos particulares del kit de la invención también pueden resumirse del siguiente modo:

Un kit para la determinación de la presencia de, y/o la cantidad de, y/o la concentración de, un fragmento o fragmentos de trombospondina en un material recogido o recabado de un organismo, comprendiendo dicho kit un fragmento de trombospondina o parte del mismo.

50 Un kit para la determinación de la presencia de, y/o la cantidad de, y/o la concentración de, uno o más fragmentos de trombospondina en a material recogido o recabado de un organismo, comprendiendo dicho kit un agente de unión capaz de unirse a uno o más fragmentos.

Son realizaciones particulares:

- 55 Dichos kits donde el agente de unión comprende una proteína.
- Dichos kits donde dicha proteína comprende un anticuerpo.
- Dichos kits donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.
- Dichos kits donde dicha proteína comprende un fragmento de un anticuerpo.
- 60 Dichos kits donde dicha proteína comprende un anticuerpo de cadena sencilla.
- Dichos kits donde dicho anticuerpo de cadena sencilla se obtiene de una biblioteca de presentación en fagos.
- Dichos kits donde dicha proteína es un no anticuerpo, siendo el no anticuerpo una proteína que no es un anticuerpo de múltiples cadenas ni un anticuerpo de cadena sencilla.
- 65 Dichos kits donde dicha no anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en un receptor de trombospondina, un receptor de trombospondina que se une dentro de la región central resistente a proteasa, un receptor de trombospondina que se une a un fragmento TSP presente en el plasma de un paciente con cáncer,

un receptor de CSVTCG, una molécula de unión a CSVTCG, una CD36 (que supuestamente se une a CSVTCG; véase Carron JA et al., A CD36-binding peptide from thrombospondin-1 can stimulate resorption by osteoclasts in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Abr. 21; 270(3): 1124-7), angiocidina, factor anti-secretor, subunidad reguladora 4 no ATPasa del proteasoma 26S, fragmentos de los mismos que se unen a sus respectivas dianas, y combinaciones, quimeras, y versiones recombinantes de dichos receptores y fragmentos.

Dichos kits donde dicho agente de unión comprende una no proteína.

Dichos kits donde dicho agente de unión comprende un aptámero.

Dichos kits donde dicho agente de unión comprende angiocidina, factor anti-secretor, y/o subunidad reguladora 4 no ATPasa del proteasoma 26S.

Otros aspectos particulares del kit de la invención pueden resumirse del siguiente modo:

Un kit para la determinación de la presencia de, y/o la cantidad de, y/o la concentración de, uno o más fragmentos de trombospondina en un material recogido o recabado de un organismo, comprendiendo dicho kit un agente de unión que reaccionará con pero no con un fragmento de interés. Son realizaciones particulares:

Dichos kits donde dicho agente de unión comprende una proteína;

Dichos kits donde dicha proteína comprende un anticuerpo;

Dichos kits donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal;

Dichos kits donde dicha proteína comprende un fragmento de un anticuerpo;

Dichos kits donde dicha proteína comprende un anticuerpo de cadena sencilla;

Dichos kits donde dicho anticuerpo de cadena sencilla se obtiene de una biblioteca de presentación en fagos;

Dichos kits donde la proteína es un no anticuerpo, siendo el no anticuerpo una proteína que no es un anticuerpo ni un anticuerpo de cadena sencilla;

Dichos kits donde dicho no anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en una integrina, un receptor de RGD, un receptor de RFYVVMWK, un receptor de RFYVVM, un receptor de FYVVMWK, un receptor de IRWM, fragmentos de los mismos que se unen a sus respectivas dianas, y combinaciones, quimeras, y versiones recombinantes de dichos receptores, integrinas, y fragmentos; y

Dichos kits donde dicho agente de unión comprende un aptámero, que significa un ADN o ARN o compuesto relacionado, que se une a trombospondina o un fragmento de trombospondina.

Dichos kits donde dicho agente de unión comprende angiocidina, factor anti-secretor, y/o subunidad reguladora 4 no ATPasa del proteasoma 26S.

Se muestran varios motivos en trombospondina para unirse a muchos de los receptores mencionados anteriormente en la Figura 2.2a de Adams, J.C., et al., The thrombospondin Gene Family, Springer Verlag, Nueva York, 1995, pág.16. Un receptor de CSVTCG, una molécula de unión a CSVTCG, una angiocidina, un factor anti-secretor, una CD36, y/o fragmentos y derivados de los mismos serán útiles para ensayar un fragmento de trombospondina en un paciente con cáncer.

#### Centralización en enfermedad neoplásica

La invención que pertenece a la detección o control de enfermedad neoplásica se describe en la reivindicación 1.

Por ejemplo, dicho método donde cuanto mayor es el grado al cual el nivel plasmático de fragmento de trombospondina del primer individuo excede el nivel plasmático de trombospondina del segundo individuo, mayor es la probabilidad de que el diagnóstico sea de que el primer individuo tiene una enfermedad neoplásica y/o una enfermedad neoplásica más avanzada que la de la segunda persona. También se entiende que valores del primer individuo tomados en el tiempo pueden compararse con otros, para evaluar la probabilidad de aparición de enfermedad y/o progresión y/o regresión de enfermedad. Son realizaciones particulares:

Dichos métodos donde el fragmento se selecciona entre el grupo que consiste en un fragmento de ~85 a 90 kDa, y fragmento de ~50 kDa, y un fragmento de ~30 kDa, donde el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro;

Dichos métodos donde la enfermedad neoplásica se selecciona entre el grupo que consiste en un adenoma, adenocarcinoma, carcinoma, linfoma, leucemia, y sarcoma;

Dichos métodos donde la enfermedad neoplásica es un cáncer interno;

Dichos métodos donde la enfermedad neoplásica se selecciona entre el grupo que consiste en un cáncer del sistema respiratorio, un cáncer del sistema circulatorio, un cáncer del sistema musculoesquelético, un cáncer de un músculo, un cáncer de un hueso, un cáncer de una articulación, un cáncer de un tendón o ligamento, un cáncer del sistema digestivo, un cáncer del hígado o sistema biliar, un cáncer del páncreas, un cáncer de la cabeza, un cáncer del cuello, un cáncer del sistema endocrino, un cáncer del sistema reproductor, un cáncer del sistema reproductor masculino, un cáncer del sistema reproductor femenino, un cáncer del sistema genitourinario, un cáncer de un riñón, un cáncer del tracto urinario, un cáncer de piel, un cáncer de otros órganos sensoriales (tales como ojo, oído, nariz, lengua), un cáncer del sistema nervioso, un cáncer de un órgano linfoide, un cáncer de sangre, un cáncer de una glándula, un cáncer de una glándula mamaria, un cáncer de una glándula prostática, un cáncer de tejido endometrial, un cáncer de tejido mesodérmico, un cáncer de tejido

ectodérmico, y un teratoma;

Dichos métodos donde la enfermedad neoplásica se selecciona entre el grupo que consiste en un cáncer de tejido sólido, un cáncer de la sangre o el sistema linfático, un cáncer no metastásico, un cáncer premetastásico, un cáncer metastásico, un cáncer mal diferenciado, un cáncer bien diferenciado, y un cáncer moderadamente diferenciado.

Dichos métodos donde la medición de un nivel plasmático de fragmento de trombospondina comprende el uso de un agente de unión, siendo dicho agente de unión capaz de unirse a dicho fragmento de trombospondina (dichos agentes de unión se han analizado anteriormente en el contexto de los kits de la invención); y

En realizaciones particulares, el fragmento de trombospondina se separa de trombospondina antes de que dicho fragmento se una al agente de unión.

Dichos métodos donde dicho método comprende el uso de un agente de unión, que comprenden un agente de unión capaz de unirse a trombospondina pero no al fragmento de trombospondina. Se han analizado anteriormente posibles agentes de unión en el contexto de kits de la invención.

En realizaciones particulares, el fragmento de trombospondina se separa de trombospondina antes de que dicho fragmento se una al agente de unión.

Son descripciones relacionadas:

Un método para producir anticuerpos contra un fragmento de trombospondina, comprendiendo dicho método administrar dicho fragmento a un organismo capaz de producir anticuerpos;

Dicho método para producir anticuerpos donde dicho fragmento es de al menos 6 restos aminoácido de longitud pero de menos de 110 kDa (preferiblemente menos de 95 kDa). Una preparación de anticuerpo policlonal producida por dicho método;

Un anticuerpo monoclonal producido por dicho método;

Una línea celular que produce dicho anticuerpo monoclonal; y

Un método para producir un agente de unión contra un fragmento de trombospondina, comprendiendo dicho método el uso de presentación en fagos.

Dicho método para producir un agente de unión, donde dicho método comprende la selección de un fago de unión a trombospondina o de unión a fragmento de trombospondina de una presentación en fagos.

Dicho método para producir un agente de unión, donde dicho fragmento es de al menos 6 restos aminoácido de longitud.

#### Método de detección de cáncer que comprende medir la activación de plaquetas

Una descripción general adicional es un ensayo para la presencia de cáncer en un organismo, comprendiendo dicho método medir el grado de activación de plaquetas.

#### **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1. Dibujo esquemático de trombospondina.

Figura 2. Resultados de tinción de un gel con azul de Coomassie. Los carriles, de izquierda a derecha son en la secuencia: un carril con los patrones de peso molecular (patrones), seguido de las muestras A a G.

Figura 3. Resultados de análisis de transferencia de Western usando anticuerpo TSP Ab-4 y detección de fluorescencia. Los carriles, de izquierda a derecha son en la secuencia: un carril con los patrones de peso molecular (patrones), seguido de las muestras A a G, que corresponden a alícuotas de las mismas muestras que en la Figura 2.

