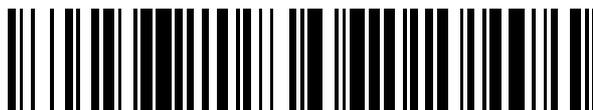


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 566 969**

51 Int. Cl.:

C07K 16/36 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2009 E 09720089 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016 EP 2251354**

54 Título: **Procedimiento para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer por medio de la medición de la concentración del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) en un suero**

30 Prioridad:

14.03.2008 KR 20080023803

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

18.04.2016

73 Titular/es:

**BIOINFRA INC. (100.0%)
8th Fl., Cancer Research Institute Seoul National
University College of Medicine 28, Yongon-dong,
Chongno-gu
Seoul 110-799, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, CHUL WOO;
PARK, PIL JE;
SHIN, YONG-SUNG;
LEE, KIL HYON;
SHIN, HO SANG y
KIM, BYOUNG-KWON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 566 969 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

Procedimiento para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer por medio de la medición de la concentración del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) en un suero

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un marcador proteico para la monitorización, diagnóstico y exploración del cáncer, y a un procedimiento para monitorizar, diagnosticar y explorar el cáncer utilizando el mismo. Más precisamente, la invención se refiere al fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2), el marcador proteico regulado negativamente de manera específica en pacientes con cáncer de hígado, cáncer de mama y
10 cáncer de estómago, y un procedimiento para monitorizar, diagnosticar y explorar el cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago mediante la cuantificación de dicho marcador proteico.

Técnica antecedente

Desde que Henry Bence-Jones utilizase por primera vez la proteína que se precipitaba particularmente en la orina oxidada como biomarcador para el diagnóstico del mieloma múltiple, se han desarrollado y comunicado muchos biomarcadores relacionados con tumores (marcadores tumorales, marcadores del cáncer, etc.). La definición de
15 marcador tumoral está siendo ampliada y así se han sugerido diferentes definiciones (Diamandis, E. P., y col., AACCC Press, Washington DC, pp. 3-8, 2002). Sin embargo, hay una definición común del biomarcador relacionado con el tumor. Es decir, un marcador tumoral indica una molécula específica, un material o proceso que cambia en cantidad o calidad en la afección pre-cancerosa o en las lesiones cancerosas (Hayes D. F. y col., J Natl Cancer Inst 88, 1456-66, 1996). Este cambio puede ser el resultado de un tumor en sí mismo o de la respuesta de tejidos normales contra
20 el tumor.

En Corea, la incidencia del cáncer ha aumentado gradualmente desde 1970, y ahora el cáncer es la razón número uno de muerte por enfermedad. Según el informe con respecto a los pacientes de cáncer realizado por la Cooperativa de Aseguradoras de Salud Nacional de Corea en 2005, la incidencia de cáncer más frecuente es de
25 cáncer de estómago y cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de hígado y cáncer de tiroides en ese orden. Particularmente, en pacientes masculinos, el cáncer de estómago está en la posición de cabeza y luego el cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de colon y cáncer de próstata a continuación, mientras que en pacientes femeninos el cáncer de tiroides está en la posición de cabeza y luego el cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de colon y cáncer de pulmón es este orden. Según el informe anterior, la muerte por cáncer fue de 65.479 en total en 2005, lo que indica que el cáncer se registró como la causa principal de muerte. La mayoría de los cánceres se encuentran según progresan excepto el cáncer de próstata y cáncer de tiroides y la tasa de curaciones es
30 alrededor del 50%. De acuerdo con el resultado de la investigación del Centro Nacional del Cáncer de Corea presentado en 2003, el coste directo que se paga por los pacientes para el tratamiento del cáncer alcanzaba los 2,2 trillones de won por año y si se convertía en costes la pérdida de productividad causada por la muerte prematura y la pérdida de los cuidadores, la carga económica total alcanzaba al menos los 15 trillones de won por año. El 56% de pacientes de cáncer pierden su trabajo tras el diagnóstico de la enfermedad, sugiriendo que el cáncer es la enfermedad que perjudica enormemente no solo la salud personal sino también la economía nacional. Entre tanto, el cáncer de estómago muestra una tasa de curación del 90% cuando se diagnostica precozmente y el cáncer de mama muestra una tasa de supervivencia del 95% cuando se diagnostica precozmente. Por lo tanto, el diagnóstico precoz del cáncer no solo mejora la tasa de curación significativamente sino que también es muy importante en la
35 sanidad pública y la economía nacional. Por lo tanto, muchos países hacen una enorme inversión para desarrollar un procedimiento simple pero preciso para el diagnóstico precoz. El procedimiento que utiliza el antígeno específico de próstata (PSA) que se ha utilizado para el diagnóstico de cáncer de próstata como marcador es fácil para medir el PSA en el suero y en consecuencia reduce significativamente la muerte producida por el cáncer de próstata. Basándose en esto, muchos investigadores han intentado encontrar en el suero biomarcadores relacionados con
40 tumores.

Los estudios sobre biomarcadores relacionados con tumores (identificación de un biomarcador y validación del mismo) son procesos que necesitan una gran cantidad de tiempo y esfuerzo. Hubo un impulso en tales estudios, que se hizo al completarse el proyecto del genoma humano, las técnicas basadas en el chip genético de alta densidad (micromatriz de ADN) y las técnicas de alto rendimiento basadas en el proteoma.

50 Es bien conocido que el procedimiento de análisis del genoma que utiliza un chip genético tiene un papel importante en el entendimiento de la fisiopatología del cáncer y la identificación de un biomarcador útil para el diagnóstico. Sin embargo, el procedimiento del análisis del genoma está limitado críticamente debido a que la actividad transcripcional del ARNm puede que no refleje la expresión y funciones de una proteína diana en un tumor. Incluso aunque se transcriba la información genética (ADN) en un ARN para producir la proteína, hay aún muchos procesos complicados de diversidad a niveles del ARN, traducción proteica y modificación post-traducciona. Por lo tanto, solo cuando la proteína, el producto final del ADN, se analiza correctamente (proteoma), se puede entender el significado biológico del gen diana y la proteína correspondiente en el desarrollo del tumor, se realiza la identificación de un biomarcador, y se puede proporcionar una importante pista para el desarrollo de un fármaco específico de una
55 diana.

La electroforesis en gel bidimensional, MALDI-TOF MS (espectrometría de masas por ionización/desorción láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) y SELDI-TOF (espectrometría de masas por ionización/desorción láser aumentada por superficie con tiempo de vuelo) son ejemplos de las técnicas recientes de alto rendimiento de análisis del proteoma. Estas técnicas facilitan la elaboración de perfiles de patrones de expresión de cada proteína y proteínas modificadas con un amplio intervalo de pesos moleculares (Richter R. y col., J Chromotogr B Biomed Sci Appl 726, 2535, 1999; Paweletz C.P. y col., Drug Dev Research 49, 3442, 2000). La SELDI-TOF MS es similar a la MALDI-TOF MS, pero está diseñada para que sea adecuada para la cuantificación con una sensibilidad relativamente alta y una excelente reproducibilidad. Se pueden tratar con esta técnica materiales bioquímicos complicados e incluso se puede utilizar también una pequeña cantidad de muestra de proteína sin purificación. Además, no es necesario el pretratamiento con procesos de mezclado de un marcador o matriz en este procedimiento. Sin embargo, aún se necesita un nuevo marcador que haga posible el diagnóstico de cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago con una mayor precisión y facilidad y también se necesita un procedimiento que utilice el mismo.

Los presentes inventores recolectaron muestras de suero de pacientes con cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago y también de gente sana normal, seguido por SELDI-TOF MS, secuenciación proteica, y análisis bio-informáticos. Como resultado, los presentes inventores completaron la presente invención identificando marcadores proteicos útiles para monitorizar, diagnosticar y explorar el cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago.

El documento WO 91/06861 A1 desvela la secuencia de aminoácidos del extremo C de des-RF2 y menciona la posibilidad de obtener anticuerpos monoclonales anti-des-RF2. El documento WO 91/06861 A1 no describe una función biológica de des-RF2 y no sugiere el uso del des-RF2 como un biomarcador de cáncer.

Divulgación

Problema técnico

Es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento para monitorizar, diagnosticar y explorar el cáncer utilizando marcadores proteicos, y el uso de un kit y de un biochip en el procedimiento de monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer que utiliza los mismos.

Solución técnica

Para alcanzar el objetivo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de detección del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer que se selecciona de entre el grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago, que comprende las siguientes etapas:

- 1) medir la expresión del fragmento F2 del péptido de activación de protrombina des-R de la SEQ ID NO: 1 en una muestra que se obtiene de un sujeto la cual se selecciona de entre el grupo que consiste en sangre, suero y plasma; y
- 2) comparar la expresión del fragmento F2 del péptido de activación de protrombina des-R de la etapa 1) con la de un sujeto normal, y luego seleccionar los sujetos que presentan una expresión de des-R-F2 reducida.

La presente invención proporciona además el uso de un kit en dicho procedimiento para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer que comprende un anticuerpo específico contra fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R-F2).

La presente invención proporciona además el uso de un biochip en dicho procedimiento para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer, en el cual las biomoléculas específicas del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R están integradas en un sustrato sólido.

El presente documento también desvela un uso del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R para la construcción de un kit para la monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer.

Además, el presente documento desvela un uso del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R para la construcción de un biochip para la monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer.

Efecto ventajoso

El fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R-F2) como se utiliza en la presente invención está regulado negativamente de manera específica en fluidos corporales de pacientes con cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago. Por lo tanto, es posible explorar y diagnosticar precozmente el cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago, simplemente midiendo la expresión de la proteína, dando lugar al aumento de la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer de hígado, cáncer de mama, y cáncer de estómago por el diagnóstico precoz seguido por la rápida respuesta al tratamiento y además al descenso de la pérdida nacional continua por tratamiento del cáncer.

