(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 569 485**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2008** **E 08827104 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016** **EP 2171468**

(54) Título: **Procedimiento de ensayo de la apolipoproteína AI para el diagnóstico in vitro del cáncer colorrectal**

(30) Prioridad:

19.07.2007 FR 0705211

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2016

(73) Titular/es:

BIOMERIEUX (100.0%)
CHEMIN DE L'ORME
69280 MARCY L'ETOILE, FR

(72) Inventor/es:

ATAMAN-ÖNAL, YASEMIN;
CHARRIER, JEAN-PHILIPPE;
CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIÈVE y
POIRIER, FLORENCE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 569 485 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 de ensayo de la apolipoproteína AI para el diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal

La presente invención se refiere al campo de la cancerología. Más particularmente, la presente invención tiene por objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal en un paciente humano mediante la determinación de la presencia de la apolipoproteína AI por ensayo inmunológico en una muestra biológica procedente de este paciente, pudiendo dicho procedimiento ser utilizado tanto en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico, como en el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema importante de salud pública. Su incidencia mundial se ha estimado en 875.000 nuevos casos en 1996[1]. En ambos sexos, es el cáncer que se produce con más frecuencia en los países occidentales, en los que está generalmente clasificado entre las 3 primeras causas de fallecimiento por cáncer. El porcentaje de supervivencia en 5 años en cualquier fase está próximo al 60%.

Sólo un diagnóstico precoz ofrece la esperanza de un tratamiento curativo. Ahora bien, en la actualidad, no existe ningún ensayo serológico de detección, ni diagnóstico específico que sea precoz.

La detección del cáncer colorrectal se realiza actualmente en Europa con dos enfoques diferentes: en primer lugar con la ayuda de una prueba paraclínica que consiste en buscar la presencia de sangre en las heces (Feacal Occult Blood test, FOBT, comercializado por ejemplo bajo el nombre de Hemoccult®). Esta técnica ha demostrado su utilizad clínica. Cuando se utiliza, cada 2 años en las personas mayores de 50 a 74 años, puede reducir del 15 al 20% la mortalidad por cáncer colorrectal[2]. Para ello, se necesita que más de la mitad de la población en cuestión participe regularmente en la detección, y que se realice una colonoscopia en caso de prueba positiva, seguida eventualmente de un tratamiento adecuado.

Sin embargo, esta técnica de detección sufre un cierto número de problemas:

* el inconveniente principal de este ensayo es su mediocre sensibilidad, muy especialmente para los adenomas (lesión displásica pre-cancerosa) que, si son de gran tamaño, conducirán, en 1 caso de cada 10, al desarrollo de un cáncer.

* la prueba es asimismo poco específica. La aparición de sangre en las heces puede estar relacionada con una afección no tumoral: hemorragias colorrectales, hemorroides, fístulas, etc. En este caso, una investigación por colonoscopia debe ser realizada con los inconvenientes descritos a continuación.

* finalmente, los Hemoccult® son difíciles de interpretar, deben ser leídos por lo tanto en centros especializados, por un personal cualificado y competente.

También se han descrito unas pruebas inmunológicas específicas de la hemoglobina humana (Feca EIA®, Heme Select®, etc.). Constituyen probablemente un progreso con respecto a Hemoccult® pero presentan por esencia los mismos problemas. Es así que InSure™, comercializado por Enterix Inc., permite detectar el 87% de los pacientes que padecen CCR y el 47% de los que tienen unos pólipos precancerosos. Se trata de una prueba de detección de la hemoglobina humana en las heces, y más particularmente de la porción de globina de esta molécula.

Una segunda estrategia de detección es la realización sistémica de una colonoscopia después de la edad de 50 años, que permita en teoría reducir la mortalidad por cáncer colorrectal. Pero la aceptabilidad de este examen en sujetos con buena salud es demasiado baja para que una política de detección que utiliza la endoscopia disminuya la mortalidad (existe un cumplimiento de la colonoscopia en torno al 2% en los países de Europa que han establecido esta estrategia de detección). Existe un riesgo no insignificante (un 1‰) de perforación y hemorragia del colon y de fallecimiento (1/10.000), así como un coste elevado para la salud pública. Además, la colonoscopia necesita una preparación del colon previa muy restrictiva, que explica en parte el mal cumplimiento.

Los marcadores tumorales que se pueden detectar por inmunoensayo están descritos desde hace mucho tiempo en el ámbito del cáncer colorrectal. Se trata en particular del antígeno carcinoembrionario (ACE) y de CA19-9.

El ACE se utiliza para el seguimiento. No se puede utilizar solo para la detección o para el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal, ya que su sensibilidad y su especificidad son insuficientes. En efecto, este marcador se expresa por otros tipos de cánceres, y en patologías benignas. A pesar de todo, se puede aumentar la sensibilidad sin perder especificidad asociando al ACE otro marcador tumoral tal como el CA19-9 o el CA72-4.

Las causas de las variaciones fisiológicas del CA19-9 son raras, pero otras afecciones benignas (hepatobiliares, pancreáticas), o malignas pueden inducir un aumento del CA19-9. Este marcador, tomado aisladamente, no presenta por lo tanto tampoco ningún interés para el diagnóstico. Sin embargo, estando su concentración sérica correlacionada con el tamaño del tumor y con la presencia de metástasis, puede permitir también un seguimiento terapéutico o la puesta en evidencia precoz de recidivas.

Por otro lado, se han propuesto unas pruebas comerciales, tales como:

• Colopath®/ColorectAlert^{MD}, comercializado por Ambrilia, es una prueba de detección rápida y poco invasiva para el CCR. Colopath® detecta un plasmógeno (clase de lípidos complejos que pertenecen a los fosfolípidos) en la mucosa rectal de los individuos con una patología colorrectal, mientras que el ColorectAlert^{MD} detecta el antígeno-T, un azúcar complejo en la mucosa rectal. La prueba Colpath®/ColorectAlert^{MD} implica la aplicación de mucosa rectal en una tira de pruebas y el resultado positivo o negativo se basa en una reacción de Schiff. Ambrilia ha estudiado 1787 sujetos y demostrado que el Colpath®/ColorectAlert^{MD} detecta el 54% de los casos de cáncer colorrectal en fase precoz y el 49% en cualquier fase.

• COLARIS, comercializado por Myriad Genetics, es una prueba de detección en la sangre de mutaciones en los genes MLH1 y MSH2 para la detección de los cánceres hereditarios del colon no polipósicos (síndrome HNPCC). El resultado del ensayo está disponible en 3 semanas. Myriad utiliza las técnicas de secuenciación más sensibles y más específicas que existen en la actualidad. El coste de la prueba es elevado.

• DR70®, comercializado por AMDL, es una prueba de detección de diferentes tipos de cánceres (pulmón, colon, mama, hígado, estómago, etc.). Por lo tanto, no es específico del CCR. Su principio se basa en la técnica ELISA de doble sándwich (ensayo del antígeno DR-70). La revelación se realiza por reacción enzimática (anticuerpos acoplados a la biotina y a la estreptavidina). Una reacción coloreada indica la presencia de cáncer.

Las apolipoproteínas son una familia de proteínas constituidas de aminoácidos polares que permiten el transporte de lípidos en la sangre por formación de un complejo macromolecular hidrófilo denominado lipoproteína. Para cada una de las apolipoproteínas plasmáticas humanas existen unas isoformas procedentes de polimorfismo genético y/o de modificaciones post-traduccionales cuya presencia en la sangre puede estar asociada a ciertas patologías[3]. La concentración plasmática de las apolipoproteínas no es insignificante, del orden del mg/ml[4].