Figura 4. Análisis de las mismas muestras que para la Figura 3, usando desnaturalización con urea antes de electroforesis, seguida de electroforesis a través de un gel de acrilamida al 12 % y detección colorimétrica enzimática después de la transferencia.

#### **Descripción detallada de la invención**

Los términos "trombospondina" y "trombospondina-1" se usan de forma intercambiable en este documento. Se entiende que una única "banda" en un gel de electroforesis puede de hecho reflejar la presencia de un conjunto de fragmentos que juntos forman una población que, durante la electroforesis en gel en condiciones reductoras, migran electroforéticamente a velocidades similares.

Los términos "prueba" y "ensayo" también se usan de forma intercambiable.



Un fragmento "purificado" es por ejemplo (1) uno que se encuentra en plasma humano y que se ha purificado (por ejemplo se ha aislado de geles en que el plasma se ha sometido a electroforesis). Un fragmento purificado no es uno que está en plasma humano, u otra parte de un ser humano, y que no ha experimentado al menos algún grado de purificación.

5 Un "fragmento sintetizado" es, por ejemplo, uno que se ha sintetizado en un laboratorio (por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante o por síntesis química) para tener la estructura primaria de dicho fragmento o una parte del mismo.

10 La secuencia de aminoácidos de trombospondina-1 humana de GenBank es: ACCESO [NM\\_003246](#) (proteína\_id = NP\_003232.1)  
 VERSIÓN NM\_003246.1 GI:4507484

15 **MGLAWGLGVLFLMHVCGTNRIPESGGDNSVFDIFELTGAARKGSGRRLVKGPDPSS**  
**PAFRIEDANLIPPWDDKFQDLVDAVRAEKGFLLLASLRQMKKTRGTLLALERKDHS**  
**GQVFSWSNGKAGTLDLSLTVQGKQHWSVEEALLATGQWKSITLQVQEDRAQLYI**  
**DCEKMENAELDWIQSWTRDLASIALRLRIAKGGVNDNFQGVLQNVRFVFGTTPEDI**  
**LRNKGCSSTSVLLTLDNNVWGSSPAIRTNYIGHKTKDLQAICGISDELSSMVLEL**  
**RGLRRTIVTTLQDSIRKVTENKELANELRRPPLCYHNGVQYRNNEEWTVDSCTECH**  
 20 **CQNSVTICKKVSFCPIMPCSNATVPDGECCPRCWPSDSAADDGWSPWSEWTSCSTSCG**  
**NGIQQRGSCDSLNNRCEGSSVQTRTCHIQECDKRFKQDGGWSHWSPWSSCSVTCG**  
**DGVITRIRLNCNSPQMNGOCEGEAJRETAKCKKDACPINGGWGPWSPWDICSVTC**  
**GGGVQKRSRLCNPAPQFGGKDCVGDVTENQICNKQDCPIDGLSNPCFAGVKCTS**  
**YPDGSWCKGACPPGYSGNGIQCTDVDECKEVPDAFCFNHNGEHRCENTDPGYNCLP**  
 25 **CPPRFTGSQPFQGVVEHATANKQVCKPRNPCTDGTHTDCNKNACWYLGHYSDPMY**  
**RCECKPGYAGNGIICGEDTDLGWPNENLVCVANATYHCKKDNCPNLNSGQEDY**  
**DKDGIGDACDDDDNDKIPDDRDNCPFHYNPAQYDYDRDDVGDRCDCNCPYHNHNP**  
**DQADTKNKGEDACAADIDGDGILNERDNCQYVYNVDQRDTMDGVGDQDCDC**  
**PLEHNPDQLSDSDRIGDTCNNDQDIDEDGHQNNLDNCPYVNPANQADHDKDGGK**  
 30 **DACDHHDDNDGIPDDKDNCRLLVNPDPQKSDGDRGDA CKDDFDHDSVPDIDDIC**  
**PENVDISETDFRRFQMIPLDPKGTSONDPNWVVRHQGKELVQTVNCDPGLAVGYDE**  
**FNAVDFSGTFFINTERDDDYAGFVFGYQSSSRFYVVMWKQVTQSYWDTNPTRAQG**  
**YGLSVKVVNSTTGPGEHLPJSTALWHTGNTPGQVRTLWHDPRHIGWKDFTAYRWR**  
**LSHRPKTGFRVVMYEGKIOMADSGPIYDKTYAGGRLGLFVFSQEMVFFSDLKYEC**  
 35 **RDP (SEC ID N° 38)**

La N subrayada en la primera línea de la secuencia anterior se refiere al aminoácido número 1 de la proteína madura (es decir, sin la secuencia de péptido señal de 18 a 22 restos, que aquí se supone que es de 18 restos; véase la pág. 13 y Figura 1 en Adams JC et al. The Thrombospondin Gene Family, 1995).

40 Aquí hay una versión parcialmente anotada de la secuencia de TSP-1 humana de GenBank, descompuesta en dominios, y que incluye indicaciones de algunas de las regiones funcionales que se han identificado en la bibliografía.

45 **MGLAWGLGVLFLMHVCGT (SEC ID N° 39)** [Se considera que el péptido señal es de 18-22 restos de longitud (aquí se supone que es de 18 restos, siguiente The Thrombospondin Gene Family por JC Adams et al. 1995)]  
**NRIPESGGDNSVFDIFELTGAARKGSGRRLVKGPDPSSPAFRIEDANLIPPVPDDKFQDLVD**  
**AVRAEKGFLLLASLRQMKKTRGTLLALERKDHS****GQVFSVVSNGKAGTLDLSLTVQGKQHVVS**  
**VEEALLATGQWKSITLQVQEDRAQLYIDCEKMENAELDVPIQSVFTRDLASIALRLRIAKGGV**  
 50 **NDNFQGVLQNVRFVFGTTPEDILRNKGCSSTSVLLTLDNNVWGSSPAIRTNY (SEC ID N° 40)** [dominio N-terminal (1-240). La N subrayada al inicio de este dominio se refiere al aminoácido número 1 de la proteína madura (es decir, sin la secuencia de péptido señal de 18 a 22 restos, que aquí se supone que es de 18 restos; véase la pág. 13 y la Figura 1 en Adams JC et al. The Thrombospondin Gene Family, 1995). Dos regiones aparentes de unión a heparina están doblemente subrayadas. Finalmente, la última región subrayada en este dominio corresponde al "péptido sintético N12/I que abarca los restos de aminoácido 151-164 del dominio N-terminal de TSP-1", que se informó que se une a fibrinógeno.]  
**IGHKTKDLQAICGISDELSSM (SEC ID N° 41)** [Dominio de enlaces disulfuro intercatenarios (241-262)]  
**VLELRGLRRTIVTTLQDSIRKVTENKELANELRRPPLCYHNGVQYRNNEEWTVDSCTECHCQNSVTICKKVSFCPIMPC**  
**SNATVPDGECCPRCWPSDSA [(SEC ID N° 42)** [Dominio de homología de procolágeno (263-360). Obsérvese que la región de unión a colágeno V (valina[333] a lisina[412]), que está doblemente subrayada aquí, está parcialmente  
 60 en este dominio y parcialmente en la primera repetición tipo 1, que sigue inmediatamente a este dominio.]  
**DDGWSPWSEWTSCSTSCGNGIOORGRSCDSLNNRCEGSSVQTRTCHIQECDKRFKQ**  
**DGGWSHWSPWSSCSVTCGDGVITRIRLNCNSPQMNGKPCGEARETKACKKDACPI**  
**NGGWGPWSPWDICSVTCGGGVQKRSRLCNPAPQFGGKDCVGDVTENQICNKQDCPI (SEC ID N° 43)** [Dominio  
 65 de repeticiones tipo 1 (361-530). Este dominio consiste en tres repeticiones tipo 1. El segmento doblemente subrayado en el principio de este dominio es la continuación de la región de unión a colágeno V (valina[333] a

lisina[412]).]

DGCLSNPCFAGVKCTSYPDGSWKCGACPPGYSNGIQCTDV  
 DECKEVPDACFNHNGEHRCENTDPGYNCLPCPPRFTGSQPFQGGVEHATANKQVCKPR  
 NPCTDGTDCNKNKAC-NYLGHYSMPYRCECKPGYAGNGIICGE (SEC ID N° 44)

- 5 [Dominio de repeticiones tipo 2 (531-673). Este dominio consiste en tres repeticiones tipo 2.]  
 DTDLDGWPENLVCVANATYHCKK (SEC ID N° 45) [Región entre la repetición tipo 2 y la tipo 3 (674-697)]  
 DNCPNLPNSGQEDYDKDGIGDACDDDDNDKIPDDR (SEC ID N° 46)  
 DNCPFHYNPAQYDYDRDDVGDRC (SEC ID N° 47)  
 DNCPYNHNPQADTDNNGEGDACAADIDGGILNER (SEC ID N° 48)  
 10 DNCQVYVNVQDRDMDGVDGQC (SEC ID N° 49)  
 DNCPLEHNPQQLSDSDRIGDTCDNNQDIDEDGHQNNL (SEC ID N° 50)  
 DNCPYVNPANQADHDKDGGKGDACDHDDDDNDGIPDDK (SEC ID N° 51)  
 DNCRLVNPNDQKSDSDGDRGDACKDDFDHDSVPDID (SEC ID N° 52) [Dominio de repeticiones tipo 3 (698-925).  
 Este dominio consiste en siete repeticiones tipo 3.]  
 15 DICPENVDISETDFRRFQMIPLDPKGTSQNDPNWVVRHQGKELVQTVNCDPGLAVGYDEFN  
 AVDFSGTFFINTERDDDYAGFVFGYQSSSRFYVVMWKQVTQSYWDTNPTRAQGYGLSVKV  
 VNSTTGPEHLRNALWHTGNTPGQVRTLWHDPRHIGWKDFTAYRWRLSHRPKTGFIRVVMY EGKKIMADSGPIYD-  
 KTYAGGRLGLFVFSQEMVFFSFLKYECRDP (SEC ID N° 53)  
 [dominio C-terminal (926-1152)]

20 Se entiende que existen variantes genéticas de trombospondina, incluyendo aunque sin limitación polimorfismos  
 humanos (por ejemplo, véase dbSNP:2229364, dbSNP:2228261, dbSNP:2292305, dbSNP:2228262, y  
 dbSNP:2228263 para variantes en la región codificante; y dbSNP:1051442, dbSNP:3743125, dbSNP:3743124,  
 dbSNP:1051514, dbSNP:1131745, y dbSNP:11282 para variantes de UTR 3'). La presente invención contempla  
 25 ensayos que detectan variantes polimórficas así como tipos comunes que implican la región codificante, a través del  
 uso de un anticuerpo o anticuerpos u otra molécula o moléculas de unión que reconocen secuencias peptídicas  
 variantes y comunes, y/o a través del uso de secuencias que no son polimórficas. Se entiende que A-505  
 [alanina(505)] en la secuencia de GenBank NM\_003246 se da en cambio como T [treonina(505)] en la Figura 2.2a  
 del Capítulo 2, "The primary structure of the thrombospondins" en The Thrombospondin Gene Family por JC Adams,  
 30 RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995, pág. 16.