Descripción de los dibujos

La aplicación de las realizaciones preferidas de la presente invención se entiende mejor en referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

- 5 La Figura 1 es una curva ROC (característica operativa del receptor) que ilustra el resultado del análisis del espectro con el suero de un paciente con cáncer de hígado.
 La Figura 2 es una curva ROC (característica operativa del receptor) que ilustra el resultado del análisis del espectro con el suero de un paciente con cáncer de estómago.
 La Figura 3 es una curva ROC (característica operativa del receptor) que ilustra el resultado del análisis del espectro con el suero de un paciente con cáncer de mama.
 10 La Figura 4 es un diagrama que ilustra la comparación de los espectros entre los sueros de un sujeto normal y un paciente con cáncer de hígado.
 La Figura 5 es un gráfico que muestra el grado de dispersión que ilustra que el pico de 12,5 kDa está reducido en el suero del paciente con cáncer de hígado, en comparación con el de un sujeto normal, que resulta del análisis del espectro del suero.
 15 La Figura 6 es un gráfico que muestra el grado de dispersión que ilustra que el pico de 12,5 kDa está reducido en el suero del paciente con cáncer de estómago, en comparación con el de un sujeto normal, que resulta del análisis del espectro del suero.
 La Figura 7 es un gráfico que muestra el grado de dispersión que ilustra que el pico de 12,5 kDa está reducido en el suero del paciente con cáncer de mama, en comparación con el de un sujeto normal, que resulta del análisis del espectro del suero.
 20 La Figura 8 es un diagrama que ilustra el resultado de la electroforesis en 2 dimensiones de la proteína del pico de 12,5 kDa y el resultado de la SELDI-TOF MS que se lleva a cabo tras la elución de la proteína.
 La Figura 9 es un diagrama que ilustra el resultado de ESI-Q-TOF MS/MS de la proteína del pico de 12,5 kDa.
 25 La Figura 10 es un diagrama que ilustra el resto de aminoácido del precursor de protrombina (P00734), el producto de la proteína del pico de 12,5 kDa tras la secuenciación del extremo N.
 La Figura 11 es un diagrama que ilustra la secuencia total de aminoácidos de la proteína del pico de 12,5 kDa (des-R F2).

Mejor modo

De aquí en adelante, la presente invención se describe en detalle.

- 30 La presente invención proporciona el uso de un kit para monitorizar, diagnosticar y explorar el cáncer que comprende un anticuerpo específico para el fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R.

Dicho fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1.

- 35 El fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R contiene preferentemente un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 (Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu) en la región del extremo N y contiene otro epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 (Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly) en la región del extremo C, pero no siempre se limitan a estos.

- 40 El fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R que se utiliza en la presente invención está preferentemente regulado negativamente en un sujeto con cáncer, pero no siempre se limita a esto.

Dicho cáncer en el presente documento es cáncer de hígado, cáncer de mama o cáncer de estómago, pero no siempre se limita a estos.

Dicho anticuerpo preferentemente se une específicamente al epítipo que corresponde al extremo carboxilo del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R, pero no siempre se limita a esto.

- 45 El kit se puede utilizar en la presente invención para medir el marcador proteico des-R F2 que presenta diferentes patrones de expresión en un sujeto con cáncer y un sujeto normal. El uso de un kit de la presente invención no solo facilita la monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer sino que también hace posible modificar el tratamiento del cáncer según el resultado de la monitorización de la respuesta individual al tratamiento.

- 50 El anticuerpo incluido en el kit puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal y un fragmento que sea capaz de unirse con un epítipo, etc.

- 55 El anticuerpo policlonal se puede preparar por los procesos convencionales de inyección del marcador proteico des-R F2 en un animal; extracción de sangre del animal; y obtención del suero que contiene el anticuerpo a partir de la muestra de sangre. Tal anticuerpo policlonal se puede purificar por cualquier procedimiento convencional que sea conocido por los expertos en la técnica y producirse utilizando cualquier modelo animal, por ejemplo cabra, conejo, oveja, mono, caballo, cerdo, vaca, y perro como hospedador.

El anticuerpo monoclonal se puede preparar por cualquier técnica que se utiliza para producir moléculas de anticuerpo a través del cultivo continuo, que se ejemplifica por la técnica de hibridoma, técnica de hibridoma de linfocitos B, y técnica de hibridoma EBV, pero no siempre se limita a estas (Kohler G y col., Nature 256:495-497, 1975; Kozbor D y col., J Immunol Methods 81:31-42, 1985; Cote RJ y col., Proc Natl Acad Sci 80:2026-2030, 1983; and Cole SP y col., Mol Cell Biol 62:109-120, 1984).

Se puede preparar un fragmento de anticuerpo que albergue el sitio de unión específico del marcador proteico. Por ejemplo, se puede preparar un fragmento F(ab')₂ descomponiendo una molécula de anticuerpo con pepsina. El fragmento Fab se puede preparar reduciendo el puente disulfuro de F(ab')₂. Además, se puede construir una biblioteca de expresión de Fab, por la que puede identificarse un fragmento Fab monoclonal específico fácil y rápidamente (Huse WD y col., Science 254: 1275-1281, 1989).

Dicho anticuerpo se puede fijar en un sustrato sólido para facilitar los procesos de lavado o separación de conjugados. El sustrato sólido se ejemplifica por una resina sintética, nitrocelulosa, placa de cristal, placa metálica, fibra de vidrio, microsferas y microperlas. La resina sintética en el presente documento se ejemplifica por poliéster, cloruro de polivinilo, poliestireno, polipropileno, PVDF y nilón. En la presente invención, para fijar un anticuerpo específico del marcador proteico en un sustrato sólido, se suspenden microsferas, que se transfieren a un microtubo. El sobrenadante se desecha por centrifugación, seguido por resuspensión. Se trata paso a paso con N-hidroxil-sulfosuccinimida y hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida. Se desecha el sobrenadante de nuevo por centrifugación, seguido por lavado y almacenaje.

En el caso de que una muestra obtenida de un paciente se ponga en contacto con el anticuerpo específico del marcador proteico fijado en un sustrato sólido, la muestra puede diluirse adecuadamente antes de ponerla en contacto.

El kit que se utiliza en la presente invención incluye también un anticuerpo para la detección que se une específicamente al marcador proteico. El anticuerpo para la detección puede ser un conjugado marcado con una enzima colorante, un material fluorescente, un radioisótopo o un coloide, y se prefiere específicamente un anticuerpo primario específico del marcador proteico. La enzima colorante se ejemplifica por peroxidasa, fosfatasa alcalina, o fosfatasa ácida (por ejemplo: peroxidasa de rábano rusticano); y el material fluorescente se ejemplifica por ácido carboxílico de fluoresceína (FCA), isotiocianato de fluoresceína (FITC), tiourea fluoresceína (FTH), ficoeritrina (PE), 3-il-7-acetoxicumarina, fluorescen-5-ilo, fluorescen-6-ilo, 2'-7'-dicloro fluorescen-5-ilo, 2'-7'-dicloro fluorescen-6-ilo, 4-il-dihidrotetrametilrodamina, 5-il-tetrametilrodamina, 6-il-tetrametilrodamina, 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-boro-3a, 4a-diaza-s-3-etil-indaceno, 4,4-difluoro-5,7-difenil-4-boro-3 o 4a-diaza-s-3-etil-indaceno.

El kit que se utiliza en la presente invención puede contener adicionalmente (1) un anticuerpo para la detección que se une específicamente al marcador y (2) un ligando que se une específicamente a dicho anticuerpo para la detección. El ligando en el presente documento puede ser un anticuerpo secundario que se une específicamente a la proteína A o al anticuerpo para la detección. El ligando también puede ser un conjugado marcado con un marcador tal como una enzima colorante, un material fluorescente, un radioisótopo o un coloide. El anticuerpo para la detección del presente documento es preferentemente el anticuerpo primario biotinilado o el anticuerpo primario tratado con digoxigenina para el ligando, pero el procedimiento de tratamiento del anticuerpo para la detección no se limita a estos. Para unir el ligando al anticuerpo para la detección, se utiliza como ligando preferentemente estreptavidina o avidina, pero no siempre se limita a estas. En una realización preferida de la presente invención, se usó como ligando estreptavidina marcada con un material fluorescente y se usó el anticuerpo primario biotinilado para el ligando como anticuerpo para la detección.

El kit que se utiliza en la presente invención es adecuado para detectar la cantidad del anticuerpo para la detección tras tratar el anticuerpo para la detección para dar dicho conjugado anticuerpo-marcador, que facilita la monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer. El anticuerpo para la detección y el ligando se tratan para dar el conjugado anticuerpo-marcador paso a paso y luego se mide la cantidad del anticuerpo para la detección, dando lugar al diagnóstico y exploración del cáncer. En la presente invención, el anticuerpo para la detección se incubó con un conjugado anticuerpo-marcador lavado, seguido por lavado. Luego, se cuantificó el anticuerpo para la detección para medir la cantidad del marcador. La cuantificación o detección del anticuerpo para la detección se puede llevar a cabo utilizando fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, densidad óptica, reflexión o transmisión.

Se utiliza preferentemente un sistema de exploración de alto rendimiento (HTS) para explorar el anticuerpo para la detección o el ligando. Para el sistema, se pueden utilizar preferentemente el ensayo de fluorescencia que se realiza midiendo la fluorescencia del anticuerpo marcado con fluoresceína o el radioensayo que se realiza midiendo la radiación del anticuerpo marcado con un isótopo; la SPR (resonancia de plasmones superficiales) que mide los cambios de la resonancia de plasmones en la superficie sin utilizar un detector o la SPRI (resonancia por imagen de plasmones superficiales), pero no siempre se limita a estos.

El ensayo de fluorescencia es el procedimiento para confirmar una señal por aplicación puntual utilizando un programa de exploración de fluorescencia tras marcar el anticuerpo para la detección con un material fluorescente. Este procedimiento es útil para confirmar la fuerza de unión. El material fluorescente en el presente documento se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en Cy3, Cy5, isotiocianato de poli L-lisina-fluoresceína

(FITC), isotiocianato de rodamina B (RITC) y rodamina, pero no siempre se limita a estos. A diferencia del ensayo de fluorescencia, el sistema SPR facilita el análisis en tiempo real de la fuerza de unión del anticuerpo sin marcar la muestra con un material fluorescente. Pero este procedimiento tiene la desventaja de que no es posible el análisis simultáneo a gran escala. La SPRI hace posible el análisis simultáneo a gran escala de muestras utilizando micromatrices pero tiene la desventaja de su baja sensibilidad de detección.