La apolipoproteína AI (N° NCBI 490098, también denominada Apo A-I, Apo AI y Apo A1) es una proteína de 243 aminoácidos y de 28 kDa. Está esencialmente sintetizada por el hígado y el intestino. Esta proteína se ha demostrado sub-abundante en los sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal con respecto a los sujetos sanos, por SELDI-TOF[5]. Sin embargo, se precisa en este artículo que la discriminación de los pacientes que padecen CCR con respecto a los sujetos sanos se realiza combinando la Apo AI con otros marcadores proteicos. Por otro lado, este artículo precisa que la valoración por inmunoensayo turbidimétrico de Apo AI, realizado por otro equipo, no confirma la sub-abundancia de esta proteína en los sueros de pacientes que padecen CCR[6]. Hachem *et al.*[7], por su parte, han ensayado la Apo AI en unos sueros de pacientes que han padecido cáncer de hígado tras metástasis del cáncer colorrectal. La solicitante ha mostrado, por su parte, de manera sorprendente que una valoración por inmunoensayo permite poner en evidencia la disminución de la concentración de esta proteína en los pacientes que padecen cáncer colorrectal, al contrario de lo que avanzaba Engwegen *et al.*[5] que han podido demostrar esta disminución únicamente utilizando la técnica SELDI-TOF. La valoración por inmunoensayo de Apo AI en las muestras biológicas es un buen procedimiento de diagnóstico del cáncer colorrectal, siendo dichas muestras distantes del tumor, en la medida en la que la valoración por inmunoensayo utilizado no es la turbidimetría, como se utiliza por el equipo de Zhang *et al.*[6].

Así, la presente invención tiene como primer objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal por determinación inmunológica de la presencia de apolipoproteína AI en unas muestras biológicas procedentes de pacientes sospechosos de padecer cáncer colorrectal, siendo dichas muestras unas muestras distantes de los tumores, entendiéndose que el ensayo no es turbidimétrico.

Se refiere asimismo a la utilización de este procedimiento tanto en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico, como en el diagnóstico de las recaídas en el ámbito del cáncer colorrectal.

El procedimiento de la invención permite por lo tanto diagnosticar contra todo pronóstico, y de manera específica y precoz, el cáncer colorrectal mediante una prueba sencilla que consiste en buscar la presencia de apolipoproteína AI por ensayo inmunológico, en una muestra biológica extraída de un paciente, siendo dicha muestra distante del tumor potencial.

La disminución de la concentración de apolipoproteína AI en una muestra biológica distante del tumor con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos permite entonces deducir la patología buscada. Una de las ventajas del procedimiento de la invención reside por lo tanto en la posibilidad de utilizar una muestra distante del tumor potencial a título de muestra de diagnóstico, lo que permite un diagnóstico simple y no invasivo, mientras que un diagnóstico tisular necesita una biopsia extraída de manera invasiva. En efecto, el estudio de los marcadores tisulares, por ejemplo en un corte de tejido (inmunohistoquímica), puede ser de interés pronóstico pero no tiene ningún interés para la detección o el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Por ensayo inmunológico del marcador tumoral, se entiende un ensayo conocido por el experto en la materia, también denominado inmunoensayo, que implica unas reacciones inmunológicas entre el marcador tumoral, que es

el antígeno, y una o más parejas de unión específicas, que son los anticuerpos dirigidos contra este antígeno, entendiéndose que este ensayo no es turbidimétrico.

Por liberación por los tumores de colon, se entiende la secreción activa o pasiva o la liberación, sea cual sea el mecanismo, del marcador tumoral por las células tumorales en sí mismas o por las células no tumorales próximas tras lesiones o modificaciones de fenotipo celular resultante del desarrollo tumoral.

Por muestra biológica distante del tumor en la que se utiliza el procedimiento de la invención, se entiende cualquier muestra biológica no situada directamente a nivel del tumor en sí o de sus metástasis y susceptible de contener los marcadores tumorales de interés. A título de ejemplo de muestra biológica distante del tumor, se pueden citar los fluidos biológicos tales como la sangre entera o sus derivados, por ejemplo suero o plasma, las orinas, la saliva y las efusiones, la médula ósea y las heces, y las células purificadas a partir de estas muestras líquidas. Se prefiere la sangre o sus derivados, así como las heces, las efusiones y las células purificadas a partir de estas muestras líquidas.

El procedimiento de la invención se puede mejorar detectando, además de la apolipoproteína AI, al menos otro marcador tumoral, llegado el caso también liberado por los tumores de colon fuera de los tejidos cancerosos. Así, la combinación de al menos cuatro marcadores permite mejorar la especificidad y la sensibilidad de la prueba de diagnóstico del cáncer colorrectal.

Así, otro objeto de la invención consiste también en determinar la presencia de al menos otro marcador tumoral seleccionado entre los dos grupos de marcadores siguientes, considerados solos o en asociación:

- Grupo A: Inhibidor de la elastasa de leucocitos, Ezrina, Aminoacilasa 1, Proteína de unión a ácidos grasos del intestino, Apolipoproteína AII y Plastina-I, siendo algunos de estos marcadores nuevos marcadores identificados por la solicitante,

- Grupo B: marcadores que tienen un interés diagnóstico adicional, a saber: Beta 2 Microglobulina, Proteasoma 20S, Galectina-3, L-Lactato Deshidrogenasa Cadena B, Calreticulina, Proteína 3 alfa derivada de islote regenerador, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a los tumores, queratina de tipo II Citoesqueleto 8, queratina de tipo I Citoesqueleto 18, keratina de tipo I Citoesqueleto 19, Cadherina epitelial, ACE, Villina, CA 19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, testosterona, TIMP-1, Cripto-1, Intelectina-1, Proteína Disulfuro Isomerasa, Citoqueratina 20, Proteína tumoral controlada translacionalmente, (Pro)defensina-A5, la detección de fragmentos de ADN en la sangre que tiene alteraciones específicas de su perfil de metilación, como por ejemplo el ADN metilado del gen AXL4 (Metilación del gen homeocaja-4 de tipo Aristaless) o el ADN metilado del gen Septin-9, la detección de alteraciones específicas de fragmentos de ADN en las heces como las mutaciones específicas del ADN en las heces o unas alteraciones específicas del perfil de metilación del ADN en las heces, la deteccción de hemoglobina humana en las heces.

El procedimiento de la invención puede ser por lo tanto mejorado detectando al menos dos marcadores, siendo uno la apolipoproteína AI, siendo el otro un marcador tumoral seleccionado del grupo A, a saber: Inhibidor de la elastasa de leucocitos, Ezrina, Aminoacilasa 1, Proteína de unión a ácidos grasos de intestino, Apolipoproteína AII y Plastina-I.

Por marcador tumoral nuevamente descrito, se entiende la proteína, el ARN mensajero o unas modificaciones específicas del gen correspondiente, como unas mutaciones o unas metilaciones.