Se cree que el dominio de unión a colágeno tipo V corresponde a la región que se extiende desde valina(333) y  
 lisina(412) de trombospondina-1 (Takaçi T et al. J Biol Chem 268:15544-15549, 1993; aquí, los números de los  
 35 restos se refieren a la proteína madura). Por tanto, la región de unión a colágeno tipo V incluiría una parte de la  
 región de homología de procolágeno de trombospondina y todo o casi todo de la primera repetición tipo 1 de  
 trombospondina (véase Capítulo 2, "The primary structure of the thrombospondins" en The Thrombospondin Gene  
 Family por JC Adams, RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995, pág. 11-42, pero especialmente  
 pág. 24). Véase la Figura 1 de esta solicitud, así como la secuencia TSP anotada, anteriormente. Como se indica en  
 la Figura 1 de esta solicitud, el rectángulo más a la izquierda representa el dominio N-terminal (restos maduros 1 a  
 40 ~240), que contiene la secuencia de unión a heparina; las líneas verticales cortas representan Cys(252) y Cys(256)  
 de trombospondina-1 humana, que están implicadas en enlaces disulfuro intercatenarios, para formar trímeros; el  
 primer óvalo representa el dominio de homología de procolágeno (restos 263-360); los tres óvalos sesgados  
 representan las tres repeticiones tipo 1 (restos 361-530), que se parecen a properidina y una proteína de malaria; los  
 tres óvalos altos representan las tres repeticiones tipo 2 (restos 531-673), que muestran similitudes con la repetición  
 45 del factor de crecimiento epidérmico (EGF); existe una corta secuencia (restos 674-697) que separa las repeticiones  
 tipo 2 y tipo 3; los siete óvalos representan las siete repeticiones tipo 3 (restos 698-925), que son ricas en ácido  
 aspártico y se parecen al bolsillo de unión a calcio de parvalbúmina o calmodulina; y el cuadrado a mano derecha  
 representa el dominio de unión celular C-terminal (restos 926 hasta el final, es decir, Prolina-1152; véase la Figura  
 2.2a en Adams JC et al. The Thrombospondin Gene Family. 1995, pág. 16). Los dos fragmentos quimotripticos (70 y  
 50 50 kDa), y en algún grado el fragmento tríptico de 120 kDa, indicados esquemáticamente en la Figura 1,  
 corresponden al dominio principal central resistente a proteasa de trombospondina.

Ejemplos de cánceres que pueden detectarse usando ensayos para los fragmentos de trombospondina incluyen  
 aunque sin limitación: adenoma, adenocarcinoma, carcinoma, linfoma, leucemia, sarcoma, cáncer sólido, cáncer  
 55 líquido, cáncer metastásico, cáncer pre-metastásico, cáncer no metastásico, un cáncer con invasión vascular,  
 cáncer interno, cáncer de piel, cáncer del sistema respiratorio, cáncer del sistema circulatorio, cáncer del sistema  
 musculoesquelético, cáncer de un músculo, cáncer de un hueso, cáncer de una articulación, cáncer de un tendón o  
 ligamento, cáncer del sistema digestivo, cáncer del hígado o sistema biliar, cáncer del páncreas, cáncer de la  
 cabeza, cáncer del cuello, cáncer del sistema endocrino, cáncer del sistema reproductor, cáncer del sistema  
 60 reproductor masculino, cáncer del sistema reproductor femenino, cáncer del sistema genitourinario, cáncer de un  
 riñón, cáncer del tracto urinario, cáncer de un sistema sensorial, cáncer del sistema nervioso, cáncer de un órgano  
 linfoide, un cáncer de sangre, cáncer de una glándula (por ejemplo, aunque sin limitación cáncer de una glándula  
 mamaria o prostática), cáncer de un tejido endometrial, cáncer de un tejido mesodérmico, cáncer de un tejido  
 ectodérmico, cáncer de un tejido endodérmico, un teratoma, un cáncer mal diferenciado, un cáncer bien  
 65 diferenciado, y un cáncer moderadamente diferenciado.

Una de las opciones para ensayar la presencia de fragmentos de trombospondina es fraccionar el material (por ejemplo, plasma) en fracciones (por ejemplo, posiciones en un gel de electroforesis, o muestras de elución cromatográfica) recogidas mediante una técnica capaz de separar los fragmentos de trombospondina (por ejemplo, por electroforesis, cromatografía dependiente de tamaño, y/o cromatografía de afinidad) y de detectar los fragmentos en las fracciones donde se esperaría que dichos fragmentos aparecieran. Otra de las diversas opciones conocidas adicionales para los ensayos es ensayar la capacidad del plasma de inhibir la unión de fragmentos de trombospondina o partes de los mismos a compuestos (por ejemplo, anticuerpos) que se unen específicamente a ellos.

Los fragmentos de trombospondina de interés principal en los ensayos de diagnóstico son los que tienen pesos moleculares aparentes de ~85 kDa (o ~90 kDa), ~50 kDa, y ~30 kDa determinados por electroforesis en SDS-PAGE después de reducción (véanse las Figuras 3 y 4). Las condiciones preferidas para determinar los pesos moleculares son aquellas mencionadas a continuación como "protocolo de electroforesis en gel convencional". La asignación de un número tal como 50 kDa al tamaño de un fragmento refleja su peso molecular aproximado determinado usando el Protocolo de electroforesis en gel convencional.

Se cree que los fragmentos de ~85 kDa, ~50 kDa, y ~30 kDa contienen todos una parte inmunogénica de "dominio de unión a colágeno tipo V" de trombospondina. En un aspecto preferido de la invención, los fragmentos se detectan por anticuerpo que se une a dicho dominio, que se cree que es el caso para el anticuerpo monoclonal TSP Ab-4 mencionado a continuación. Como el dominio de unión a colágeno V es relativamente pequeño (~19 kDa; véase Takagi et al. JBC 1993), se concluye a partir de los pesos moleculares aparentes de estos fragmentos, que son sustancialmente mayores de 19 kDa, que también deben estar presentes partes adicionales de la molécula de trombospondina en estos fragmentos (multímeros de la región de 19 kDa no son una explicación plausible para los mayores pesos moleculares, porque la región de 19 kDa no comprende la región de enlaces disulfuro intercatenarios, más el hecho de que los geles en las Figuras 3 y 4 se ejecutaron en condiciones reductoras). Se cree que las partes adicionales provienen del dominio principal central resistente a proteasa de trombospondina, que puede seleccionarse entre el grupo de dominios de trombospondina que consiste en la región de enlaces disulfuro intercatenarios, el dominio tipo procolágeno, una repetición tipo 1, y hasta algún grado una repetición tipo 2 y una repetición tipo 3 (véase Prater CA et al. The properdin-like type 1 repeats of human thrombospondin contain a cell attachment site. J Cell Biol. 1991 Mar.; 112(5): 1031-40; Schultz-Cherry S et al. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. J Biol Chem. 1994 Oct. 28; 269(43): 26783-8; Figura 6.2 en Adams JC et al. The Thrombospondin Gene Family. 1995, pág. 107; y fragmentos quimotripticos y tripticos de trombospondina indicados esquemáticamente en la Figura 1 de esta solicitud). Véase también los intervalos de secuencia dados anteriormente en esta solicitud. Obsérvese que varios péptidos mencionados anteriormente, tales como CNSPSPQMNGKPCEGEAR (restos 444-461), RKVTEENKELANELRPP (restos 281-297); PQMNGKPCEGEAR (restos 449-461); CEGEAR (restos 456-461; y RKVTEENKE (restos 281-289) están dentro del dominio principal central resistente a proteasa. También se prefiere un anticuerpo contra una región fuera de un dominio de unión a colágeno V, pero presente en un fragmento de trombospondina presente en una paciente con cáncer.