El uso de un kit de la presente invención incluye adicionalmente un tampón de lavado o eluyente que puede mantener solo el conjugado marcador anticuerpo tras la eliminación del sustrato y la proteína no conjugada. El kit también contiene una muestra biológica tal como suero, orina, lágrimas, y saliva, a partir de la cual se puede confirmar el polipéptido específico de la enfermedad que se distingue de entre los normales. Para la muestra biológica se prefieren fluidos biológicos tales como sangre, suero, y plasma y el suero es el más preferido. La muestra puede modificarse con el fin de aumentar la sensibilidad de detección de un marcador. Por ejemplo, el suero obtenido de un paciente se puede pre-tratar por cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida, extracción secuencial o electroforesis en gel, etc., pero no siempre se limita a estos.

Para identificar los biomarcadores útiles para el diagnóstico del cáncer, los presentes inventores obtuvieron sueros de pacientes diagnosticados de cáncer de hígado, cáncer de mama, y cáncer de estómago y de sujetos normales, seguido por el análisis proteico utilizando SELDI-TOF MS (espectrometría de masas por desorción e ionización láser aumentada por superficie con tiempo de vuelo). El análisis proteico del presente documento se llevó a cabo preferentemente con SELDI-TOF MS (espectrometría de masas por desorción/ionización láser aumentada por superficie con tiempo de vuelo), MALDI-TOF MS (espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) o ESI-Q-TOF MS (espectrometría de masas por electropulverización cuadrupolar con tiempo de vuelo), pero no siempre se limitaba a estas (Richter R. y col., J Chromotogr B Biomed Sci Appl 726, 2535, 1999; Paweletz C.P. y col., Drug Dev Research 49, 3442, 2000). Se compararon el valor de p del ensayo U de Mann-Whitney y el AUC (área bajo la curva de características operativas del receptor) de los picos producidos entre el grupo normal y el grupo de pacientes de cáncer. Como resultado, entre todos los picos, el pico de 12,5 kDa (12.451 m/z) estaba peculiarmente reducido en los tres tipos de pacientes de cáncer, aunque la tasa de reducción variaba, a diferencia del grupo normal. Se confirmó que la tasa media de reducción del pico era mayor en el cáncer de hígado, seguido por el cáncer de estómago y cáncer de mama en ese orden, en comparación con el del grupo normal (véase la Tabla 1, Figuras 1-7).

Para aislar el pico proteico de la SELDI-TOF MS que mostraba cambios significativos en los pacientes con cáncer de hígado, cáncer de mama, y cáncer de estómago, los presentes inventores llevaron a cabo cromatografía y electroforesis en 2 dimensiones con el suero. La cromatografía en el presente documento es preferentemente cromatografía de intercambio iónico y cromatografía hidrofóbica, pero no siempre se limitaban a estas.

Para identificar el pico proteico de la SELDI-TOF MS que mostraba cambios significativos en los pacientes con cáncer de hígado, cáncer de mama, y cáncer de estómago, los presentes inventores llevaron a cabo la tinción y elución de la fracción proteica aislada por la cromatografía y electroforesis de 2 dimensiones anteriores, seguido por una ESI-Q-TOF MS/MS y secuenciación de aminoácidos del extremo N. Como resultado, se identificó la secuencia de restos de aminoácidos Ser-Glu-Gly-Ser-Ser-Val-Asn (SEQ ID NO: 4). Esta secuencia se corresponde con los restos de aminoácidos 199-205 del precursor de protrombina (P00734), y esta región es el extremo N del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina. Se confirmó la secuencia de aminoácidos total a partir de los resultados de la ESI-Q-TOF MS/MS y la secuenciación de los aminoácidos del extremo N. Como resultado, se confirmó que el fragmento era el fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) que perdía la arginina del extremo C del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina. El peso molecular calculado teóricamente (12.457 Da) era consistente con el pico encontrado en la SELDI-TOF MS (12.451 m/z) (véanse las Figuras 8-11). La Secuencia del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R es la siguiente:

ES 2 566 969 T3

Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu Glu
Gln Cys

Val Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg Leu Ala
Val Thr

Thr His Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala Gln
Ala Lys

Ala Leu Ser Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln
Leu Val

Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly
Val Trp

Cys Tyr Val Ala Gly Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys
Asp Leu

Asn Tyr Cys Glu Glu Ala Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp
Gly Leu

Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly (SEQ. ID.
NO: 1)

La presente invención proporciona por lo tanto un procedimiento de detección del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R para la monitorización, diagnóstico y exploración del cáncer, que comprende las siguientes etapas:

- 5 1) medir la expresión del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) en la muestra obtenida de un sujeto; y
- 2) comparar la expresión del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R de la etapa 1) con la de un sujeto normal, y luego seleccionar sujetos que demuestran una expresión reducida de des-R F2.

10 En este procedimiento, el fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R de la etapa 1) está compuesto por la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 1. Dicho fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R contiene preferentemente un epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la región del extremo N y otro epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 en la región del extremo C, pero no siempre se limita a estos.

En este procedimiento, la muestra de la etapa 1) es sangre, suero, o plasma, y el suero es el más preferido.

15 En este procedimiento, la expresión de la etapa 1) se mide preferentemente por electroforesis en gel de 2 dimensiones, MALDI-TOF MS (espectrometría de masas por desorción e ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo) o SELDI-TOF MS (espectrometría de masas por desorción e ionización láser aumentada por superficie con tiempo de vuelo), pero no siempre se limitan a estas.

20 En este procedimiento, la selección de la etapa 2) se aprovecha de las técnicas bioinformáticas. Particularmente, la expresión de cada marcador proteico se compara entre un individuo normal y un sujeto. Luego, se selecciona el sujeto que muestra expresión regulada negativamente. El procedimiento de análisis que se basa en bioinformática se describe en la Patente Coreana n.º 0679173.

En este procedimiento, el cáncer de la etapa 2) es cáncer de hígado, cáncer de mama o cáncer de estómago.

5 Cuando se utiliza el marcador proteico en un procedimiento de la presente invención, el análisis se lleva a cabo preferentemente por el siguiente procedimiento. Se introduce el proteoma sérico diana para diagnosticar un cáncer, seguido por el análisis basado en bioinformática. Los patrones de expresión del des-R F2, marcador específico de enfermedad, de un sujeto normal y una muestra de suero se convierten en valores numéricos y luego se comparan entre ellos. Basándose en la comparación, el proteoma sérico diana se juzga como normal o cáncer, sugiriendo que la monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer puede ser posible por este.

La presente invención proporciona además el uso de un biochip para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer, en el que las biomoléculas específicas del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R están integradas en un sustrato sólido.

10 La biomolécula del presente documento preferentemente es un anticuerpo o un aptámero, pero no siempre se limita a estos.

El sustrato sólido del presente documento se selecciona preferentemente de entre el grupo que consiste en plástico, cristal, metal y sílice, pero no siempre se limita a estos.

15 El cáncer en el presente documento es cáncer de hígado, cáncer de mama, o cáncer de estómago, pero no siempre se limita a estos.

20 Particularmente, cuando se utiliza el marcador proteico en un procedimiento de la presente invención, el análisis se lleva a cabo preferentemente por el siguiente procedimiento. Se introduce el proteoma sérico diana para el diagnóstico del cáncer, seguido por el análisis basado en bioinformática. Los patrones de expresión de des-R F2, el marcador proteico específico de enfermedad, de un sujeto normal y una muestra de suero se convierten en valores numéricos y entonces se comparan entre ellos. Basándose en la comparación, el proteoma sérico diana se juzga como normal o cáncer, sugiriendo que la monitorización, diagnóstico, y exploración del cáncer puede ser posible mediante este.

El presente documento también desvela el uso de un fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R para la construcción de un kit para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer.

25 Además, el presente documento desvela el uso de un fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R para la construcción de un biochip para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer.

El cáncer en el presente documento es cáncer de hígado, cáncer de mama, o cáncer de estómago.

30 El fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R está regulado negativamente de manera específica en un sujeto con cáncer de hígado, cáncer de mama, o cáncer de estómago, en comparación con el de un sujeto normal. Por lo tanto, este fragmento se puede utilizar como un marcador proteico para la producción de un kit o un biochip para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer de hígado, cáncer de mama o cáncer de estómago.

Modo para la invención

35 La práctica y las realizaciones actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes Ejemplos.

Sin embargo se apreciará que los expertos en la técnica, al considerar la presente divulgación, puede hacer modificaciones y mejoras dentro del espíritu y ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1: Obtención y conservación del suero

40 En la presente invención, se prepararon tres grupos de ensayo; el grupo 1 con 71 sujetos normales (29 mujeres, 42 hombres) y 66 pacientes con cáncer de hígado (14 mujeres, 52 hombres); el grupo 2 con 250 sujetos normales (119 mujeres, 131 hombres) y 245 pacientes con cáncer de estómago (84 mujeres, 161 hombres); y el grupo 3 con 196 sujetos normales (196 mujeres) y 252 pacientes con cáncer de mama (252 mujeres).