El marcador tumoral del Inhibidor de la elastasa de leucocitos (nº Swiss Prot P30740, también denominado LEI, Serpin B1, inhibidor de la elastasa monocito/neutrófilo, M/NEI o EI) se secuenció en 1992[8]. El LEI inhibe específicamente las proteasas que tienen unas propiedades de tipo elastasa o quimotripsina por formación de complejo no disosiable bajo la acción de SDS[9]. Es así que el LEI inhibe tres de las proteasas principales producidas por los neutrófilos: la leucocito elasta, la proteinasa-3 y la catepsina G. Estas proteasas permiten al sistema inmunitario defender el organismo por proteólisis de sustratos extracelulares o fagocitados. Pero, cuando estas proteasas se encuentran en exceso, estas son responsables de reacciones inflamatorias. El LEI podría por lo tanto tener un papel de regulación y de limitación de la acción inflamatoria inducida por las proteasas celulares. La solicitante ha demostrado, por su parte, de manera sorprendente, que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece un cáncer colorrectal, siendo dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador ezrina (n° Swiss Prot P15311, también denominado p81, Citovilina o Vilin-2) es una proteína que asegura la unión entre la membrana celular y los filamentos de actina del citoesqueleto de la célula, en particular en las microvellosidades de las células epiteliales intestinales[10]. W.G. Jiang y S. Hiscox[11] han mostrado que las interleucinas IL-2, IL-8, IL-10, etc., podían inhibir la expresión de ezrina en la línea celular de cáncer colorrectal humano, HT29. Los mismos autores[12] han mostrado que la inhibición de la expresión de ezrina en las líneas celulares de cáncer colorrectal, HT115 y HRT18, reducía la adhesión entre células y aumentaba la movilidad y el comportamiento invasivo de las células. Han concluido que la ezrina regulaba las adhesiones célula/célula y célula/matriz, interactuando con las moléculas de adhesión celular, E-cadherina y beta-catenina. Han sugerido que

la ezrina podría desempeñar un papel importante en el control del potencial invasivo de las células cancerosas. Por otro lado, T. Xiao et al.[13] han utilizado un ensayo ELISA para cuantificar la ezrina plasmática de pacientes que padecen cáncer de pulmón. Sin embargo, no han observado diferencias con respecto a sujetos de control. La solicitante ha mostrado de manera sorprendente que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador aminoacilasa 1 (n° Swiss Prot Q03154, también denominado EC 3.5.1.14, N-Acil-L-Aminoácido Amidohidrolasa o ACY-1) pertenece a la familia de las aminoacilasas. Son unas enzimas que catalizan la hidrólisis de los aminoácidos acilados para dar unos ácidos grasos y unos aminoácidos[14]. Un ensayo inmunoquímico de la actividad enzimática aminoacilasa se ha desarrollado a partir de 1975 por K. Lorentz *et al.*[15] y se ha utilizado para determinar diferentes tejidos y sueros[16]. El estudio ha mostrado un aumento de la actividad aminoacilasa en caso de patologías hepáticas, pero no en el caso de cáncer de colon. Por otro lado, el gen de la aminoacilasa 1 se ha identificado en el cromosoma 3p21.1[17]. La región 3p21.1 está reducida a la homocigosis durante un cáncer de pulmón de pequeña célula, y en este caso, la expresión de la aminoacilasa se reprime o es indetectable[18]. Asimismo S. Balabanov *et al.*[19] han mostrado que la expresión de la aminoacilasa estaba reprimida en caso de cáncer de riñón. La solicitante ha mostrado de manera sorprendente que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador de la proteína de unión a ácidos grasos de hígado (nº Swiss Prot P07148, también denominado L-FABP, FABP1, FABPL, proteína Z o proteína transportadora de esterol) pertenece a la familia de las FABP que comprende nueve isoformas. Cada isoforma se denomina según el tejido en el que se ha detectado la primera vez. Estas isoformas poseen una comunidad de función, unas estructuras tridimensionales parecidas pero su homología de secuencia no es elevada. La L-FABP se secuenció en 1985[20]. Es una pequeña proteína de 15 kDa, abundante en el citosol, que posee la capacidad de fijarse a los ácidos grasos libres así como a la bilirrubina. Algunos estudios recientes parecen indicar que las alteraciones de la expresión de la proteína L-FABP podría inducir un proceso de tumorigénesis. Para el cáncer de la próstata, el nivel de expresión de los ARNm de L-FABP en las biopsias del tejido tumoral era 10 veces más elevado que en el tejido normal[21]. Para el cáncer de colon, varios equipos han identificado una disminución de la expresión de la proteína L-FABP a nivel del tejido tumoral comparada con la mucosa colónica normal, utilizando unas técnicas de electroforesis en 2 dimensiones[22]. Este resultado se confirmó también mediante unas técnicas de inmunohistoquímica. Además, la proteína L-FABP es un marcador de pronóstico de resección hepática en los pacientes que padecen cáncer colorrectal con metástasis en el hígado[23]. Por su parte, la solicitante ha mostrado de manera sorprendente que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, siendo dichas muestras distantes del tumor.

El marcador Proteína de unión a ácidos grasos de intestino (N° Swiss Prot P12104, también denominado I-FABP, FABP-2 o FABPI) se secuenció en 1987[24]. Es una pequeña proteína de 15 kDa, abundante en el citosol, que posee la capacidad de fijarse a los ácidos grasos libres así como a la bilirrubina. La proteína I-FABP está expresada a nivel de los enterocitos del intestino delgado y puede constituir aproximadamente el 2% del contenido proteico de este tipo celular. A nivel tisular, el duodeno y el yeyuno contienen unas cantidades significativamente más elevadas de I-FABP que el colon (yeyuno: 4,8 μg/g, colon: 0,25 μg/g)[25]. La I-FABP no se ha podido detectar en las muestras de plasma de sujetos sanos. Por el contrario, en algunos contextos patológicos como la isquemia intestinal, la enfermedad de Crohn o la cirrosis biliar primitiva, es posible poner en evidencia un aumento de la concentración de I-FABP plasmático en algunos sujetos[25]. Para el cáncer de próstata, se ha demostrado que el nivel de expresión de los ARNm de I-FABP en las biopsias del tejido tumoral era 7 veces más elevado que en el tejido normal[21]. En el modelo de inducción de tumor colorrectal por el azoximetano en la rata, el nivel de expresión de los ARNm de I-FABP disminuye de 2,92 a 3,97 veces cuando los animales tienen una alimentación que reduce la incidencia de cáncer (proteínas de soja o hidrolizado de lactosuero)[26]. La solicitante ha mostrado de manera sorprendente que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, siendo dichas muestras distantes del tumor.

El marcador apolipoproteína AII, (n° Swiss Prot P02652, también denominado ApoA II, Apo-AII, y Apo A2) es una proteína de 17380 Da compuesta de dos cadenas polipeptídicas de 77 aminoácidos cada una unidas mediante un puente disulfuro. Como la apolipoproteína AI, la apolipoproteína AII está esencialmente sintetizada por el hígado y el intestino. Hachem *et al.*[7] han determinado también además de Apo AI, Apo II en unos sueros de pacientes que han padecido cáncer de hígado tras metástasis del cáncer colorrectal. Sin embargo, los resultados no son significativos y no permiten una conclusión en cuanto a la patología buscada. La solicitante ha mostrado, por su parte, de manera sorprendente, que la disminución de la concentración de esta proteína en los pacientes que padecen cáncer colorrectal hace de ella un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, siendo dichas muestras distantes del tumor.

El marcador Plastina-I (n° Swiss Prot Q14651, también denominado I-plastin, Intestine-specific plastin o Plastin 1) pertenece a la familia de las plastinas humanas de las cuales tres representantes son conocidas: la I-plastina, la L-plastina y la T-plastina. Algunos autores denominan a las plastinas "fimbrinas", otros autores reservan el nombre de fimbrina a la plastina-I. Las plastinas son unas proteínas que se unen a la actina para formar el citoesqueleto (esqueleto celular). Son unas proteínas de 70 kDa relativamente bien conservadas a lo largo de la evolución de las

eucariotas. Presentan una fuerte especificidad tisular, sólo una isoforma al mismo tiempo está presente en los tejidos normales[27]. La utilización de las plastinas frente al cáncer ya se ha descrito en la patente US-A-5,360,715, que propone un método para determinar si una célula es hematopoyética o neoplásica, es decir cancerosa. Este método reivindica el ensayo de la L-plastina y de la T-plastina a nivel celular, y más particularmente el ensayo de sus ARNm. Sin embargo, a pesar de estas propiedades, ningún trabajo anterior se ha realizado para evaluar el interés de las plastinas en el ámbito del diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de una extracción de suero o de heces. Además, la plastina-I no se ha considerado nunca como un marcador potencial del cáncer[28]. La solicitante ha mostrado, por su parte, de manera sorprendente, que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

La concentración del marcador tumoral seleccionado del Grupo A será, según el marcador considerado, aumentada o disminuida en la muestra biológica en la que se realiza el procedimiento de la invención con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos.