En ensayos de competición, se ensaya una muestra de material (por ejemplo, plasma) que contiene fragmento o fragmentos de trombospondina y/o trombospondina para su capacidad de interferir con la unión de uno (o más) de los fragmentos a un agente específico de unión a fragmento, preferiblemente un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal. En condiciones óptimas, la capacidad de la muestra de interferir con la unión del fragmento aumenta uniformemente en relación a la cantidad de fragmentos de unión de manera similar en la muestra. La trombospondina también interferirá con la unión, pero el presente inventor ha descubierto que la trombospondina está presente en plasma en cantidades significativamente más pequeñas que los fragmentos. Además, los ensayos de competición se normalizan fácilmente a través del uso de cantidades conocidas de fragmentos, sintéticos o de otro modo, y/o a través del uso de moléculas, tales como péptidos, que contienen un epítipo reconocido por el agente de unión. En un escenario, la detección del ensayo de consigue a través del uso de fragmentos y/o péptidos marcados, y la adición de una muestra que contiene un fragmento de trombospondina o la adición de cantidades conocidas de un fragmento de trombospondina no marcado (como patrón) provoca la competición con la unión de los fragmentos y/o péptido marcados al agente de unión. La pérdida de señal tras la adición de cantidades conocidas de fragmentos de trombospondina no marcados o marcados de forma diferente se usa para normalizar el ensayo.

Además de un ensayo de los fragmentos de trombospondina, otros ejemplos de ensayos de activación de plaquetas incluyen aunque sin limitación: un ensayo de tromboxano, un ensayo de B2, un ensayo de beta-tromboglobulina (BTG), un ensayo de factor de crecimiento derivado de plaquetas, un ensayo de fibronectina, un ensayo de fibrinógeno, y un ensayo de factor plaquetario 4. Cada uno de éstos puede ensayarse mediante ensayos basados en anticuerpo, tal como un ELISA o un ELISA competitivo, como se sabe bien en la técnica. La activación de plaquetas, incluyendo la formación de trombos plaquetarios, también se indica por marcadores que incluyen constituyentes de membrana, tales como P selectina (que puede ensayarse, por ejemplo, como P-selectina soluble, que se genera como una forma de corte y ajuste alternativo o se libera proteolíticamente de P-selectina unida a membrana), gpV, y glucocalicina (véase Gurney D et al.: A reliable plasma marker of platelet activation: Does it exist? Am J Hematol. 2002 Jun.; 70(2): 139-44; la glucocalicina es el dominio extracelular de GP IbaIIa, que puede liberarse de complejos

Gp Ib/IIIb en plaquetas, véase Baglia FA et al.: Factor XI binding to the platelet glycoprotein Ib-IIIb complex promotes factor XI activation by thrombin. *J Biol Chem.* 2002 Ene. 18; 277(3): 1662-8), así como micropartículas de plaquetas (véase Michelson AD y Furman MI: Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol.* 1999 Sep.; 6(5): 342-8; Nomura S et al.: Relationship between platelet activation and cytokines in systemic inflammatory response syndrome patients with hematological malignancies. *Thromb Res.* 1999 Sep. 1; 95(5): 205-13; Nomura S et al.: Function and clinical significance of platelet-derived microparticles. *Int J Hematol.* 2001 Dic.; 74(4): 397-404) y ciertos prostanoides. Los ensayos de éstos también son bien conocidos en la técnica.

#### Detección de fragmentos de trombospondina por análisis de transferencia de Western

El siguiente protocolo (Secciones I, II, y III) se menciona en este documento como el "protocolo de electroforesis en gel convencional" y se prefiere para determinar si el tamaño de un fragmento es de ~85 kDa, ~50 kDa, ~30 kDa u otro tamaño. No obstante, son bien conocidas en la técnica alternativas adecuadas para fraccionar y detectar moléculas y fragmentos moleculares (véanse numerosos artículos y textos de métodos, así como protocolos de fuentes comerciales) y se aplican fácilmente a la presente situación con modificaciones apropiadas.

#### I. Preparación de la muestra

Inhibidores de proteasa añadidos:

Se añade 1 µl de solución de leupeptina (1 mg/ml en agua estéril) por ml de plasma, se añaden 10 µl de solución de PMSF (1,74 mg/ml en isopropanol) por ml de plasma

Tampón de muestra 4X:

dH<sub>2</sub>O 4,0 ml/tris-HCl 0,5M 1,0 ml/glicerol 0,8 ml/SDS al 10 % 1,6 ml/2-mercaptoetanol 0,4 ml/azul de bromofenol al 0,05 % 0,2 ml

Se diluyen 5 µl de muestras de plasma con 20 µl de agua destilada, y se añaden 25 µl de tampón de muestra 2X, seguido de calentamiento (para ayudar a la reducción de los enlaces disulfuro).

Después se corren 10 µl de cada mezcla de muestra en el gel.

En un ejemplo de una alternativa al procedimiento de electroforesis en gel convencional, para ayudar a la reducción y desnaturalización, el plasma sanguíneo se mezcla con mercaptoetanol fresco al 5 % y urea fresca 4-6 M y se hierve durante al menos 5 minutos en una campana extractora.

#### II. Electroforesis

La electroforesis en gel se hace en geles de SDS-poliacrilamida (gel de concentración 4 %, gel de ejecución 10 %) en tampón tris/glicina/SDS (véase el tampón de ejecución a continuación, pH 8,3) a 200 V/7-8 cm a 25 °C durante 34 minutos. Son bien conocidos en la técnica configuraciones y procedimientos electroforéticos alternativos y pueden usarse (por ejemplo, usando geles de acrilamida a aproximadamente el 8 %-12 %; omisión del gel de concentración), pero deben separar de forma fiable 185 kDa, 85 kDa, 50 kDa, y 30 kDa (estos son los pesos aparentes aproximados en un gel reductor de trombospondina y de los tres fragmentos principales de trombospondina en plasma). Los patrones de peso molecular fueron: 184 kDa, 121 kDa, 86 kDa, 67 kDa, 52 kDa, 40 kDa, 28 kDa, y 22 kDa (Figura 3). También son adecuados otros marcadores de peso molecular, pero deben incluir marcadores cerca de 185 kDa (el peso aproximado de trombospondina en geles reductores) y cerca de 85, 50, y 30 kDa (los pesos aproximados en gel reductor de los fragmentos principales de trombospondina presentes en plasma). Los patrones adecuados de peso molecular se pueden adquirir de Diversas fuentes comerciales, tales como Invitrogen Life Technologies (<http://www.invitrogen.com/>).

Tampón de ejecución 5X pH 8,3: Base Tris 15 g/Glicina 72 g/SDS 5 g/agua destilada hasta 1 litro

El fragmento de ~85 kDa de trombospondina se mueve electroforéticamente cerca del patrón de 86 kD.

El fragmento de ~50 kDa de trombospondina se mueve electroforéticamente cerca del patrón de 52 kD.

El fragmento de ~30 kDa de trombospondina se mueve electroforéticamente cerca del patrón de 28 kDa.

#### III. Detección de los fragmentos en los geles

Los fragmentos pueden detectarse mediante el procedimiento de transferencia de Western usando anticuerpos que reaccionan con los fragmentos de 85 kDa, 50 kDa, y 30 kDa. Pueden usarse anticuerpos TSP Ab-4 de Lab Vision Corporation (Fremont, CA; <http://www.labvision.com/>) para este fin (como anticuerpo primario), como también pueden anticuerpos policlona anti-TSP (tales como Ab-8, un anticuerpo policlona de conejo de Lab Vision). Siguiendo protocolos convencionales, se transfieren proteínas desde el gel de poli(acrilamida) a una membrana

adecuada, después se bloquean los sitios de unión a proteína no ocupados (por ejemplo, mediante incubación con leche desnatada), y la membrana se expone a anticuerpo primario. La presencia de anticuerpos TSP Ab-4 que se han unido a trombospondina o fragmentos de trombospondina en la membrana puede detectarse mediante reacción de esos anticuerpos con anticuerpos marcados con fluoróforo contra IgG de ratón (anticuerpo secundario, es decir, que en sí mismos reaccionan con los anticuerpos TSP Ab-4), seguido de posterior exploración basada en fluorescencia de la membrana. La detección de anticuerpos policlonales anti-TSP se realiza de forma similar, usando anticuerpos secundarios apropiados. Otros sistemas para la detección de anticuerpo primario son bien conocidos en la técnica, incluyendo aunque sin limitación otros sistemas para marcar un anticuerpo secundario, tal como conjugación con una enzima, tal como peroxidasa de rábano rusticano. Los sistemas de biotina-avidina también son bien conocidos en la técnica, que son métodos de marcaje radiactivo.

Determinación de concentración de albúmina en muestras de plasma con propósitos de normalización de los resultados de transferencia de Western.

Los geles se corren en las mismas condiciones que para la transferencia de Western, pero después se tiñen con azul de Coomasie. La banda principal (que está cerca del patrón de 67 kDa) es albúmina, que se cuantifica por exploración densitométrica.

Ejemplos ilustrativos, pero no restrictivos, de ensayos cuantitativos para TSf (es decir, un fragmento o fragmentos de trombospondina):

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) y enfoques relacionados son bien conocidos en la técnica (para un ejemplo de un ELISA de trombospondina, pero no dirigido hacia fragmentos de trombospondina, véase Tuszynski, G.P., Switalska, H.I., y Knudsen, K.: Modern Methods in Pharmacology in "Methods of Studying Platelet-Secreted Proteins and the Platelet Cytoskeleton", Vol. 4, Alan R. Liss, Inc., Nueva York, pág. 267-286, 1987). Dos tipos de ELISA son ELISA competitivos, que requieren solamente un anticuerpo anti-TSf, y ELISA tipo sándwich, que pueden requerir dos anticuerpos anti-TSf. También se contemplan ensayos esencialmente idénticos, en que se usa un agente de unión diferente a un anticuerpo.