45 La edad de los sujetos normales del grupo 1 para el experimento relacionado con el cáncer de hígado variaba desde 29 a 64 (media: 46,9, mediana: 47), y la edad de los pacientes con cáncer de hígado variaba desde 35 a 75 (media: 57,1, mediana: 58). La edad de los sujetos normales del grupo 2 para el experimento relacionado con el cáncer de estómago variaba desde 23 a 67 (media: 45,7, mediana: 45) y la edad de los pacientes con cáncer de estómago variaba desde 28 a 86 (media: 59,1, mediana: 61). Los estadios del cáncer de los que tenían cáncer de estómago eran los siguientes: estadio 1, 129 pacientes; estadio 2, 48 pacientes; estadio 3, 36 pacientes; y estadio 4, 32 pacientes. En el caso del experimento relacionado con el cáncer de mama, los participantes eran todos femeninos y la edad de los sujetos normales variaba desde 23 a 71 (media: 46,5, mediana: 45) y la edad de los pacientes con cáncer de mama variaba desde 21 a 82 (media: 47,5, mediana: 47). Los estadios de cáncer de los pacientes con cáncer de estómago eran los siguientes: estadio 0, 17 pacientes; estadio 1, 71 pacientes; estadio 2, 104 pacientes; estadio 3, 50 pacientes; y estadio 4, 10 pacientes.

Se sacaron 5 ml de sangre periférica de cada uno de los sujetos normales, de los pacientes de cáncer de hígado, cáncer de mama, y cáncer de estómago utilizando un tubo vacutainer SST II (Becton Dickinson), que se dejó a temperatura ambiente durante una hora. Se llevó a cabo la centrifugación a 1500 g durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante. Se tomó el suero del sobrenadante y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

5 Ejemplo 2: Análisis de las proteínas del suero

Se analizó el suero por matriz ProteinChip (Ciphergen) de intercambio aniónico (Q10). Particularmente, 10 µl de suero se diluyeron con 15 µl de tampón de dilución (9 M de Urea, 2% de CHAPS), que se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 45 µl de tampón de unión Q10 (0,05% de Triton X-100 en 50 mM de HEPES, pH 7,0) a 5 µl de muestra de suero diluida, seguido por mezclado removiendo. Para equilibrar el chip Q10, se cargaron 10 µl de tampón de unión en cada punto, que se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras eliminar el tampón de unión, se cargaron otra vez 10 µl de tampón de unión nuevo en cada punto, que se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Se cargaron 5 µl de la mezcla de suero (muestra de suero + tampón de solubilización + tampón de unión) en cada punto, seguido por la reacción en una cámara humidificada a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras eliminar la mezcla de suero, se cargaron 10 µl del tampón de unión y luego se eliminó el tampón de unión directamente (se repitió 4 veces). Tras eliminar el tampón de unión, se cargaron 5 µl de agua HPLC en el mismo. Luego se eliminó el agua HPLC (se repitió dos veces). Se secó el chip a temperatura ambiente. Se cargó 1 µl de solución SPA (5 mg de ácido sinapínico en acetonitrilo al 50% y 0,5% de ácido trifluoroacético) en el punto seco. Cuando se secó la SPA, se cargó de nuevo 1 µl de la solución. Cuando el punto estaba completamente seco se procesó el chip en el Sistema ProteinChip Serie 4000 (Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, EE. UU.), y se obtuvo el espectro. En ese momento, las condiciones eran las siguientes; Masa del Foco: 15.000, energía del láser: 3000 nJ, 265 disparos, intervalo de masa 1000-200000 Da.

Ejemplo 3: Análisis del espectro

Se llevó a cabo la calibración de masa de acuerdo con calibración externa utilizando un calibrador tal como la superóxido dismutasa bovina, mioglobina equina, beta-lactoglobulina A bovina, y peroxidasa de rábano rusticano (Ciphergen Biosystems Inc., Fremont, CA, EE.UU.), seguido por la normalización utilizando la corriente iónica total. Se llevó a cabo la detección automática del pico utilizando el software Ciphergen Express Client ver. 3.0 (señal a ruido: 5 o más, profundidad del valle: 5 o más, umbral mínimo del pico: 0%, ventana de masa del grupo: 0,3% PM). Como resultado, se confirmaron 203 grupos de picos en total. Se compararon el valor p del ensayo U de Mann-Whitney y el AUC (área bajo la curva de características operativas del receptor) de los picos entre los grupos normales y con cáncer.

Como resultado, entre todos los picos, el patrón de expresión del pico de 12,5 kDa (12.451 m/z) era significativamente diferente en los tres grupos de cáncer, respecto al del grupo normal. Como se muestra en la Tabla 1, el pico estaba reducido en los grupos con cáncer, aunque la tasa de reducción variaba, en comparación con el del grupo normal. La tasa media de reducción en cada grupo con cáncer respecto a la del grupo normal era la siguiente; 0,57 en cáncer de estómago, 0,67 en cáncer de mama y 0,31 en cáncer de hígado. Así, el pico estaba más reducido en el cáncer de hígado seguido por el cáncer de estómago y cáncer de mama. El AUC de cada cáncer era el siguiente; 0,76 en cáncer de estómago, 0,73 en cáncer de mama y 0,97 en cáncer de hígado (Figuras 1-7).

[Tabla 1]

	Media (cáncer)	Media (normal)	Media (cáncer)/Media (normal)	valor de p
Cáncer de hígado	Pacientes de cáncer de hígado n=66	n=71	-	
	4,14	13,21	0,31	1,56 10 ⁻²¹
Cáncer de estómago	Pacientes de cáncer de estómago n=245	Sujeto normal n=250	-	
	11,14	19,39	0,57	1,16 10 ⁻²³
Cáncer de mama	Pacientes de cáncer de mama n=252	Sujeto normal n=196	-	
	6,93	10,31	0,67	1,73 10 ⁻¹⁷

Ejemplo 4: Separación de la proteína de 12.451 m/z<4-1> Preparación de una muestra de suero resistente al calor

5 Se mezclaron 50 ml de Tris-HCl 0,2 M (pH 9,0) (que incluía un 7% de PEG 6000 (Merck) y 20 mM de EDTA) y 50 ml de suero humano agrupado (Serologicals Corporation, Norcross, GA, EE. UU.) en una proporción de 1:1. Se hirvió agua en un vaso de precipitados de 1 l a 100. La mezcla se cargó en cuatro tubos de 50 ml (25 ml en cada uno), seguido por ebullición a 100 durante 10 minutos. Los tubos se sacaban cada 2 minutos para mezclarlos removiendo. Tras permanecer 10 minutos a temperatura ambiente, se procedió a centrifugación de la mezcla a 3.000 rpm durante 15 minutos para separar el sobrenadante. Si había material flotando, se filtraba el sobrenadante y se procedía a la cromatografía. Como resultado, se obtuvo 50-60 ml de suero cocido.

10 <4-2> Cromatografía de intercambio iónico

15 Se mezclaron 100 mM de fosfato sódico y 50 mM de ácido cítrico en una proporción de 4,6:5,4 para preparar un tampón (pH 4,5-6,0). El suero cocido se diluyó con el tampón en una proporción de 1:2 (50 ml de suero cocido + 100 ml de tampón = 150 ml). Se empaquetaron 2 ml de resina Q-Sepharosa Fast Flow (Sigma Q1126) en cuatro columnas de centrifugación de 10 ml (Columnas de Centrifuga Handee™ (PIERCE)). Se llevó a cabo la centrifugación con las columnas empaquetadas con una fuerza de 1.000 g durante 2 minutos, para eliminar por centrifugación la solución conservante. Se llevó a cabo el pre-equilibrado de perlas utilizando 4 ml del tampón preparado (2 ~ 3 veces). El suero cocido diluido se unió a la columna durante 20 minutos (12,5 ml/columna). Se centrifugó la columna a 1000 g para eliminar las proteínas no unidas. El suero cocido que permanecía en la columna se unió de nuevo con 12,5 ml en cada una durante 20 minutos. Se llevó a cabo de nuevo la centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos para eliminar las proteínas no unidas. El suero que permanecía en la columna se unió de nuevo con 12,5 ml en cada una durante 20 minutos. Se llevó a cabo de nuevo la centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos para eliminar la proteína no unida. La resina de intercambio aniónico se lavó con el tampón que se preparó en primer lugar anteriormente, dos veces durante 5 minutos cada vez. La proteína unida a la resina de intercambio aniónico se eluyó con 3 ml de TFA al 1% 4 veces durante 10 minutos. Las fracciones obtenidas de cada estadio se colocaron en el chip-Au y se confirmaron por SELDI-TOF.

25 <4-3> Cromatografía hidrofóbica

30 Se empaquetó resina Octil-Sepharosa CL 4B (Sigma 06001) en dos columnas de centrifugación, 2 ml en cada una, seguido por centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos para eliminar la solución conservante. La resina hidrofóbica se pre-equilibró con 4 ml de TFA al 1% (2 ~ 3 veces). Las fracciones eluidas con TFA al 1% se unieron en la columna empaquetada con la resina hidrofóbica, 12 ml en cada una, durante 20 minutos. Se llevó a cabo la centrifugación a 1.000 g durante 2 minutos para eliminar las proteínas no unidas. Las fracciones que permanecían en la misma columna se unieron de nuevo con 12 ml en cada una durante 20 minutos. Se llevó a cabo la centrifugación de nuevo a 1.000 g durante 2 minutos para eliminar las proteínas que no reaccionaban. La resina hidrofóbica se lavó tres veces con una solución de TFA 0,1%/ACN 10% durante 5 minutos. Tras el lavado, las proteínas unidas a la resina hidrofóbica se eluyeron con 3 ml de TFA 0,1%/ACN 50% 4 veces durante 10 minutos. Las fracciones eluidas se concentraron para hacer el volumen total de 1 ml utilizando el secador por congelación para la separación por FPLC.

35 <4-4> Cromatografía hidrofóbica (sistema FPLC, columna C8 20 ml)

40 Se llevó a cabo la separación con una columna C8 (columna HiPrep 16/10 Octil FF (Amersham) utilizando el sistema de tampón A (TFA al 0,1%) y tampón B (TFA 0,1%/ACN 80%). Primero la proteína se unió utilizando TFA al 0,1% durante 13 minutos. Segundo, se graduó ACN de 0 a 50% durante 25 minutos. Tercero, se vertió isocráticamente ACN al 50% durante 15 minutos. Al final, se llevó a cabo un lavado con ACN 80% durante 20 minutos. En ese momento el caudal era de 2 ml/min. Las fracciones obtenidas de cada estadio se colocaron en el Au-chip, seguido por confirmación con SELDI-TOF. Se confirmó el pico de 12.451 m/z en el estadio de elución con ACN al 50%. Las fracciones confirmadas se recolectaron y se secaron con el secador en congelación. Para eliminar el TFA y ACN que permanecían en las fracciones se repitió el secado completo/disolución utilizando HPLC D. W 10 veces, seguido por confirmación utilizando un papel de pH. Las muestras secadas se disolvieron en 200 µl de D. W y se almacenaron a -70.