El procedimiento de la invención puede también ser mejorado asociando la detección de la apolipoprotéina AI y de otro marcador tumoral seleccionado del Grupo B, a saber: los marcadores Beta 2 Microglobulina, Proteasoma 20S, Galectina-3, L-Lactato Deshidrogenasa cadena B, Calreticulina, Proteína 3 alfa derivada de islote regenerador, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a los tumores, Queratina tipo II Citoesqueleto 8, Queratina tipo I Citoesqueleto 18, Queratina tipo I Citoesqueleto 19, Cadherina epitelial, ACE, Villina, CA 19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, Testosterona, TIMP-1, Cripto-1, Intelectina-1, Proteína disulfuro isomerasa, Citoqueratina 20, Proteína tumoral controlada translacionalmente, (Pro)defensina-A5, teniendo la detección de fragmentos de ADN en la sangre unas alteraciones específicas de su perfil de metilación, como por ejemplo el ADN metilado del gen AXL4 (Metilación del gen homeocaja-4 de tipo Aristaless) o el ADN metilado del gen septina-9, la detección de alteraciones específicas de fragmentos de ADN en las heces como unas mutaciones específicas del ADN en las heces o unas alteraciones específicas del perfil de metilación del ADN en las heces, la detección de hemoglobina humana en las heces. Por supuesto, el procedimiento de la invención podrá también utilizar la detección, en el mismo ensayo, de la apolipoproteína AI, de al menos un marcador tumoral seleccionado del Grupo B y de al menos otro marcador tumoral seleccionado del Grupo A.

El marcador beta 2 microglobulina (nº Swiss Prot P61769, también denominado β2 Microglobulina, β2M) es una proteína de baja masa molecular (11 a 12 kDa) encontrada en la superficie de la mayoría de las células humanas nucleadas. El porcentaje de β2 microglobulina sérica aumenta en algunos pacientes que padecen cáncer, sin que este aumento sea específico, ni correlacionado con la naturaleza del tumor, su fase o la gravedad de la enfermedad. Un aumento significativo se observa también durante otras enfermedades tales como el lupus eritematosos, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren, las enfermedades malignas del sistema linfoide (mieloma múltiple, linfoma de células B), algunas enfermedades virales (hepatitis o SIDA) en los pacientes hemofílicos. La microglobulina β2 es filtrada por los glomérulos renales y reabsorbida por los tubos contorneados proximales, su concentración sanguínea puede ser modificada en caso de patologías renales. Es así que el ensayo de la microglobulina β2 está generalmente reservado para el diagnóstico de patologías renales, o para seguimiento de infección por el virus de la inmunodeficiencia adquirida. Sin embargo, este marcador es conocido como un marcador tumoral, en particular del cáncer de colon.

El marcador proteasoma 20S (también denominado prosoma) es la estructura central del proteasoma que es él mismo un complejo molecular responsable de la degradación intracelular de las proteínas ubiquitiniladas[29]. El proteasoma es un complejo molecular de 700 kDa constituido de 28 subunidades asociadas en 4 anillos de 7 subunidades. En el ser humano, se conocen 7 unidades alfa (α1, α2, α3, α4, α5, α6 y α7) y 10 unidades beta (β1, β2, β3, β4, β5, β6, β7, β1i, β2i y β5i). Gracias a sus propiedades catalíticas, el proteasoma desempeña un papel central en los mecanismos de proliferación, de crecimiento, de regulación y de apoptosis celular y por lo tanto en las vías de cancerización. La inhibición del proteasoma por el Bortezombib (Velcade) es un tratamiento reconocido de los mielomas múltiples. Unos ensayos terapéuticos de fase II o III están en curso para unos cánceres hematológicos o tumores. Lavabre-Bertrand *et al*[30] han mostrado que el porcentaje sérico de proteasoma podía aumentar durante ciertas patologías, en particular en caso de cánceres (mieloma, linfoma y tumores sólidos).

El marcador galectina-3 (n° Swiss Prot P17931, también denominado Gal-3, lectina 3 específica de la galactosa, antígeno MAC-2, proteína de unión a IgE, lectina 35 kDa, proteína 35 de unión a carbohidratos, CBP 35, proteína de unión a laminina, Lectina L-29, L-31, proteína de unión a galactósido o GALBP), es una lectina capaz de unirse a estructuras beta-galactosídicas de tipo N-acetilactosamina. Es una proteína con funciones múltiples implicada en diversas funciones biológicas, que incluyen la adhesión de las células tumorales, la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis, la apoptosis, la progresión cancerosa metastásica[31]. Diferentes trabajos han mostrado que Gal-3 podía complejarse con numerosas moléculas: ACE, IgE, laminina, mucina, Mac-2BP, LAMP1, LAMP2, fibronectina, etc. Se ha descrito un ensayo sérico de Gal-3 por I. Iurisci *et al*[32]. Gal-3 estaba capturada en microplacas recubiertas con proteína de unión a Mac-2 (una proteína de unión a Gal-3) y después revelada con un anticuerpo de rata anti-Gal-3. Este estudio ha mostrado una elevación sérica de Gal-3 en caso de cánceres gastrointestinales, de mama, de pulmón, de ovario, de melanomas y de linfomas no Hodgkinianos.

El marcador L-lactato deshidrogenasa cadena B (nº Swiss Prot P07195, también denominado LDH-B, LDH Heart

Unit o LDH-H) es una proteína que puede complejarse en forma de homotetrámeros. Esta proteína puede también complejarse con la proteína L-Lactato deshidrogenasa cadena A (nº Swiss Prot P00338, también denominado LDH-A, LDH Muscle Unit o LDH-M) en forma de heterotetrámeros. La dosis sérica y/o la actividad enzimática sérica de los complejos tetraméricos, bautizados LDH, aumenta en la circulación sanguínea proporcionalmente a la masa tumoral para numerosos tumores sólidos. Su utilización está recomendada en asociación con la gonadotrofina coriónica humana (beta-hCG) y la fosfatasa alcalina placentaria para el seguimiento de los cánceres seminales. La LDH está considerada como un marcador de interés para el pronóstico de los linfomas, de la leucemia y del cáncer de colon[33].

El marcador calreticulina (nº Swiss Prot P27797, también denominado CRP55, Calregulin, HACBP, ERp60 o grp60) es una proteína multifuncional. Es una lectina capaz de interactuar transitoriamente con la casi totalidad de las proteínas monoglicosiladas del retículo endoplásmico. Es así que D. J. McCool *et al.*[34] han mostrado que la calreticulina estaba implicada en la maduración de la mucina del colon MUC2. Un método de diagnóstico de CCR que utiliza un ensayo de la calreticulina en un tejido, las heces o un fluido corporal se describe en la solicitud de patente WO03/065003.

El marcador Proteína alfa 3 derivada del islote regenerador (N° Swiss Prot Q06141, también denominado Reg III-alpha, proteína 1 asociada a la pancreatitis o Proteína I Asociada a Pancreatitis (PAP 1)) es una proteína poco expresada en el páncreas sano. Está sobreexpresada durante las fases agudas de pancreatitis y en algunos pacientes que sufren pancreatitis crónica. Aparece entonces en el líquido pancreático y en la circulación sanguínea[35]. Y. Motoo *et al.*[36] han mostrado por ensayo ELISA que el porcentaje de PAP 1 sanguíneo aumentaba en algunos pacientes que padecen cáncer de colon, de estómago, de hígado o de páncreas, así como en caso de insuficiencia renal. Para ello, han utilizado el ensayo ELISA (PANCEPAP) comercializado por la compañía Dynabio (La Gaude, Francia).