Para un ELISA o ensayo tipo ELISA competitivo, pueden usarse dos conjuntos de pocillos, uno un conjunto de pocillos de reacción y el otro un conjunto de pocillos de pre-mezcla. En los pocillos de reacción, se une antígeno a una superficie, tal como una placa o una perla (por simplicidad, el resto de esta descripción se refiere a dicha superficie como placa o pocillo, pero se entiende que también pueden usarse otras superficies). Aquí, el antígeno se basaría en un fragmento de trombospondina presente en un paciente con cáncer. Dicho antígeno podría adoptar una forma seleccionada entre el grupo que consiste en trombospondina (TSP) en sí misma, un fragmento de TSP encontrado en un paciente con cáncer, un fragmento de TSP que contiene un fragmento de TSP encontrado en un paciente con cáncer, un fragmento de TSP que está contenido dentro de un fragmento de TSP encontrado en un paciente con cáncer, un péptido que contiene un epítipo de un fragmento de TSP en un paciente con cáncer (donde dicho péptido puede ser sintético), y un péptido y/o fragmento derivatizado. El requisito esencial para el fragmento, proteína o péptido recubierto sobre las paredes es que pueda competir con el fragmento de TSP de interés (por ejemplo un fragmento en el plasma de un paciente) por la unión a un agente de unión, tal como un anticuerpo, usado en el ELISA. Como una ilustración, puede usarse la propia TSP, como se ha indicado anteriormente. La TSP puede prepararse activando plaquetas *in vitro* (que después liberan TSP-1), seguido de purificación de esta TSP del medio condicionado con plaquetas; si se usan placas de microtitulación convencionales de 96 pocillos, pueden añadirse 75 ng de TSP-1 en 200 µl de solución salina tamponada con fosfato por pocillo. Pueden usarse en su lugar cantidades correspondientes (molares o en masa) de fragmentos de TSP y/o péptidos, y son preferibles, basándose en la facilidad de preparación y normalización. Después de la unión del antígeno a la superficie inmovilizada, se bloquean los sitios de unión adicionales sobre la superficie por protocolos convencionales (por ejemplo, incubación con albúmina sérica bovina después Tween, ambos en solución salina tamponada con fosfato).

Los pocillos de premezcla se preparan sin antígeno, pero después se bloquean (por ejemplo, con BSA después Tween). Estos pocillos de premezcla pueden usarse como recipientes de reacción convenientes para la unión inicial de anticuerpo anti-TSf con cantidades conocidas de antígeno en solución (para una curva patrón) o cantidades desconocidas de antígenos en una muestra a ensayar (véanse los dos siguientes párrafos).

Para generar una curva patrón, a los pocillos de premezcla se añaden diferentes concentraciones de un antígeno patrón en solución. El antígeno patrón puede (como se describe en otra parte en este documento) seleccionarse para cuantificar la cantidad de fragmentos de trombospondina de la invención, la cantidad de un subconjunto de fragmento o fragmentos de trombospondina, la cantidad de trombospondina, o su total combinado. El antígeno puede ser sintético, aislado de un paciente con cáncer, aislado de un individuo sin cáncer, o aislado de cualquier otra fuente apropiada, incluyendo aunque sin limitación material recombinante. Como se ha indicado anteriormente, el antígeno inmovilizado en los pocillos de reacción y el antígeno en solución en los pocillos de premezcla no tienen que ser iguales, pero ambos deben reaccionar con - y de ese modo finalmente competir por - el agente de unión (tal como un anticuerpo primario) usado en el ensayo. Como ejemplo ilustrativo, si la propia TSP-1 es el antígeno patrón en solución en los pocillos de premezcla, pueden añadirse 0, 2, 5, 10, 20, 40, 60, y 80 ng por pocillo, en PBS-Tween, en volumen de 110 µl por pocillos de microtitulación. En su lugar pueden usarse cantidades correspondientes

(molares o en masa) de fragmentos de TSP o péptidos, y son preferibles, basándose en su facilidad de preparación y normalización. Estos pocillos se usarán para generar una curva patrón.

También se añaden incógnitas (es decir, muestras en que se desea cuantificar la concentración de un fragmento de TSP), a diferentes pocillos de premezcla. Para muestras de plasma, es típico diluirlas de antemano, es decir, con PBS-Tween. Esto puede ser importante, para reducir la cantidad de TSf al intervalo de la curva patrón, y también para diluir sustancias potencialmente interferentes en plasma (una de dichas sustancias interferentes puede ser fibrinógeno, que puede unirse a TSP y algunos fragmentos de TSP). El volumen total debe ser el mismo que para los patrones de antígeno soluble. Después se añade agente de unión diluido, tal como un anticuerpo (por ejemplo, en 110 ul), que reacciona contra un fragmento de TSP encontrado en un paciente con cáncer. Obsérvese que el antígeno inmovilizado en los pocillos de reacción y el antígeno en solución en los pocillos de premezcla deben elegirse para reaccionar también contra este agente de unión. Se realiza una incubación, para permitir que suceda la unión antígeno-anticuerpo (o la unión diana-agente de unión) en los pocillos de premezcla.

Después se transfiere una alícuota (por ejemplo, 200 ul) de líquido de cada pocillo de premezcla (patrones e incógnitas) a un pocillo de reacción recubierto con antígeno, seguido de una incubación (como blanco, algunos pocillos pueden recibir solamente tampón, tal como PBS-Tween). Después de esta incubación, el líquido se retira de los pocillos de reacción recubiertos con antígeno, y se lavan los pocillos. Si se usa un anticuerpo primario como agente de unión, después se añade anticuerpo secundario conjugado con enzima (específico contra el anticuerpo primario) a los pocillos, seguido de una incubación para permitir que se una a cualquier anticuerpo primario que se haya unido al TSf inmovilizado en la placa. Esta etapa está seguida de detección (por ejemplo, si el anticuerpo secundario está conjugado con fosfatasa alcalina, la detección puede realizarse con sustrato de fosfatasa Sigma seguido de lecturas de absorbancia a 405 nm). Se traza una curva patrón, y se calculan las cantidades de un TSf en las muestras desconocidas basándose en la curva patrón. Obsérvese que cantidades mayores de TSf en la muestra provocarán menos anticuerpo primario unido al antígeno inmovilizado en el pocillo, y por tanto menos señal del anticuerpo secundario. Se usan métodos de detección similares si el agente de unión es un no anticuerpo.

También se contemplan ELISA y ensayos tipo ELISA tipo sándwich. En este caso, se inmoviliza un primer anticuerpo anti-TSf (o un primer agente de unión no anticuerpo que se une a TSf) en una placa, una perla, u otra superficie, y se usa para capturar el TSf en una muestra patrón o desconocida. El primer anticuerpo a menudo es policlonal, pero esto no es un requisito. La detección del material capturado entonces se consigue con un segundo anticuerpo anti-TSf. El segundo anticuerpo a menudo es monoclonal, pero esto no es un requisito. Como se sabe bien en la técnica, el primer y segundo anticuerpos no deben interferir sustancialmente con el acceso de cada uno del otro al material capturado. La detección puede realizarse con un anticuerpo ligado a enzima específico para el segundo anticuerpo anti-TSf. De nuevo, si el primer (de captura) agente de unión y/o el segundo (de detección) agente de unión es un no anticuerpo, se usan métodos similares.

Se contemplan muchas variantes bien conocidas en la técnica para estos ELISA y ensayos tipo ELISA competitivos y tipo sándwich. Por ejemplo, se contemplan métodos no enzimáticos, tales como métodos radiactivos, fluorescentes, basados en biotina-avidina, y otros métodos para detectar el anticuerpo anti-TSf. Además, se contemplan ensayos automatizados, tales como los realizados en un autoanalizador clínicos. Además, se contemplan diversos anticuerpos anti-TSf, incluyendo aunque sin limitación anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos anti-péptido, anticuerpos contra un fragmento de TSP presente en un paciente con cáncer, anticuerpos contra un fragmento de TSP generado *in vitro*, y anticuerpos contra un fragmento de TSP generado *in vitro* por proteólisis. También se contemplan anticuerpos de cadena sencilla, así como no anticuerpos.

Para el ELISA tipo sándwich, una opción es el uso de microperlas (microesferas) codificadas por color con anticuerpo anti-TSf inmovilizado para captura, después un segundo anticuerpo anti-TSf fluorescente para detección. El aparato de detección lee cada perla, una cada vez, ensayando el color de la perla así como la señal del segundo anticuerpo anti-TSf. La ventaja aquí es que pueden ensayarse varios analitos diferentes a la vez, tal como un grupo de perlas para TSP de longitud completa (o un epítipo fuera de los que circula en concentración sustancial en un paciente con cáncer) y otro grupo de perlas, de un color diferente, para un fragmento de TSP. O, un grupo de perlas para ensayar un epítipo presente en el fragmento de ~85 kDa de TSP que no está presente en los fragmentos de ~50 o ~30 kDa, y otro grupo de perlas para ensayar un epítipo presente en el fragmento de ~50 kDa pero no el fragmento de ~30 kDa (esto está seguido de un cálculo numérico para producir las cantidades de fragmento de ~85 kDa y de fragmento de ~50 kDa por separado). Un ejemplo de este uso de perlas codificadas por color puede encontrarse en <http://www.lincoresearch.com/lincomplex/technology.htm>, el sitio web de Linco Research, Inc.