45 <4-5> Electroforesis de 2 dimensiones

50 Se mezclaron 40 µl de la muestra almacenada con 10 µl de SDS al 10%. La mezcla se mezcló con 220 µl de 1,1 x tampón de rehidratación (8,8 M de Urea, 4,4% CHAPS, 0,55% de tampón IPG, BPB). Se cargaron 260 µl de la mezcla en una tira de pH 4-7 de 13 cm. Las condiciones de enfoque isoelectrico (IEF) se muestran en la Tabla 2.

[Tabla 2]

	Voltaje (V)	Tiempo (h)
Rehidratación	30	10
Desalado	500	1
Desalado	1000	1
Etapa y Mantenimiento	3000	1
Etapa y Mantenimiento	5000	2
Gradiente	8000	2
Etapa y Mantenimiento	8000	4,5

5 Al completar el enfoque isoeléctrico, se empapó la tira IPG en tampón de equilibrado (50 mM de Tris-HCl, pH 8,8 / 6 M de Urea / 30% de glicerol / 2% de SDS / BPB) durante 5 minutos, seguido por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%. La corriente constante era de 10 mA en el estadio 1 durante 30 minutos, y 20 mA en el estadio 2 durante 5 horas. Al completar la electroforesis, el gel se tiñó con Azul Coomassie G-250 (Fluka) durante una noche (Figura 8).

<4-6> Elución pasiva

10 Las manchas para eluir se seleccionaron de entre el gel teñido en el Ejemplo <4-5>, que se recortaron con la punta de una pipeta y se lavaron para retirar el colorante azul Coomassie. Particularmente, el lavado se llevó a cabo con 20 µl de ACN 50%/50 mM de bicarbonato amónico tres veces (5 minutos cada vez). El número de lavados se determinó por la fuerza de la tinción. Las manchas del gel lavadas se sometieron a deshidratación con un 100% de ACN durante 20 minutos. Se añadieron 5-10 µl de tampón de elución (un 10% de ácido fórmico (Fluka), un 30% de ACN, un 20% de isopropanol, un 40% de D. W.) a la mancha del gel deshidratado, seguido por agitado vigoroso durante 2 horas a temperatura ambiente. Se colocaron 2 µl de proteína eluida en un chip NP20, seguido por confirmación con SELDI-TOF MS (Figura 8).

Ejemplo 5: Identificación de la proteína de 12.451 m/z

<5-1> ESI-Q-TOF MS

20 La mancha de proteína de 12451 (m/z) confirmada por electroforesis y elución pasiva en el Ejemplo 4 se analizó con ESI-Q-TOF MS/MS (solicitado a Intuzen Co.) (Figura 9).

25 Primero, se llevó a cabo la digestión en gel (Jensen, O. N., y col., Anal Chem., 69, 1706-1714, 1997). La mancha del gel se cargó en 100 µl de solución de desteñido (50% de metanol en 10% de ácido acético), seguido por agitado durante 5 minutos. La solución se eliminó y la mancha del gel se dejó en 200 mM de solución de bicarbonato amónico durante 20 minutos. La mancha del gel se deshidrató con 100 µl de acetonitrilo y se secó con vacío rápido. La mancha del gel seca se rehidrató con 20 µl de bicarbonato amónico 50 mM que contenía 0,2 g de tripsina modificada (Promega) en hielo. La solución remanente se eliminó y se le añadieron 30 µl de bicarbonato amónico 50 mM, seguido por la reacción a 37 °C durante una noche. La solución de péptido se desaló y se concentró utilizando una nanocolumna C18 construida por los inventores antes del análisis de masas. La columna se preparó llenando la punta GELoader (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) con 100-300 nl de material R2 poroso invertido (tamaño de perla 20-30 µm, PerSeptive Biosystems), y se dio presión de aire suavemente utilizando una jeringa de 10 ml para permitir que la solución recorriera la columna. Se mezclaron 30 µl de la mezcla peptídica con 30 µl de ácido fórmico al 5%, que se cargaron en la columna. La columna se lavó con 30 µl de ácido fórmico al 5%, seguido por la elución utilizando un 50% de metanol/49% H₂O/1% ácido fórmico.

35 El péptido preparado por la digestión en gel procedió hacia la nano-ESI MS/MS utilizando el espectrómetro de masas Q-TOF (Micromass, Manchester, RU). La fuente de temperatura estaba a 80 °C y se mantuvo una presión de nitrógeno de 0-5 psi para mantener un caudal (10-30 nl/min) estable. Se aplicó 1 kV de potencial eléctrico a la aguja del nanoelectropulverizador pre-revestida de borosilicato (EconoTip™, New Objective, EE. UU.). Para confirmar los iones precursores que utilizan la disociación inducida por colisión (CID) que tiene energía de colisión comparativa, se registró el espectro MS/MS. La tensión del cono era 40 V. Para seleccionar el ion precursor para la fragmentación de la celda de colisión hexapolar, se utilizó un analizador cuadrupolar y se utilizó argón con una presión de 6-7 x 10⁻⁵ mbar como gas de colisión. En ese momento, la energía de colisión era de 20-30 V. Los iones del producto se analizaron con el analizador TOF ortogonal equipado con reflector, placa detectora microcanal y un convertidor tiempo-a-digital. Los datos se procesaron con un sistema Mass Lynx Windows NT PC.

Al final, se llevó a cabo la identificación proteica y el procesado de secuencia. Las secuencias de aminoácidos obtenidas presumiblemente por espectro MS/MS peptídico triptico y PepSeq, el programa de secuenciación de péptidos de novo, se exploraron a lo largo de las bases de datos NCBIInr y EST utilizando el programa de exploración MASCOT (www.mnatrixscience.com) y BLAST.

5 <5-2> Secuenciación del extremo N

Al completarse la electroforesis de 2 dimensiones del Ejemplo <4-5>, la mancha del gel diana para la transferencia se recortó y se transfirió a una membrana PVDF con 250 V durante una hora (utilizando el Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA)). Al completarse la transferencia, se tiñó la membrana con Coomassie G-250 durante una noche. La membrana teñida se destiñó durante 10 minutos para eliminar el fondo (10% de metanol, 7% de ácido acético). Se llevó a cabo la secuenciación del extremo N utilizando el secuenciador de proteínas Procise 492 cLC (Applied Biosystems, EE. UU.) en el Instituto de Ciencia Básica de Corea.

Como resultado, se identificó la secuencia de restos de aminoácidos, que era Ser-Glu-Gly-Ser-Ser-Val-Asn (SEQ ID NO: 4). Esta secuencia se correspondía con los restos de aminoácidos 199-205 del precursor de la protrombina (P00734), que es precisamente la región del extremo N del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina (Figura 10). A partir de los resultados del análisis ESI-Q-TOF y las secuenciación del extremo N, se podía suponer la secuencia de aminoácidos total del pico de 12451 (m/z) (Ser 199 - Gly 313). Este fragmento se identificó como des-R F2 que era el fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina que carecía de la arginina del extremo C. Y el peso molecular calculado teóricamente (12.457 Da) era consistente con el pico encontrado en la SELDI-TOF MS (12.451 m/z) (véase la Figura 11).

20 **Aplicabilidad industrial**

Como se ha explicado anteriormente en el presente documento, el procedimiento, el uso de un kit diagnóstico y de un biochip en dicho procedimiento de la presente invención facilita el diagnóstico, exploración y evaluación del progreso de la enfermedad en el cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago, de forma que pueden contribuir a una respuesta rápida a la enfermedad para aumentar la tasa de supervivencia de los pacientes con cáncer y pueden contribuir a reducir la pérdida económica nacional producida por la relación con el cáncer.

Listado de secuencias en el Texto

SEQ ID NO: 1 es la secuencia de aminoácidos del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) originado a partir del suero humano.

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos de un epítipo localizado en la región del extremo N del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R.

SEQ ID NO: 3 es la secuencia de aminoácidos de un epítipo localizado en la región del extremo C del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R.

SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos de la región del extremo N del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R, que se corresponde con los restos de aminoácidos 199-205 del precursor de protrombina (P00734).

Los expertos en la técnica apreciarán que las concepciones y realizaciones específicas desveladas en la descripción anterior puede utilizarse rápidamente como una base para modificar o diseñar otras realizaciones para llevar a cabo los mismos fines de la presente invención. Los expertos en la técnica apreciarán también que tales realizaciones equivalentes no se alejan del espíritu y ámbito de la invención como se expone en las reivindicaciones adjuntas.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BIOINFRA INC.