El marcador Transductor 1 de la señal de calcio asociado a los tumores (nº Swiss Prot P16422, también denominado proteína principal GA733-2 asociada a tumor intestinal, antígeno de la superficie celular epitelial, EpCAM, glicoproteína epitelial, EGP, antígeno asociado a adenocarcinoma, KSA, antígeno KS 1/4, glicoproteína Trop-1 de la superficie celular o antígeno CD326) se caracterizó en 1979 por su capacidad para ser reconocido por un anticuerpo dirigido contra unas células de cáncer colorrectal[37]. Esta proteína es conocida bajo diferentes nombres, como se ha indicado anteriormente, pero el uso más frecuente es EpCAM. Es una proteína transmembranaria expresada en la superficie basolateral de las células, en ciertos epitelios y numerosos cánceres[38]. A partir de 1982, Herlyn *et al.*[39] han mostrado que la inyección de un anticuerpo monoclonal anti-EpCAM podía inhibir el crecimiento tumoral de pacientes que padecen cáncer colorrectal. Estos resultados han conducido al desarrollo de un tratamiento anti-tumoral a base de un anticuerpo anti-EpCAM denominado Edrecolomab. Este tratamiento se comercializa bajo el nombre de Panorex™. Por otro lado, H Abe *et al.*[40] han mostrado mediante ensayo ELISA que una forma soluble de EpCAM, bautizada MK-1, se aumentada en la circulación sanguínea en el 10% en los pacientes cancerosos estudiados.

Las citoqueratinas pertenecen a proteínas que componen los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células epiteliales. Actualmente, se han identificado más de 20 citoqueratinas humanas. Las citoqueratinas 8 (nº Swiss Prot P05787, también denominada citoqueratin-8, CK-8, queratin-8 o K8), 18 (nº Swiss Prot P05783, también denominada citoqueratin-18, CK-18, queratin-18 o K18), y 19 (nº Swiss Prot P08727, también denominada citoqueratin-19, CK-19, queratin-19 o K19) son las más abundantes en las células epiteliales y son unas herramientas para el diagnóstico de patologías cancerosas[41]. Este interés clínico está relacionado con la liberación de citoqueratinas por las células epiteliales en fase de apoptosis o de proliferación. En caso de apoptosis, esta liberación se realiza en forma de fragmentos solubles que parecen aparecer bajo la acción proteolítica de caspasas. Unas formas de citoqueratinas no degradadas no se han descrito nunca en la circulación sanguínea. Los tres ensayos de citoqueratinas más utilizados en clínica son el ensayo del antígeno polipeptídico tisular (TPA), del antígeno polipeptídico tisular específico (TPS), y el CYFRA 21-1. TPA es un ensayo de espectro ancho que mide las citoquinas 8, 18 y 19. Los ensayos de TPS y de CYFRA 21-1 son más específicos y miden respectivamente unos fragmentos de la citoqueratina 18 y de la citoqueratina 19. Estos 3 ensayos detectan unos fragmentos solubles de citoquieratinas que pueden estar presentes aisladamente o en forma de complejos proteicos. TPA, TPS o CYFRA-21-1 se utilizaron para el seguimiento terapéutico de los cánceres colorrectales, de mama, de pulmón, de vejiga, de ovario, de páncreas, de próstata y de ciertos cánceres ORL. La prueba sanguínea de los fragmentos solubles de citoqueratinas tiene en efecto un valor clínico para detectar las recidivas o evaluar la respuesta a la terapia iniciada (radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal). Un ensayo regular permite evaluar en particular la progresión de la masa tumoral. La cantidad de citoqueratinas sanguíneas solubles tiene asimismo un aspecto de pronóstico frente a la fase tumoral y a la formación de metástasis. Actualmente, la prueba sanguíne de citoqueratina más utilizado es el CYFRA 21-1. Está altamente recomendado para el seguimiento de pacientes que padecen cáncer de pulmón de células no pequeñas. Existen varios ensayos comerciales para TPA (AB Sangtec Medical Co., Byk-Roland, etc.), TPS (IDL Biotech AB, BEKI Diagnostics, etc.) y CYFRA-21-1 (Roche Diagnostics, CIS Bio-International, Fujirebio Diagnostics, etc.). Por otro lado, H. Kim *et al.*[42] han mostrado que el ensayo fecal de citoqueratina 19 (DiNonA Inc.) podía ser útil para la detección de enfermedades digestivas en asociación con una prueba de sangre oculta en las heces. Finalmente, la utilización de la citoqueratina 20 (nº Swiss Prot P35900, también denominado Queratina tipo I, citoesqueleto 20, CK-20, Queratina-20, K20, o Proteína IT) como marcador en el cáncer colorrectal está descrita en la solicitud de patente US2002/0160382.

El marcador cadherina epitelial (nº Swiss Prot P12830, también denominado E-cadherina, Uvomorulina, Cadherina-1, CAM 120/80 o antígeno CD324) es una proteína transmembranaria mediadora de la adhesión celular calcio-dependiente. Está expresada específicamente en las células epiteliales, en las que está implicada en el mantenimiento de su fenotipo. El dominio citoplásmico de E-cadherina se une a la β-catenina, que está ella en sí misma unida a las redes de filamentos de actina del citoesqueleto. Esta unión E-cadherina/β-catenina desempeña un papel crítico para estabilizar las adhesiones células/células del tejido epitelial. La pérdida de E-cadherina puede por lo tanto reducir la adhesión celular y aumentar el poder invasivo de las células cancerosas. Una reducción de expresión de E-cadherina o de β-catenina está generalmente asociada con una desdiferenciación y una agresividad más importante del tumor, en particular para los cánceres digestivos. Es así que F. Roca *et al.*[43] han mostrado que los pacientes que padecen un cáncer colorrectal y que sub-expresan la E-cadherina tenían un pronóstico más peyorativo que los pacientes que tienen un nivel de expresión normal. A partir de 1983, Damsky *et al.*[44] han mostrado que una forma soluble de E-cadherina podía ser liberada por la línea celular del cáncer de mama MCF-7. Esta forma soluble corresponde a la escisión de la parte extracelular de E-cadherina. Más tarde, M. Katayama *et al.*[45] han mostrado que la forma soluble de E-cadherina podía ser liberada en la circulación sanguínea en caso de cáncer, y C. Willmanns *et al.*[46] han mostrado que el aumento de la dosis de E-cadherina sanguínea estaba correlacionado con la fase tumoral para los cánceres colorrectales. Por otro lado, la compañía Takara BioChemicals (Tokio, Japón) propone un kit comercial.

El ensayo de ACE (antígeno carcino-embrionario) para el diagnóstico del cáncer colorrectal se ha propuesto desde 1965 por P. Gold y S. Freedman[47], pero la detección sanguínea de este marcador tiene una sensibilidad mediocre para el diagnóstico de cánceres colorrectales en una fase poco avanzada. Es por eso que el ensayo del ACE sérico está especialmente recomendado para evaluar el riesgo de metástasis hepáticas[48] y para el seguimiento terapéutico. Además, es un marcador poco específico del cáncer colorrectal; en efecto, puede ser aumentado en muchos otros cánceres (pulmón, mama, etc.). Sin embargo, el ensayo de ACE en las heces parece más sensible y más específico que el ensayo de ACE sérico o que el ensayo de sangre en las heces[49]. No obstante, no se propone todavía este ensayo de forma rutinaria.

Los determinantes antigénicos 1116-NS-19-9 reactivos, más comúnmente denominados CA19-9 (Carbohydrate Antigen 19.9), son llevados por unas proteínas de peso molecular elevado[50]. La prueba sanguínea de CA 19-9 es más específica que la de ACE. El porcentaje de CA 19-9 sanguíneo aumenta en caso de cáncer colorrectal, de páncreas y de hígado (colangiocarcinoma), pero también en caso de patologías no cancerosas (colangitis, etc.). Su uso en asociación con ACE está recomendado tanto en el momento del diagnóstico de un cáncer como para el seguimiento de la patología.