Otra opción para analizar múltiples analitos es series de proteoma Searchlight™, que son ELISA tipo sándwich combinados, actualmente adaptados para la medición cuantitativa de dos a 16 proteínas por pocillo. Se entiende en este documento que el método también puede usarse para fragmentos de proteína, tales como uno o más fragmentos de trombospondina. Usando una técnica de aplicación puntual, se unen de 2 a 16 anticuerpos específicos de diana a cada pocillo de una microplaca, aunque se entiende que esta cantidad puede expandirse con técnicas mejoradas de aplicación puntual y/o pocillos más grandes. Siguiendo un procedimiento convencional de ELISA tipo sándwich, se forman imágenes de señales luminiscentes con una cámara CCD (dispositivo acoplado cargado) refrigerada. La imagen después se analiza usando el software Array Vision™. La cantidad de señal

generada en cada mancha se relaciona con la cantidad de proteína diana en el patrón o muestra original. Pueden calcularse valores para proteínas y/o fragmentos de proteína específicos basados en la posición de las manchas y la comparación de valores de densidad para incógnitas con valores de densidad para patrones conocidos (y pueden usarse fragmentos de TSP o péptidos como patrones). La tecnología Searchlight™ está disponible a través de Pierce Boston Technology Center (<http://www.searchlightonline.com/>), incluyendo series personalizadas usando reactivos patentados de fuera de Pierce o dianas de ensayo no actualmente disponibles en Pierce (véase <http://www.searchlightonline.com/customanay.cfm>).

También se contemplan otros métodos de ensayo. Éstos incluyen aunque sin limitación inmunotransferencia, dot-blot y ensayos inmunoturbidimétricos (para un ejemplo detallada de este último enfoque con otra proteína de plasma, véase Levine, D.M. y Williams, K.J.: Automated measurement of mouse apolipoprotein B: convenient screening tool for mouse models of atherosclerosis. Clin. Chem. 43:669-674, 1997), así como transferencia y/o ensayos turbidimétricos que usan agentes de unión en general. También se contemplan otros ensayos competitivos, tales como aquellos en que el material en un patrón y una incógnita compite con uno o más péptidos marcados, uno o más fragmentos de TSP marcados, y/o TSP marcada por la unión a un agente que se une a TSf, tal como un anticuerpo anti-TSf (el marcador entonces se usa para detección y por tanto cuantificación). Un ejemplo de este enfoque es inmovilizar un anticuerpo anti-TSf, y después añadir muestra mezclada con péptido marcado, fragmentos de TSP marcados, o TSP marcada, de modo que la muestra y el material marcado compitan por la unión al anticuerpo inmovilizado (obsérvese que este enfoque requiere solamente un anticuerpo anti-TSf). Entonces se cuantifica la unión de material marcado. Se entiende que cualquiera de estos ensayos, incluyendo ensayos basados en inmunidad o no basados en inmunidad, puede ser automatizado. También se entiende que sustancias potencialmente interferentes en muestras desconocidas pueden diluirse, retirarse, inhibirse, evitarse (por ejemplo, en el caso de fibrinógeno, usando epítomos lejos de una región de unión a fibrinógeno de TSP), y/o compensarse.

Uso de fragmentos de trombospondina como inmunógenos para generar anticuerpos específicos de fragmento:

Se inyecta una preparación purificada de fragmentos (por ejemplo, por elución de fragmentos del gel, por inmunoprecipitación o métodos de purificación basados en columna de anticuerpo u otros basados en inmunidad, por técnicas de ADN recombinante, por síntesis química, o por una combinación de síntesis y/o métodos de purificación) en un conejo o conejos con cualquiera de los adyuvantes convencionales usados con inmunógenos peptídicos y se recogen los anticuerpos usando protocolos bien conocidos en la técnica. Para péptidos pequeños, la unión a un vehículo, tal como hemocianina de lapa californiana o albúmina sérica bovina, es bien conocida en la técnica. La inyección en otros animales también es bien conocida, incluyendo aunque sin limitación cabra, oveja, pollo, pavo, burro, perro, gato, rata, y ratón. Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando células productoras de anticuerpo obtenidas de cualquier animal inmunizado, pero la tecnología está mucho más fácilmente disponible para ratones (por ejemplo, se fusionan células productoras de anticuerpo de un animal inmunizado con una célula inmortal, después se seleccionan clones de células fusionadas para su producción de anticuerpo contra uno o más fragmentos de trombospondina de interés).

Se entiende que los métodos descritos en este documento se aplican fácilmente a otros miembros de la familia génica de trombospondina, incluyendo aunque sin limitación TSP-2 (para una descripción de la familia génica de trombospondina, véase The Thrombospondin Gene Family por JC Adams, RP Tucker, y J Lawler, Springer-Verlag: Nueva York, 1995; de Fraipont F et al. Trends Mol. Med., 7:401-407, 2001; y en otras partes). También se entiende que los métodos descritos en este documento se aplican fácilmente a otras especies animales de importancia económica y/o emocional, incluyendo aunque sin limitación mascotas, animales usados en crianza, caballos de carreras, y perros de carreras.

**Ejemplos**

Análisis de transferencia de Western de muestras de plasma de pacientes con cáncer

Se hizo electroforesis de acuerdo con el protocolo de electroforesis en gel convencional descrito anteriormente.

La Tabla I muestra las muestras de plasma y suero obtenidas para el análisis.

Tabla 1

<b>Muestra</b>	<b>Plasma/Suero</b>	<b>Cáncer</b>	<b>Fase/Grado</b>	<b>Edad/Sexo</b>	<b>Comentarios</b>
A	plasma	colon T2	I/G2	57/F	Ascendente
B	plasma	colon T3	II/G2	71/M	Ascendente
C	plasma	próstata	II/Gleason 6	71/M	DRE-anormal
D	plasma	próstata	II/Gleason 5	63/M	DRE-anormal
E	plasma	pulmón T2	IB/G2	67/M	Escamoso
F	suero				Se libera TSP de plaquetas durante la coagulación, y se activan proteasas durante la coagulación.

G	plasma	sin cáncer	N/A	F	Liquen plano, un trastorno inflamatorio no canceroso
---	--------	------------	-----	---	--

Los resultados se muestran en las Figuras 2 y 3, y los datos cuantitativos se resumen en la Tabla 2.

- 5 **Tabla 2: Cuantificación de fragmentos de trombospondina, normalizados para carga de muestra** Los números se refieren a las potencias de la señal de TSf desde la transferencia de Western (Figura 3), normalizada a la señal de albúmina de tinción con Coomassie (Figura 2 y fila final de números en esta Tabla). Los porcentajes indican la proporción a la muestra sin cáncer (muestra G).

PM aprox. (kDa)	A Colon-1	B Colon-2	C Próstata-1	D Próstata-2	E Pulmón	F Suero	G Sin cáncer
85	0,572	0,847	1,175	1,292	1,142	1,434	0,526
	108,8 %	161,1 %	223,6 %	245,7 %	217,4 %	272,9 %	100,0 %
							0,596
50	0,534	0,666	1,037	1,416	1,809	2,722	
	89,7 %	111,8 %	174,0 %	237,7 %	303,6 %	456,9 %	100,0 %
30	1,210	1,401	1,687	1,593	1,988	7,351	1,424
	85,0 %	98,4 %	118,5 %	111,9 %	139,6 %	516,3 %	100,0 %
<b>Ab4 total</b>	<b>2,316</b>	<b>2,914</b>	<b>3,898</b>	<b>4,301</b>	<b>4,939</b>	<b>11,507</b>	<b>2,545</b>
<b>Señal</b>	91,0 %	114,5 %	153,2 %	169,0 %	194,1 %	452,1 %	100,0 %
Señal de albúmina	24020	26723	25187	27073	23888	4359	26110
fondo previo							

- 10 Los resultados resumidos en la Tabla 2 representan datos generados por exploración densitométrica de la película fotográfica generada por tinción fluorescente de la transferencia de Western con TSP Ab-4 (véase la Figura 3). Por tanto, para señales muy oscuras, tales como la banda o grupo de bandas alrededor de 30 kDa, el hecho de que las señales en la película se saturan cuando son muy fuertes significa que los aumentos comparados con la muestra de control sin cáncer están seriamente subestimados. Esto no es particularmente evidente en la muestra de suero, que sirvió como control positivo para señal aumentada, debido a activación de plaquetas (se cargó mucho menos suero, como es evidente a partir de la señal de albúmina; así que aunque generó una fuerte señal normalizada, no saturó la película ni mucho menos tanto).

- 15 Para obtener los datos para la Tabla 2, se determinó la señal (fondo previo) para la transferencia de Western y se normalizó la señal a la señal de albúmina (fondo previo) para el gel mostrado en la Figura 2. La Tabla 2 muestra la señal normalizada (por ejemplo, 0,572) siendo el porcentaje (por ejemplo, 108,8 %) por debajo de la señal normalizada el porcentaje de la señal "sin cáncer".

- 20 Los patrones de peso molecular usados fueron 184 kDa, 121 kDa, 86 kDa, 67 kDa, 52 kDa, 40 kDa, 28 kDa, y 22 kDa. Basándose en los pesos moleculares dados y las posiciones relativas de las bandas de patrón frente a las bandas y grupos de bandas de TSP Ab-4, se concluyó que las señales de TSP Ab-4 estaban en tres bandas o grupos de bandas generales, a aproximadamente 85, 50, y 30 kDa (véase la Figura 3). Obsérvese, por ejemplo, la fuerza relativa de las señales alrededor de 185 kDa (trombospondina) frente a alrededor de 85, 50, y 30 kDa (fragmentos). Está claro que existe contundentemente más señal procedente de los fragmentos que de la propia trombospondina. Por tanto, la detección de un fragmento específico, como se describe en las presentes invenciones, se prefiere sobre la detección de la propia molécula TSP, o la detección general de epítomos que en toda la molécula TSP completa, o la detección de epítomos fuera de los contenidos dentro de los fragmentos específicos demostrados en este documento.

- 25 Las muestras de plasma de pacientes con cáncer (carriles A-E) provienen de Golden West Biologicals, Inc. de Temecula, CA. La muestra de suero (carril F) fue de un individuo no canceroso. El plasma de control sin cáncer (carril G) proviene de un individuo con liquen plano, una afección cutánea no cancerosa pero inflamatoria.