<120> Procedimiento para monitorizar, diagnosticar, y explorar el cáncer por medio de la medición de la concentración del fragmento F2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) en un suero

<130> P-WON-067/WOEP

<140> 09 720 089.3

<141> 13-03-2009

<150> KR 10-2008-0023803

<151> 14-03-2008

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 566 969 T3

<210> 1
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu Glu Gln Cys Val
 1 5 10 15
 Pro Asp Arg Gly Gln Gln Tyr Gln Gly Arg Leu Ala Val Thr Thr His
 20 25 30
 Gly Leu Pro Cys Leu Ala Trp Ala Ser Ala Gln Ala Lys Ala Leu Ser
 35 40 45
 Lys His Gln Asp Phe Asn Ser Ala Val Gln Leu Val Glu Asn Phe Cys
 50 55 60
 Arg Asn Pro Asp Gly Asp Glu Glu Gly Val Trp Cys Tyr Val Ala Gly
 65 70 75 80
 Lys Pro Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Asp Leu Asn Tyr Cys Glu Glu Ala
 85 90 95
 Val Glu Glu Glu Thr Gly Asp Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala
 100 105 110
 Ile Glu Gly
 115

10

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 2

Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn Leu Ser Pro Pro Leu
 1 5 10

20

<210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 3

Gly Leu Asp Glu Asp Ser Asp Arg Ala Ile Glu Gly
 1 5 10

30

<210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

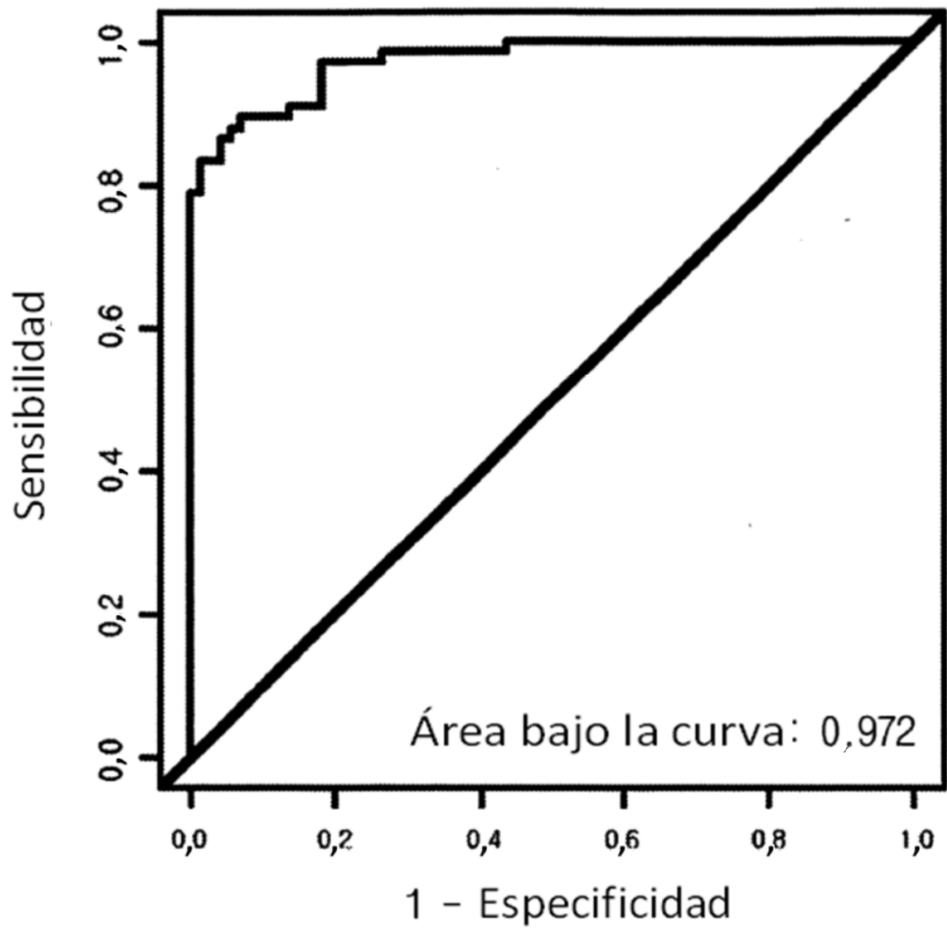
<400> 4

Ser Glu Gly Ser Ser Val Asn
 1 5

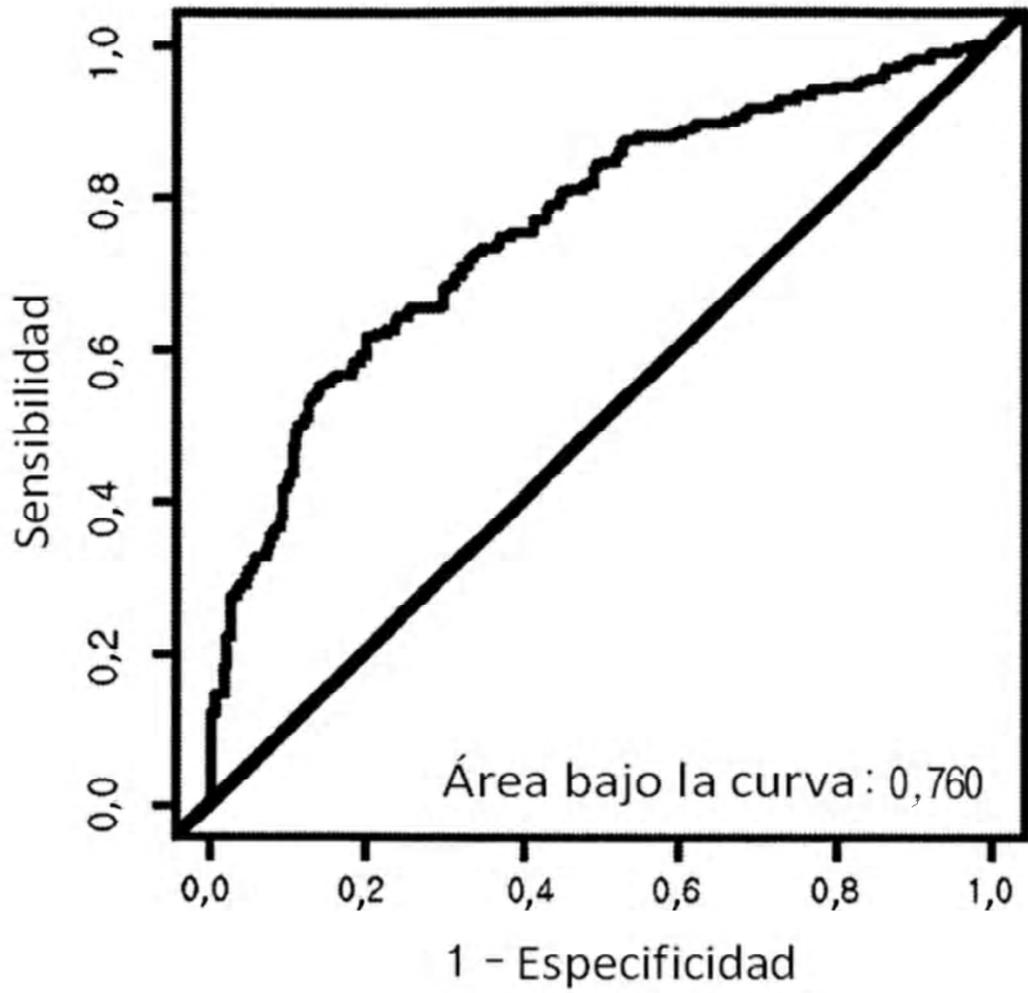
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para detectar el fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R para monitorizar, diagnosticar y explorar el cáncer seleccionado de entre el grupo que consiste en cáncer de hígado, cáncer de mama y cáncer de estómago, en el que dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:
 - 5 1) medir la expresión del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R de la SEQ ID NO: 1 en una muestra obtenida de un sujeto seleccionado de entre un grupo que consiste en sangre, suero y plasma; y
 - 2) comparar la expresión del fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R de la etapa 1) con la de un sujeto normal, y luego seleccionar los sujetos que demuestran una expresión reducida de des-R F2.
- 10 2. El uso de un kit en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho kit contiene un anticuerpo que se une específicamente al fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R (des-R F2) de la SEQ ID NO: 1, en el que el fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R está regulado negativamente en un sujeto con cáncer, en comparación con un sujeto normal y en el que el kit adicionalmente incluye un anticuerpo que se une específicamente a la proteína.
- 15 3. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R contiene un epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 2 en la región del extremo N y otro epítipo que tiene la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 3 en la región del extremo C.
- 20 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo que se une específicamente al fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R es un conjugado marcado con un ligando, una enzima colorante, un material fluorescente, un radioisótopo o un coloide.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo que se une específicamente a la proteína se marca con una enzima colorante, un material fluorescente, un radioisótopo o un coloide.
- 25 6. El uso de un biochip en un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en dicho biochip se integran biomoléculas específicas para el fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R de la SEQ ID NO: 1 en un sustrato sólido y en el que el fragmento 2 del péptido de activación de la protrombina des-R está regulado negativamente en un sujeto con cáncer, en comparación con un sujeto normal.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la biomolécula es un anticuerpo o un aptámero.

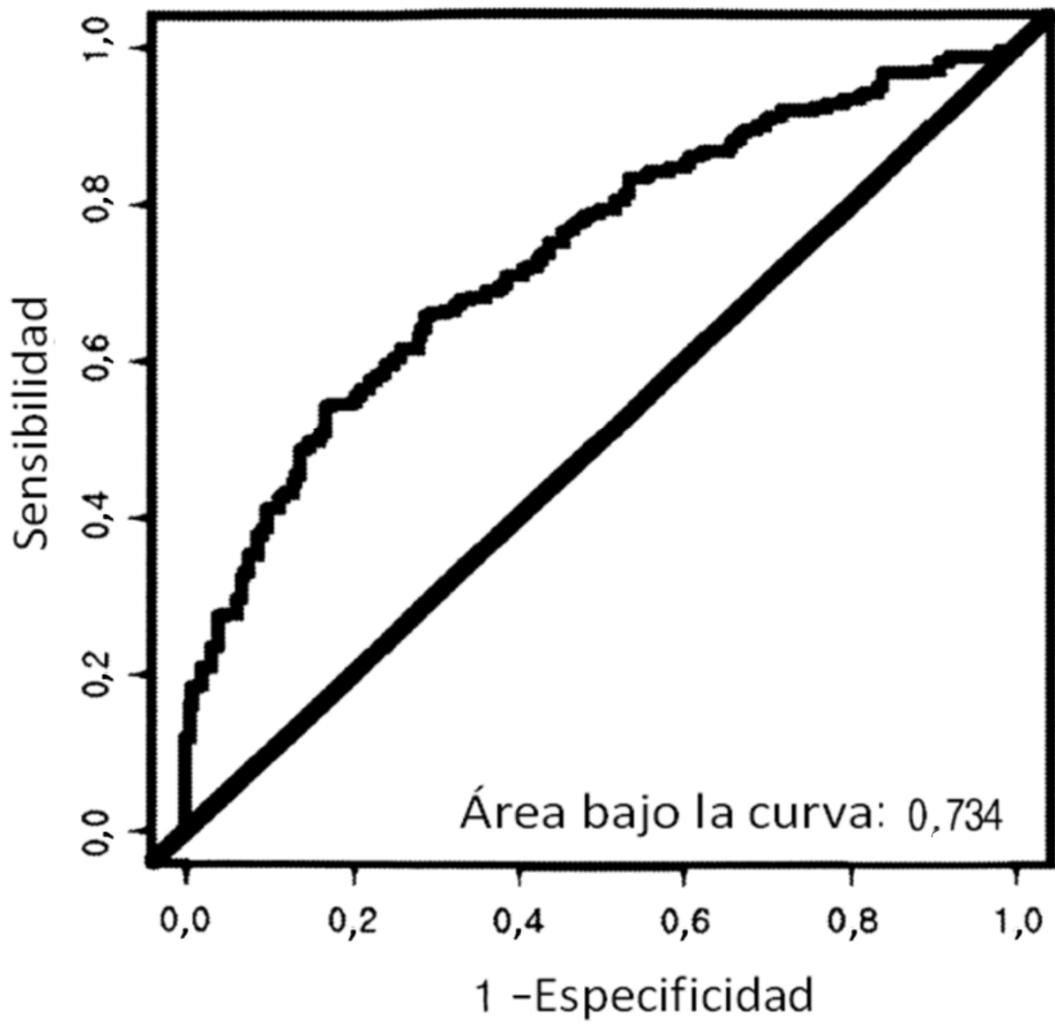
[Fig. 1]