J. Holmgren *et al.*[51] han mostrado que la dosis sérica de antígeno CA 50 aumentaba en caso de cáncer collorrectal. El antígeno CA 50 está definido por su facultad para ser reconocido por un anticuerpo monoclonal específico.

Tratándose del marcador CA 72, T. L. Klug *et al.*[52] han mostrado que la dosis sérica de antígeno CA 72 aumentaba en caso de cáncer colorrectal. El antígeno CA 72 está definido por su facultad para ser reconocido por un anticuerpo monoclonal específico.

Asimismo, P. Kuusela *et al.*[53] han mostrado que la dosis sérica de antígeno CA 242 aumentaba en caso de cáncer colorrectal. El antígeno CA 242 está definido por su facultad para ser reconocido por un anticuerpo monoclonal específico.

La valoración de la testosterona para el diagnóstico del cáncer colorrectal se ha propuesto en el hombre por M. Holland *et al.*[54]. Estos autores han mostrado una caída del porcentaje de testosterona en caso de cáncer colorrectal.

Tratándose del marcador TIMP-1 o Inhibidor Tisular de la Matriz Metaloproteinasa de tipo 1, la solicitud de patente US 2007/0020707 describe en particular el ensayo de TIMP-1 para el diagnóstico del cáncer colorrectal con la ayuda de una prueba en un fluido corporal.

F. Model *et al.*[55] han mostrado en julio de 2006, durante el congreso "World Congress on Gastrointestinal Cancer", que era posible detectar unas formas metiladas del gen de la septina-9 en el plasma de pacientes que padecen cáncer colorrectal.

M.P. Ebert *et al.*[56] han mostrado que el gen ALX4, o homeocaja-4 de tipo Aristaless, era más a menudo metilado en los sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal que en los sueros control ($P < 0{,}0001$). Utilizando un valor límite de 41,4 pg/ml, han obtenido una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 70%.

La villina se describe como marcador sanguíneo para el diagnóstico del cáncer colorrectal en la solicitud de patente FR2581456.

C. Bianco *et al.*[57] han mostrado que la dosis sérica de Cripto-1 aumentaba en caso de cáncer colorrectal.

La valoración de la intelectina-1 (nº Swiss Prot Q8WWA0, también denominada Receptor de lactoferrina intestinal, lectina de unión a Galactofuranosa, lectina endotelial HL-1 u Omentina) para el diagnóstico del cáncer se ha descrito en la solicitud de patente US2003/0082533.

La utilización de la proteína disulfuro isomerasa (nº Swiss Prot P07237, también denominada EC 5.3.4.1, PDI, subunidad beta de Prolil 4-hidroxilasa, Proteína de unión a hormona tiroidea celular o p55), de la proteína tumoral controlada translacionalmente (nº Swiss Prot P13693, también denominado TCTP, p23, Factor liberador de histamina, HRF o Fortilina) y de la (Pro)defensina-A5 (Nº Swiss Prot Q01523) como marcadores en el cáncer colorrectal, se describe respectivamente en las solicitudes de patente EP1724586, US2003/0172388 y US2006/0179496. Por (pro)defensina, se entiende el precursor, a saber la prodefensina antes de la escisión, el propéptido, a saber la mitad N-terminal después de la escisión de la prodefensina, y la proteína madura, a saber la Defensina, que corresponde a la mitad C-terminal después de la escisión.

Finalmente, se conoce el ensayo de la hemoglobina humana en las heces y puede ser realizado como se ha descrito anteriormente.

La concentración del marcador tumoral seleccionado del Grupo B estará, según el marcador considerado, aumentada o disminuida en la muestra biológica en la que se realiza el procedimiento de la invención, con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos.

Preferentemente, el o los marcadores tumorales del Grupo B se seleccionan de entre: los marcadores Microglobulina Beta 2, proteasoma 20S, Galetina-3, cadena B de L-Lactado Deshidrogenasa, Calreticulina, Proteína 3 alfa derivada de islote regenerador, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a los tumores, Cadherina epitelial, ACE, CA 19-9, Testosterona, TIMP-1, Intelectina-1, Proteína Disulfuro Isomerasa, Citoqueratina 20, Proteína tumoral controlada translacionalmente, (Pro)defensina-A5, la detección de hemoglobina humana en las heces.

Por supuesto, el procedimiento de la invención puede también incluir la detección de cualquier otro marcador del cáncer colorrectal conocido por el experto en la materia.

Por la determinación de la presencia de un marcador tumoral diferente de apolipoproteína AI, se entiende la determinación de la presencia de la proteína, de su ARN mensajero, o de la detección de una modificación sobre su gen en las secuencias codificantes o no codificantes, como unas metilaciones.

La determinación de la presencia, en la muestra biológica, del marcador tumoral de interés "proteína" se puede realizar mediante cualquier procedimiento de determinación de la presencia de una proteína en una muestra, conocido por el experto en la materia, como por ejemplo mediante una prueba bioquímica, incluyendo un ensayo inmunológico o por espectrometría de masas.

La prueba bioquímica puede ser cualquier prueba ampliamente conocida por el experto en la materia que implique unas interacciones moleculares, a saber unas reacciones entre dicho marcador tumoral y una o varias parejas de unión específicas o no de dicho marcador tumoral.

Preferentemente, la prueba bioquímica es un ensayo inmunológico conocida por el experto en la materia que implica unas reacciones inmunológicas entre el marcador tumoral, que es el antígeno, y una o varias parejas de unión específicas, que son los anticuerpos dirigidos contra este antígeno.

Las parejas de unión específicas o no del o de los marcadores tumorales buscadas en el procedimiento de la invención son cualquier pareja susceptible de unirse a este o estos marcadores. Se denominan específicas cuando son capaces de unirse a estos marcadores con una especificidad elevada, incluso una especificidad del 100%. Se denominan no específicas cuando su especificidad de unión a estos marcadores es baja y que son entonces capaces de unirse a otros ligandos, tales como unas proteínas. A título de ejemplo, se pueden citar los anticuerpos, las fracciones de anticuerpos, los receptores y cualquier otra molécula capaz de unirse a este marcador.

Los anticuerpos parejas de unión son, por ejemplo, o bien unos anticuerpos policlonales, o bien unos anticuerpos monoclonales.

Los anticuerpos policlonales se pueden obtener por inmunización de un animal con el marcador tumoral en cuestión, seguida de la recuperación de los anticuerpos buscados en forma purificada, por extracción del suero de dicho animal, y separación de dichos anticuerpos de los otros constituyentes del suero, en particular por cromatografía de afinidad sobre una columna en la que se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular dicho marcador.

Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener mediante la técnica de los hibridomas, cuyo principio general se recuerda a continuación.

En una primera fase, se inmuniza un animal, generalmente un ratón, con el marcador tumoral de interés, cuyos linfocitos B son entonces capaces de producir unos anticuerpos contra dicho antígeno. Estos linfocitos productores de anticuerpos son después fusionados con unas células mielomatosas "inmortales" (murinas en el ejemplo) para dar lugar a unos hibridomas. A partir de la mezcla heterogénea de las células así obtenida, se efectúa entonces una selección de las células capaces de producir un anticuerpo particular y multiplicarse indefinidamente. Cada hibridoma se multiplica en forma de clon, conduciendo cada uno a la producción de un anticuerpo monoclonal cuyas propiedades de reconocimiento frente a dicho marcador tumoral podrán ser ensayadas por ejemplo por ELISA, por inmunotransferencia (transferencia Western) en una o dos dimensiones, por inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados son después purificados, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser también unos anticuerpos recombinantes obtenidos por ingeniería genética, mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

Son conocidos ejemplos de anticuerpos Inhibidor anti-elastasa leucocitaria y están disponibles en particular en el catálogo Abcam, anticuerpo policlonal de conejo anti-LEI, Cat. nº Ab47731. Un anticuerpo monoclonal anti-LEI Clone ELA-1 se ha descrito en el artículo de Yasumatsu *et al.*[58].

Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-ezrina y están disponibles en particular en el catálogo Abcam, anticuerpo monoclonal anti-Ezrine Clone 3C12, Cat. nº Ab4069 y anticuerpo policlonal de conejo anti-Ezrina, Cat. nº Ab47418.

Se conocen unos ejemplos de anticuerpo anti-aminoacilasa 1 y están disponibles en particular en el catálogo Abnova, anticuerpo monoclonal anti-aminoacilasa 1 Clone 4F1-B7, Cat. nº H00000095-M01, y en el catálogo Abcam, anticuerpo policlonal de gallina anti-Aminociclasa 1, Cat. nº Ab26173.

Se conocen ejemplos de anticuerpo de anti-proteína de unión a ácidos grasos de hígado y están disponibles en particular en el catálogo Abcam, anticuerpo monoclonal anti-L-FABP Clon 6B6, Cat. nº Ab10059 y anticuerpo policlonal de conejo anti-L-FABP, Cat. nº Ab7807.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-proteína de unión a ácidos grasos intestinales y están disponibles en particular en el catálogo R&D Systems, anticuerpo monoclonal anti-I-FABP Clon 323701, Cat. nº MAB3078, y en el catálogo Abcam, anticuerpo policlonal de conejo anti-I-FABP, Cat. nº Ab7805.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Apolipoproteína AI y están disponibles en particular en el catálogo Biodesign Meridian Life Sciences, anticuerpo monoclonal anti-Apo AI Clon 4A90, Cat. nº H45402M y anticuerpo policlonal de cabra anti-Apo AI, Cat. nº K45252P.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Apolipoproteína AII son y están disponibles en particular en el catálogo US Biological, anticuerpo monoclonal anti-Apo AII Clon 1402, Cat. nº A2299-31C y en el catálogo Biodesign Meridian Life Sciences anticuerpo policlonal de cabra anti-Apo AII, Cat. nº K74001P.

Se conocen ejemplos de anticuerpos policlonales anti-Plastina-I y están disponibles en particular en el catálogo Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo policlonal de conejo H-300 (Cat. nº sc-28531) reacciona con las Plastinas-I, L y T. La solicitante ha desarrollado unos anticuerpos monoclonales dirigidos contra la Plastina-I.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Microglobulina Beta2, anti-ACE, anti-CA19-9 y anti-Testosterona son conocidos y se utilizan en particular en equipamientos de ensayo de la solicitante, respectivamente Vidas® Beta2 Microglobulina, Vidas® ACE, Vidas® CA19-9™ y Vidas® Testosterona.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Proteasoma 20S y están disponibles en particular en el catálogo de Affinitiy Research Products.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Galectina-3, anti-L-Lactato deshidrogenasa Cadena B, anti-Calreticulina, anti-Transductor 1 de la señal de calcio asociado a los tumores, anti-Queratina Tipo II Citoesqueleto 8, anti-Queratina tipo I Citoesqueleto 18, anti-Queratina tipo I Citoesqueleto 19, anti-Cadherina epitelial, anti-Villina y anti-TIMP-1 y están disponibles en particular en el catálogo Abcam.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-proteína alfa 3 derivada del islote regenerador y se utilizan en particular en los equipamientos de ensayo de Dynabio (La Gaude, Francia).

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-CA 242, anti-CA 50, anti-CA 72-4 y están disponibles en particular en el catálogo Fujirebio.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Intelectina-1 y están disponibles en particular en el catálogo Alexis Biochemicals, anticuerpo monoclonal anti-Intelectina-1 Clon Saly-1, Cat. nº ALX-804-850-C100 y anticuerpo policlonal de conejo anti-Intelectina-1, Cat. nº ALX-210-941.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Proteína Disulfuro Isomerasa y están disponibles en particular en el catálogo Abcam, anticuerpo monoclonal anti-PDI Clon RL77, Cat. nº Ab5484 y anticuerpo policlonal de conejo anti-PDI, Cat. nº Ab3672.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Citoqueratina 20 y están disponibles en particular en el catálogo Abcam, anticuerpo monoclonal anti-Citoqueratina 20 Clon Ks20.8, Cat. nº Ab962 y anticuerpo policlonal de conejo anti-Citoqueratina 20, Cat. nº Ab36756.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-TCTP y están disponibles en particular en el catálogo Abnova, anticuerpo monoclonal anti-TCTP Clon 3C7, Cat. nº 157H00007178-M01 y anticuerpo policlonal anti-TCTP, Cat. nº 157H00007178-A01.

Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Defensina-A5 y están disponibles en particular en el catálogo Santa Cruz Biotechnology, anticuerpo monoclonal anti-Defensina-A5 Clon 8C8, Cat. nº sc-53997, y en el catálogo Alpha Diagnostic International Inc., anticuerpo policlonal de conejo anti-Defensina-A5, Cat. nº HDEFA51-A.

Las parejas de unión específicas o no del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención se pueden utilizar como reactivo de captura, como reactivo de detección o como reactivo de captura y de detección.

Preferentemente, las parejas de unión específica o no de apolipoproteína AI se utilizan como reactivo de captura y como reactivo de detección.

La visualización de las reacciones inmunológicas, es decir de la unión marcador tumoral/pareja de unión, se puede efectuar mediante cualquier medio de detección, tales como unos medios directos o indirectos.

En el caso de la detección directa, es decir sin el intermedio de un marcado, se observan las reacciones inmunológicas, por ejemplo por resonancia plasmónica de superficie o por voltametría cíclica sobre un electrodo que lleva un polímero conductor.

La detección indirecta se realiza por medio de un marcado, bien de la pareja de unión denominada reactivo de revelación, o bien del marcador tumoral de interés en sí mismo. Se habla entonces en este último caso de método de competición.

Por marcado, se entiende la fijación de un reactivo marcador capaz de generar directa o indirectamente una señal detectable. Una lista no limitativa de estos reactivos marcadores consiste en:

* las enzimas que producen una señal detectable, por ejemplo por colorimetría, fluorescencia, luminiscencia, como la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β-galactosidasa, la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa,

* los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminiscentes, colorantes,

* las moléculas radioactivas como el ^{32}P, el ^{35}S o el ^{125}I, y

* las moléculas fluorescentes tales como las Alexa o las ficocianinas.

También se pueden utilizar unos sistemas indirectos de detección, como por ejemplo unos ligandos capaces de reaccionar con un anti-ligando. Las parejas ligando/antiligando son bien conocidas por el experto en la materia, que es el caso, por ejemplo, de las parejas siguientes: biotina/estreptavidina, hapteno/anticuerpo, antígeno/anticuerpo, péptido/anticuerpo, azúcar/lectina, polinucleótido/complementario del polinucleótido. En este caso, es el ligando el que lleva la pareja de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los reactivos marcadores descritos en el párrafo anterior o ser él mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

Estos sistemas indirectos de detección pueden conducir, en algunas condiciones, a una amplificación de la señal. Esta técnica de amplificación de la señal es bien conocida por el experto en la materia, y se podrá referir a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la solicitante o al artículo de Chevalier *et al.*[59].

Según el tipo de marcado utilizado, el experto en la materia añadirá unos reactivos que permiten la visualización del marcado.