- 30 La muestra de suero (carril F) se preparó por coagulación deliberada de la sangre. No se añadieron inhibidores de proteasa a la muestra F hasta después de completarse la coagulación y haber recogido el suero. De forma ideal para la presente invención, sin embargo, no se deja que la sangre coagule durante la recogida de muestra (la activación de plaquetas durante la coagulación causa liberación de trombospondina, que se usó aquí con el fin de aumentar la señal de la muestra F), y se añaden inhibidores de proteasa rápidamente durante la recogida de muestra (no hecho para la muestra F porque la cascada de coagulación implica la activación de proteasas).



La predominancia de fragmentos de trombospondina, en oposición a la propia trombospondina, en la muestra F es coherente con a) la activación de plaquetas y liberación de trombospondina, más b) la activación de proteasas de la cascada de coagulación, que escindieron evidentemente la trombospondina recién liberada.

5 Las muestras de plasma de Golden West Biologicals fueron muestras de individuos con enfermedad relativamente prematura. La primera muestra de cáncer de colon (carril A) fue de un individuo con enfermedad en fase I, grado G2. Todas las otras muestras de cáncer (carriles B-E) provenían de individuos con enfermedad en fase II (excepto para el carril E, que fue fase IB). Se esperaría que el plasma de pacientes con dichos cánceres en fase relativamente prematura tuviera una concentración inferior de fragmentos de trombospondina que el plasma de pacientes con cánceres más avanzados. No obstante, la robustez de la técnica se demuestra por el hecho de que (1) se encontraron niveles aumentados con los cánceres en fase prematura, y (2) se hizo exploración de gel en condiciones en que se saturaron o casi se saturaron partes de la película de detección.

15 Todas las muestras de cáncer muestran una señal aumentada desde la banda de 85 kDa (o grupo de bandas de movimiento electroforético similar). Todas salvo la muestra en fase I muestran señal aumentada desde la banda de 50 kDa (o grupo de bandas), así como señal aumentada de Ab-4 total. Todas salvo las dos muestras de cáncer prematuro de colon muestran señal aumentada desde la banda de 30 kDa (o grupo de bandas). Por tanto, la detección y cuantificación de fragmentos específicos de trombospondina funciona distinguiendo incluso pacientes con cánceres relativamente prematuros de un control sin cáncer que tiene una enfermedad no cancerosa. Estos fragmentos de trombospondina son muy adecuados para ensayos de diagnóstico porque (a) tienen pesos moleculares específicos (o intervalos de pesos moleculares); y (b) contienen epítomos específicos. Los presentes resultados proporcionan validación para otros enfoques basados en fragmentos, incluyendo (aunque sin limitación) ELISA y ensayos tipo ELISA no competitivos, y ensayos de competición.

25 La Figura 4 muestra los resultados de un análisis en gel independiente de las muestras. Las muestras se desnaturalizaron, después se corrieron en un gel al 12 %, se transfirieron, y después se tiñeron con el mismo TSP Ab-4 que se usó anteriormente. A diferencia de la transferencia mostrada en la Figura 3, la etapa de desnaturalización aquí incluía urea, y la detección usó un método colorimétrico enzimático que se basa en conjugados de peroxidasa de rábano rústico y el kit de sustrato BioRad Opti-4CN (véase <http://www.discover.biorad.com/>), no fluorescencia como anteriormente. A lo largo del borde izquierdo del carril 1, hay de arriba abajo, los siguientes números escritos a mano visibles: 1, 97, 66, 45, 30, 20, y 14, respectivamente. Con la excepción de 1, los números corresponden a las posiciones donde proteínas patrón de pesos moleculares correspondientes (en kDa) se habían movido electroforéticamente.

35 En la Figura 4 los carriles 2 a 6 corresponden a los pacientes A a E, respectivamente, en la Tabla 1. Los carriles 1 y 7 a 9 muestran los patrones de electroforesis de trombospondina. Los resultados confirman que:

- 40 a) casi no hay TSP en las muestras de plasma (el primer carril de plasma muestra algo de TSP en su peso molecular apropiado de monómero, pero éste ciertamente se derrama desde el carril de la primera muestra inmensamente sobrecargado);
- b) existen de hecho fragmentos de TSP en las muestras de plasma; y
- 45 c) los fragmentos tienen pesos moleculares de aproximadamente 28, 50, y una banda débil alrededor de 90 kDa. En esta transferencia, las bandas de TSf son muy marcadas, lo que implica fragmentos de peso molecular bien definido (presumiblemente una mejora puramente técnica, debida a la mejor desnaturalización en presencia de urea). Como en la Figura 3, existen varias bandas de fragmentos menos prominentes a otros pesos moleculares. Se entiende que un fragmento de trombospondina en cualquiera de estas bandas también puede ensayarse y usarse en diagnóstico y selección y en kits.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para detectar la presencia de o controlar el curso clínico de una enfermedad neoplásica en un individuo, en donde el método comprende las etapas de:

- (1) medir en una muestra el nivel en plasma del individuo de un fragmento o fragmentos de trombospondina;
- (2) utilizar el resultado de la etapa (1) en un diagnóstico en cuanto a si el individuo tiene una enfermedad neoplásica de modo que cuanto mayor sea el nivel plasmático de dicho fragmento o fragmentos de trombospondina, mayor será la probabilidad de que el diagnóstico sea que está presente una enfermedad neoplásica en dicho individuo; en donde o bien:

- (i) dicho fragmento o fragmentos están dentro de un intervalo molecular seleccionado entre el grupo que consiste en 80 a 110 kDa, 40 a 60 kDa y 20 a 35 kDa; o
- (ii) dicho método comprende el uso de un agente de unión que se une a un epítipo dentro de un fragmento plasmático en el intervalo de peso molecular seleccionado entre el grupo que consiste en 80 a 110 kDa, 40 a 60 kDa y 20 a 35 kDa; y

en el que el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro.

2. El método de la reivindicación 1 donde el individuo mencionado en la misma es un primer individuo y el nivel plasmático mencionado en la misma es el nivel plasmático de fragmento del primer individuo y en donde el método comprende adicionalmente las etapas de:

- (3) medir, en un segundo individuo, el nivel plasmático del mismo fragmento o fragmentos de trombospondina medidos para el primer individuo, considerando que dicho segundo individuo no tiene enfermedad neoplásica, el nivel plasmático de dicho fragmento o fragmentos en el segundo individuo es el nivel plasmático de fragmento del segundo individuo;
- (4) utilizar el resultado de la etapa (3) en el diagnóstico de si el primer individuo tiene una enfermedad neoplásica de modo que cuanto mayor sea el grado al cual excede el nivel de fragmento plasmático del primer individuo al nivel plasmático del segundo individuo, mayor será la probabilidad de que el diagnóstico sea que está presente una enfermedad neoplásica en el primer individuo.

3. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente las etapas de ensayar el nivel plasmático de un individuo de un fragmento o fragmentos de trombospondina más de una vez, y utilizar un cambio en dicho nivel plasmático de un valor más antiguo a uno más reciente para indicar la aparición o la progresión o la mejora de una enfermedad neoplásica en donde dichas aparición o progresión están indicadas por un aumento en el nivel plasmático y dicha mejora está indicada por una disminución en dicho nivel plasmático.

4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la medición del nivel plasmático de un fragmento o fragmentos de trombospondina comprende el uso de un agente de unión, siendo capaz dicho agente de unión de unirse a dicho fragmento o fragmentos.

5. El método de la reivindicación 4, en el que el fragmento o fragmentos de trombospondina se separan de la trombospondina antes de que dicho fragmento o fragmentos se unan al agente de unión.

6. El método de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que el agente de unión es un anticuerpo.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el peso molecular del fragmento o de cada uno de los fragmentos está dentro de un intervalo de peso molecular seleccionado entre el grupo que consiste en fragmento de 85 a 90 kDa, 47 a 53 kDa y 27 a 33 kDa, en el que el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el peso molecular del fragmento o fragmentos está dentro de un intervalo de 80 a 110 kDa en el que el tamaño en kDa es el determinado por electroforesis en gel después de reducción de los enlaces disulfuro.