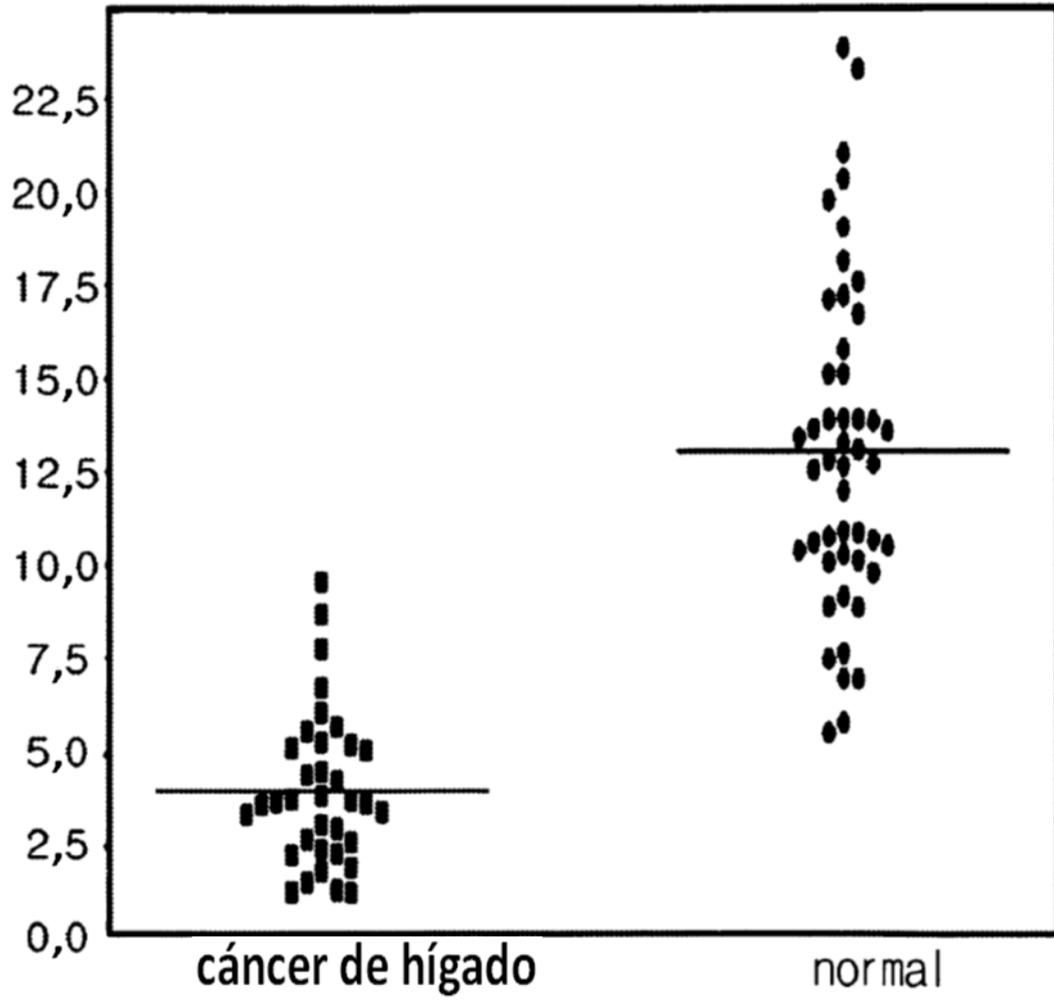
[Fig. 2]



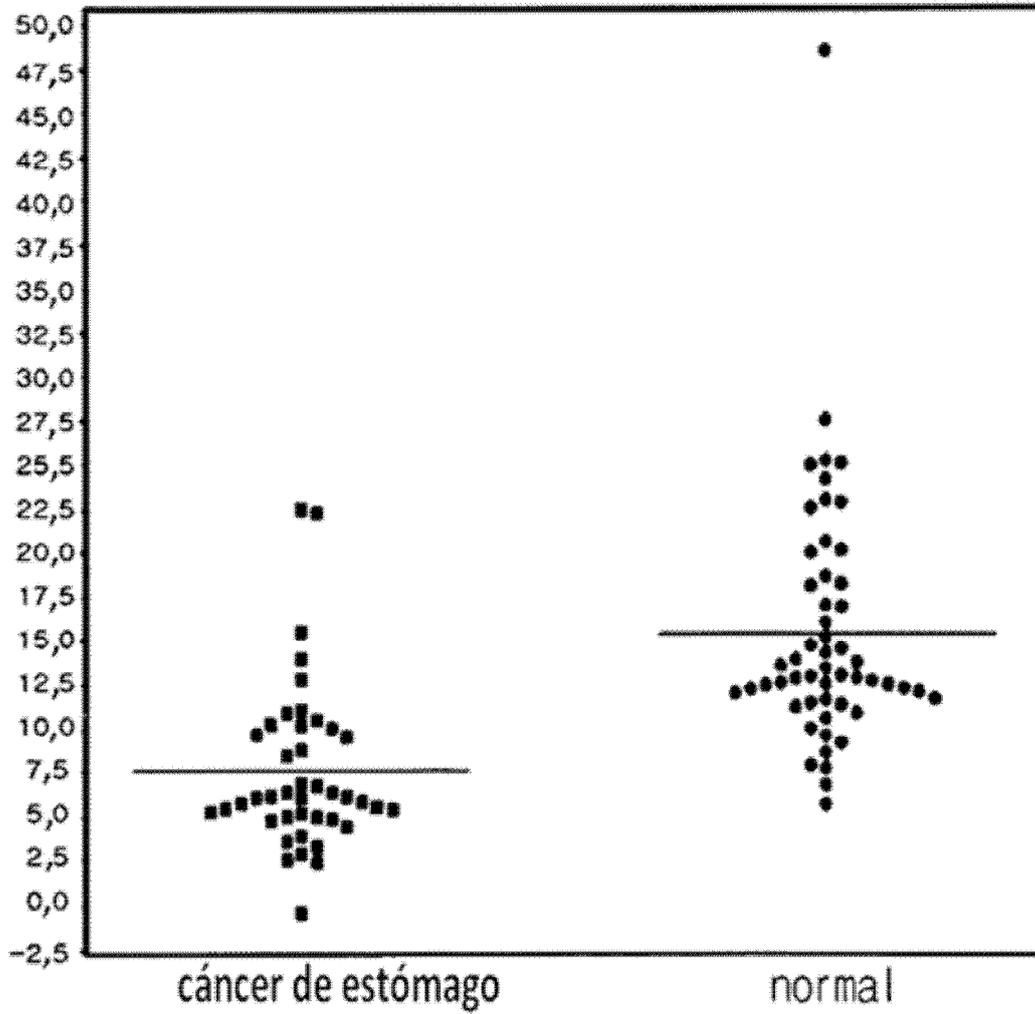
[Fig. 3]



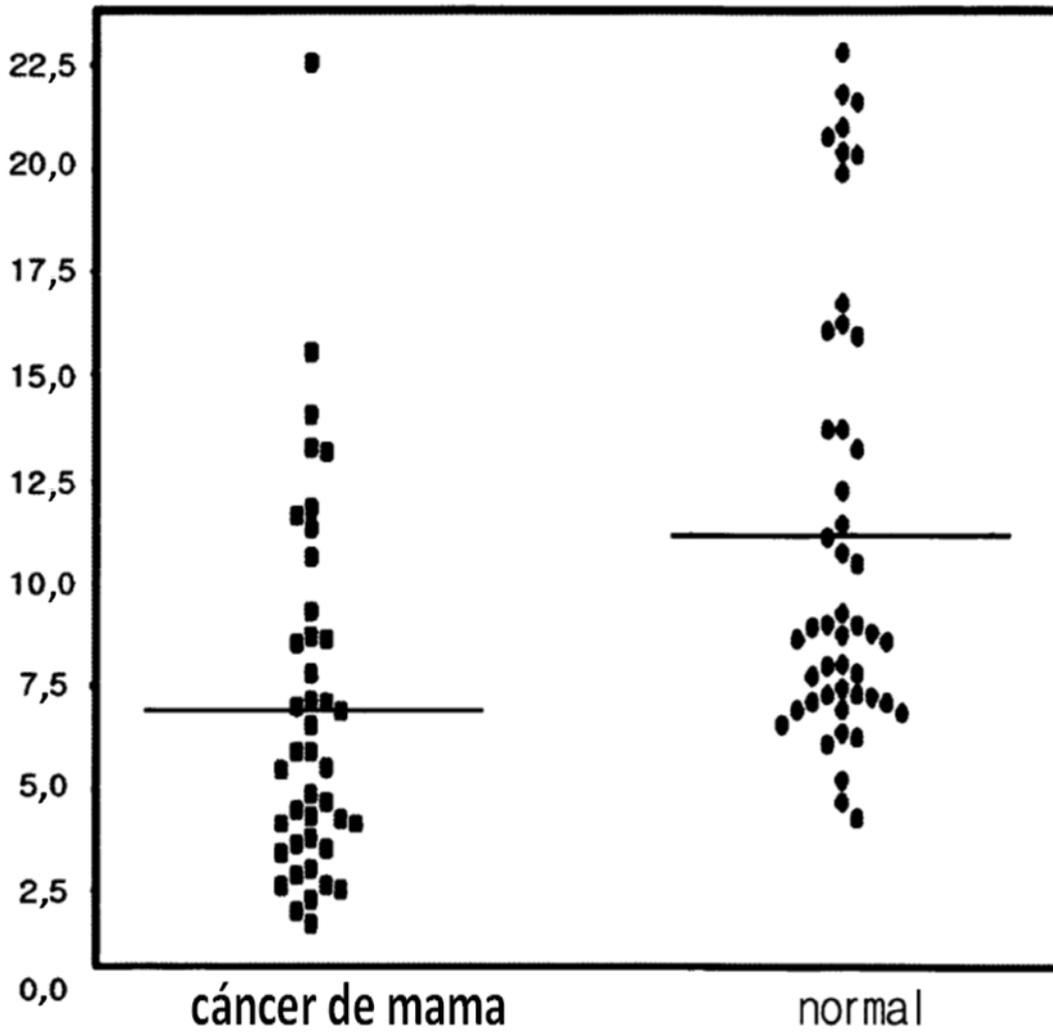
[Fig. 5]



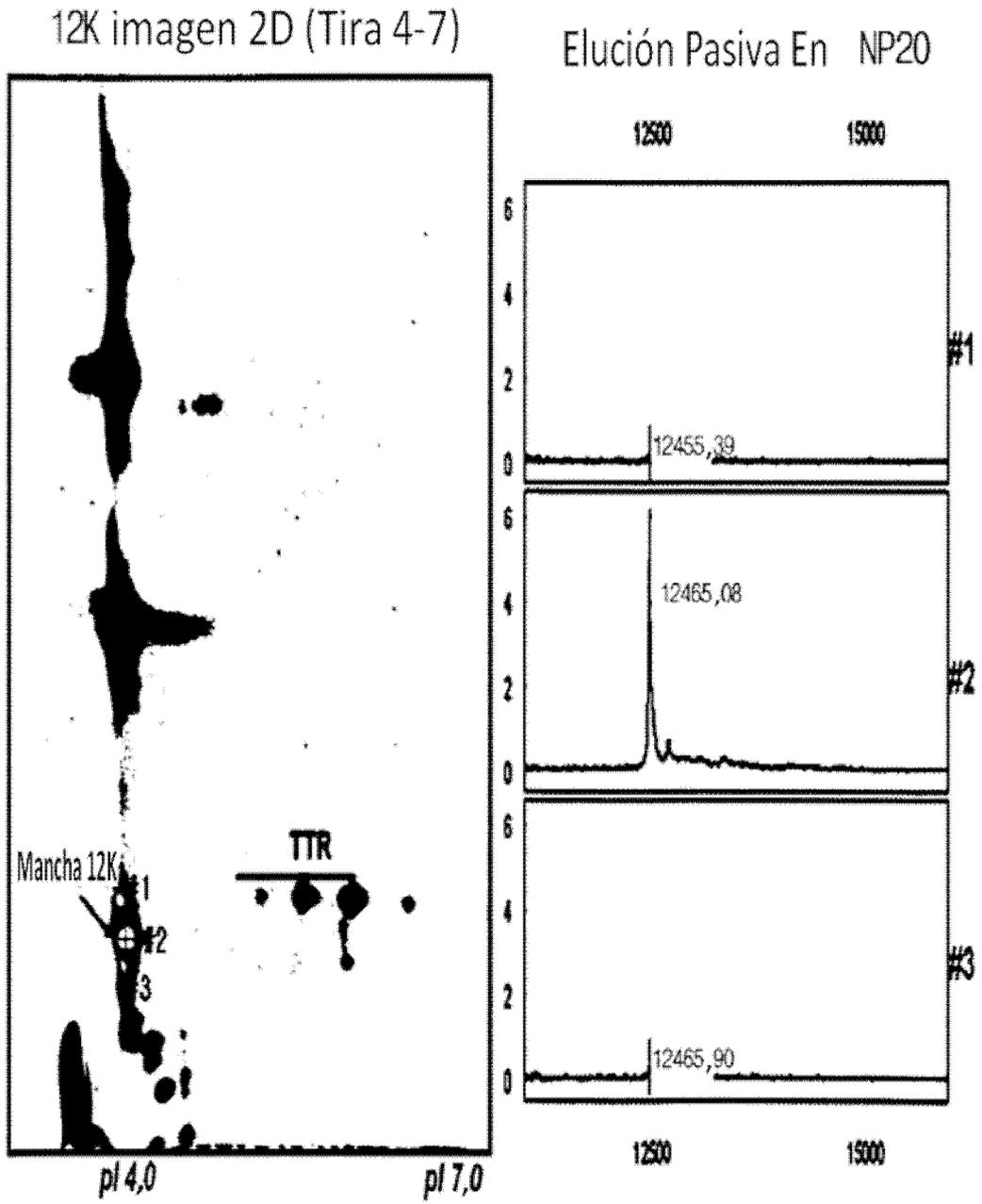
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



Inicio-Fin	Observado	Mr(expt)	Mr(calc)	Secuencia Delta perdida
199 - 217	1036,0417	2070,0688	2069,9688 0,1001	0 R.SEGSSVNLSPPLEQCVDR.G(Valor ionico 42)
199 - 217	691,0425	2070,1057	2069,9688 0,1369	0 R.SEGSSVNLSPPLEQCVDR.G(Valor ionico 64)
199 - 217	691,0472	2070,1198	2069,9688 0,1510	0 R.SEGSSVNLSPPLEQCVDR.G(Valor ionico 73)
199 - 224	722,8864	2887,5165	2887,3519 0,1646	1 R.SEGSSVNLSPPLEQCVDRGQQYQGR.L(Valor ionico 22)
199 - 224	963,5258	2887,5556	2887,3519 0,2037	1 R.SEGSSVNLSPPLEQCVDRGQQYQGR.L(Valor ionico 25)
225 - 243	665,7327	1994,1763	1994,0408 0,1355	0 R.LAVTTHGLPCLAWSAQAK.A(Valor ionico 33)
225 - 243	665,7341	1994,1805	1994,0408 0,1397	0 R.LAVTTHGLPCLAWSAQAK.A(Valor ionico 53)

[Fig. 9]

1 MAHVRGLQLP GCLALAALCS LVHSQHFLA PQGARSLLQR VRRANTFLEE
 51 VRKGNLEREC VEETCSYEEA FEALESSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL
 101 AACLEGNCAE GLGTNYRGHV NITRSGIECQ LWRSPYHPKP EINSTTHPGA
 151 DLQENFCRNP DSSTTGPWCY TTDPTVRRQE CSIPVCGQDQ VTVAMTPRSE
 201 GSSVNLSPPL EQCVPDRGQQ YGGR LAVTTH GLPCLAWASA QAKALSKHQD
 251 FNSAVQLVEN FCRNPDGDEE GWCYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEEIG
 301 DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFFNPRTFG SGEADCGLRP LFEKKSLEDK
 351 TERELLESYI DGRIVEGSDA EIGMSPWQVM LFRKSPQELL CGASLISDRW
 401 VLTAAHCLLY PPWDKNFTEN DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH
 451 PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSDYIHP VCLPDRETA A SLLQAGYKGR
 501 VTGWGNLKET WTANVGKGQP SVLQVNLPI VERPVCKDST RIRITDNMFC
 551 AGYKPDEGKR GDACEGDSGG PFV MKSPFNN RNYQMGIVSW GEGCDRDGKY
 601 GFYTHVFRLK KWIQKVIDQF GE

[Fig. 10]

1 11 21 31 41 51
1 MAHVRGLQLP GCLALAALCS LVHSHVFLA PQOARSLOR VRRANTFLEE VRKGNLEREC 60
61 VEETCSYEEA FEALESSTAT DVFWAKYTAC ETARTPRDKL AACLEGNCAE GLGTNYRGHV 120
121 NITRSGIECQ LMRSPYHPK EINSTTHPGA DLOENFORNP DSSTTGPWCY TTDPTVRRQE 180
181 CSIPVCGGQQ VTVAMTRSE GSSVNLSPPL EOCVPRGQQ YOGRLAVTTH GLPCLAWASA 240
241 QAKALSKHQD FNSAVQLVEN FORNPDGDEE GWNICYVAGKP GDFGYCDLNY CEEAVEEETG 300
301 DGLDESDRA IEGRTATSEY QTFFNPRTFG SGEADGGLRP LFEKKSLEDK TERELLESYI 360
361 DGRIVEGSDA EIGNSPWQVM LFRKSPQELL CGASLSDRW VLTAAHCLLY PPNDKNFTEN 420
421 DLLVRIGKHS RTRYERNIEK ISMLEKIYIH PRYNWRENLD RDIALMKLKK PVAFSDYIHP 480
481 VCLPDRETAA SLLQAGYKGR VTGNGNLKET WTANVKGQP SVLQVWNLPI VERPVCKDST 540
541 RIRITDNMFC AGYKPEDEKR GDACEGDSGG PFVNIKSPFNN RNWYMGIVSWI GEGDRDQKY 600
601 GFYTHVFRLK KWIQKVIDQF GE

[Fig. 11]