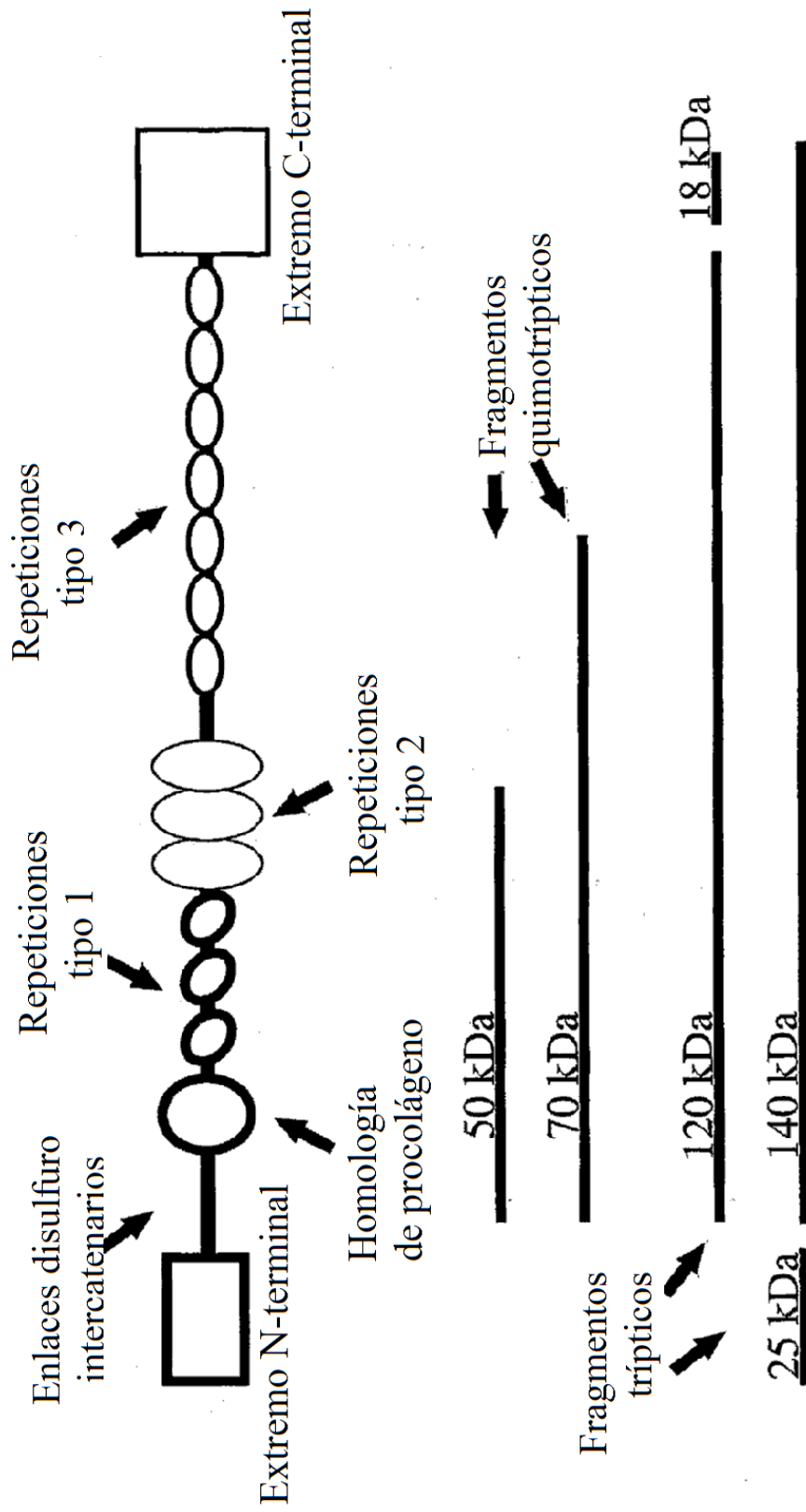
9. El método de la reivindicación 1, en donde el método comprende las etapas adicionales de:

- 3) utilizar un primer agente de unión para obtener una cuantificación de un total, trombospondina más el fragmento o fragmentos de trombospondina;
- 4) utilizar un segundo agente de unión para obtener una cuantificación de trombospondina solamente;
- 5) utilizar la diferencia entre las cuantificaciones obtenidas en las etapas (3) y (4) como una cuantificación de la cantidad de fragmento o fragmentos de trombospondina; y
- 6) utilizar el resultado de la etapa (5) en un diagnóstico en cuanto a si el individuo tiene una enfermedad neoplásica de modo que cuanto mayor sea el nivel plasmático de dicho fragmento o fragmentos de

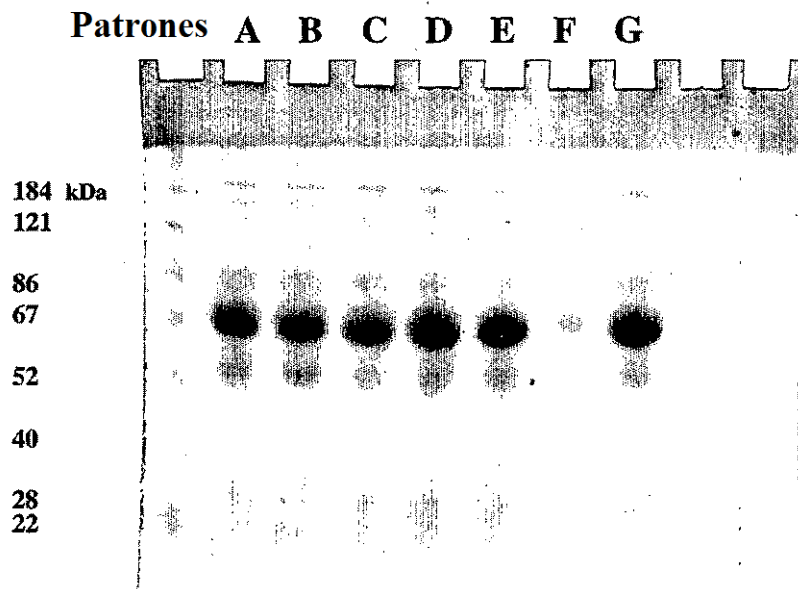
5 trombospondina, mayor será la probabilidad de que el diagnóstico sea que está presente una enfermedad neoplásica en dicho individuo; en donde el primer agente de unión se une a un epítipo compartido por trombospondina y el fragmento o fragmentos de trombospondina como se define en la reivindicación 1, y en donde el segundo agente de unión se une a un epítipo presente en trombospondina pero no presente en el fragmento o fragmentos.

10. El método de la reivindicación 9, en el que uno o los dos de dicho primer y segundo agentes de unión son un anticuerpo.

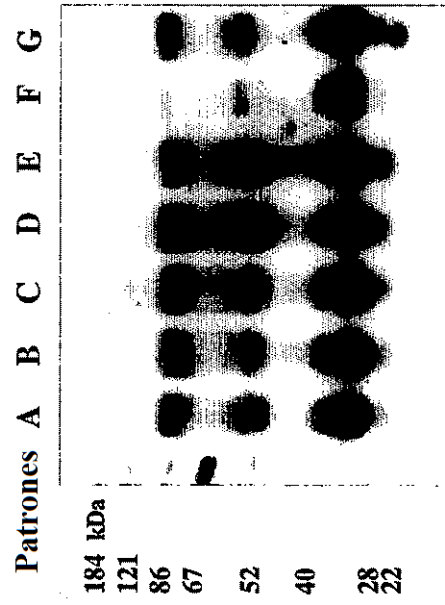
Figura 1: trombospondina y fragmentos



**Figura 2**



**Figura 3**



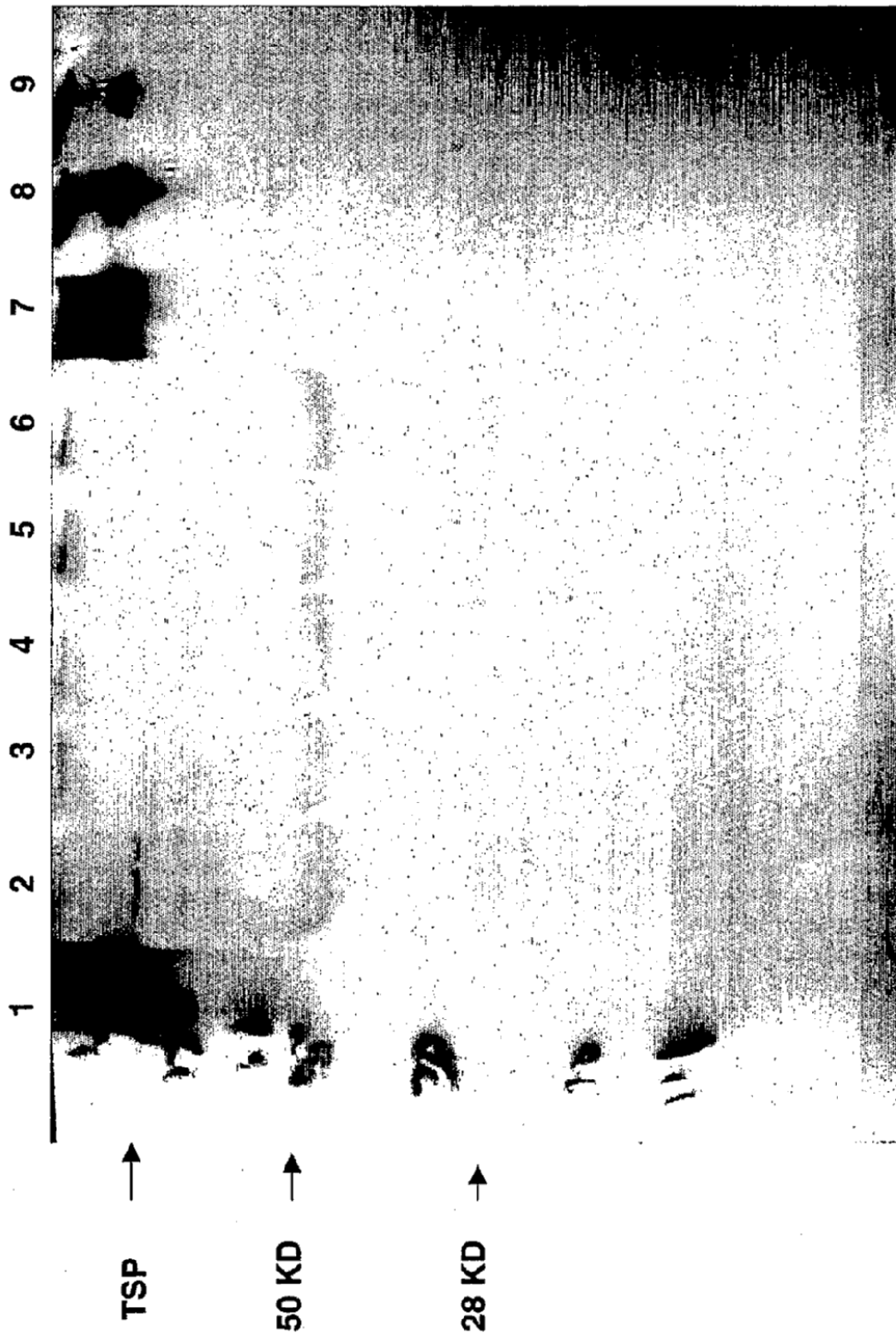


Figura 4