A título de ejemplo de ensayos inmunológicos tales como los definidos anteriormente, se pueden citar los métodos "sándwich" tales como ELISA, IRMA y RIA, los métodos denominados de competición y los métodos de

inmunodetección directa como la inmunohistoquímica, la inmunocitoquímica, la transferencia Westerm y la transferencia Dot.

La espectrometría de masas puede también ser utilizada para la detección en el fluido biológico del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención. El principio de la espectrometría es ampliamente conocido por el experto en la materia y está descrito por ejemplo en Patterson, S.[60].

Para ello, la muestra biológica previamente tratada o no se pasa en un espectrómetro de masas y se compara el espectro obtenido con el del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención. Un ejemplo de tratamiento previo de la muestra consiste en hacerlo pasar sobre un soporte de inmunocaptura, que comprende una de las pajeras de unión del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención, por ejemplo un anticuerpo dirigido contra el o los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención. Otro ejemplo de tratamiento previo de la muestra puede ser el pre-fraccionamiento de la muestra biológica, a fin de separar entre sí las proteínas de la muestra. En unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, se pueden agotar, por ejemplo, en primer lugar, las proteínas predominantes de la muestra.

Gracias a avances tecnológicos recientes, se ha vuelto también posible cuantificar unas proteínas en medios biológicos complejos utilizando la espectrometría de masa en tándem (MS/MS) realizada utilizando un analizador tripe cuadrupolo que funciona en modo MRM (seguimiento por reacción múltiple). Este modo de funcionamiento presenta una doble selectividad (dos analizadores, selecciones del ión parental y del ión producido) y la sensibilidad de detección se mejora con respecto a otros modos de barrido. La viabilidad técnica de este enfoque se ha demostrado recientemente por Anderson y Hunter[61] que han conseguido detectar unas proteínas cuya concentración es del orden del centenar de ng/ml en el plasma, después de la inmunodepleción de las proteínas más abundantes.

La determinación de la presencia, en la muestra biológica, del marcador tumoral de interés "ARNm" se puede realizar mediante cualquier procedimiento de determinación de la presencia de ARNm en una muestra, a saber o bien la detección directa del ARNm, o bien la detección indirecta del ARNm, o cualquier otro procedimiento de determinación de la presencia de un ARN en una muestra, conocido por el experto en la materia.

Por detección directa del ARNm, se entiende la puesta en evidencia del ARNm en sí mismo en la muestra biológica.

La detección directa del ARNm en la muestra biológica se puede realizar mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia, como por ejemplo por hibridación con una pareja de unión específica del ARNm, llegado el caso después de la amplificación mediante la técnica PCR o NASBA.

Por hibridación, se entiende el proceso durante el cual, en condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos, se unen con unas uniones hidrógeno estables y específicas para formar un complejo bicatenario. Estas uniones hidrógeno se forman entre las bases complementarias Adenina (A) y Timina (T) (o Uracilo (U)) (se habla de unión A-T) o entre las bases complementarias Guanina (G) y Citosina (C) (se habla de unión G-C). La hibridación de dos fragmentos nucleotídicos puede ser total (se habla entonces de fragmentos nucleotídicos o de secuencias complementarias), es decir que el complejo bicatenario obtenido durante esta hibridación comprende únicamente unas uniones A-T y unas uniones C-G. Esta hibridación puede ser parcial (se habla entonces de fragmentos nucleotídicos o de secuencias suficientemente complementarias), es decir que el complejo bicatenario obtenido comprende unas uniones A-T y unas uniones C-G que permiten formar el complejo bicatenario, pero también unas bases no unidas a una base complementaria La hibridación entre dos fragmentos nucleotídicos depende de las condiciones de realización utilizadas, y en particular de la astringencia. La astringencia se define en particular en función de la composición de bases de dos fragmentos nucleotídicos, así como por el grado de emparejamiento erróneo entre dos fragmentos nucleotídicos. La astringencia puede estar también en función de los parámetros de la reacción, tales como la concentración y el tipo de especies iónicas presentes en la solución de hibridación, la naturaleza y la concentración de agentes desnaturalizantes y/o la temperatura de hibridación. Todos estos datos son bien conocidos y las condiciones apropiadas pueden ser determinadas por el experto en la materia. En general, según la longitud de los fragmentos nucleotídicos que se desean hibridar, la temperatura de hibridación está comprendida entre aproximadamente 20 y 70ºC, en particular entre 35 y 65ºC en una solución salina a una concentración de aproximadamente 0,5 a 1M. Las parejas de unión específicas o no del ARNm son cualquier pareja susceptible de unirse a este ARNm. A título de ejemplo, se pueden citar las sondas nucleicas, los cebadores de amplificación, y cualquier otra molécula capaz de unirse a este ARNm.

Por sonda de hibridación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleicas, en particular de 10 a 35 unidades nucleicas, que posee una especificidad de hibridación en condiciones determinadas para formar un complejo de hibridación con el material específico del gen diana de interés. La sonda de hibridación puede comprender un marcador que permita su detección.

En el sentido de la presente invención, se entiende por cebador de amplificación, un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleicas, preferiblemente de 15 a 30 unidades nucleicas que permite la iniciación de una polimerización enzimática, tal como en particular una reacción de amplificación enzimática. Por reacción de amplificación enzimática, se entiende un proceso que genera múltiples copias de un fragmento nucleotídico por la

acción de al menos una enzima. Tales reacciones de amplificación son bien conocidas por el experto en la materia y se pueden citar en particular las técnicas siguientes:

- PCR (Polymerase Chain Reaction), tal como se describe en las patentes US 4,683,195, US 4,683,202 y US 4,800,159,

- NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) con la solicitud de patente WO 91/02818, y

- TMA (Transcription Mediated Amplification) con la patente US 5,399,491.

Por detección, se entiende o bien un método físico, o bien un método químico con un agente colorante intercalante tal como SYBR® Green I o el bromuro de etidio, o bien un método de detección con la ayuda de un marcador. Existen numerosos métodos de detección para la detección de los ácidos nucleicos[62]. Los marcadores apropiados son tales como se han definido anteriormente.

En el sentido de la presente invención, la sonda de hibridación puede ser una sonda denominada de detección. En este caso, la sonda denominada de detección está marcada mediante un marcador tal como se ha definido anteriormente. Gracias a la presencia de este marcador, se puede detectar la presencia de una reacción de hibridación entre una sonda de detección dada y el transcrito a detectar.

La sonda de detección puede ser en particular una sonda de detección "molecular beacons"[63]. Estas "molecular beacons" se vuelven fluorescentes durante la hibridación. Poseen una estructura de tipo tallo-bucle y contienen un fluoróforo y un grupo "quencher" (inhibidor de la fluorescencia). La fijación de la secuencia de bucle específica con su secuencia complementaria de ácido nucleico diana provoca un desenrollado del tallo y la emisión de una señal fluorescente durante la excitación a la longitud de onda conveniente.

La sonda de hibridación puede ser también una sonda denominada de captura. En este caso, la sonda denominada de captura está inmovilizada o es inmovilizable sobre un soporte sólido, mediante cualquier medio apropiado, es decir directa o indirectamente, por ejemplo por covalencia o adsorción. Los soportes sólidos apropiados son conocidos por el experto en la materia, y se pueden citar a título de ejemplos los materiales de síntesis o los materiales naturales, los látex, las partículas magnéticas, los derivados metálicos, los geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microvaloración, de una membrana como se describe en la solicitud WO-A-94/12670, de una partícula. Se puede también inmovilizar sobre el soporte varias sondas de captura diferentes, siendo cada una específica de un transcrito diana. En particular, se puede utilizar como soporte un biochip en el que pueden ser inmovilizadas un gran número de sondas. La inmovilización de las sondas sobre el soporte es también conocida por el experto en la materia, y se puede citar un depósito de sondas por transferencia directa, la micro-deposición, la síntesis *in situ* y la fotolitografía.

La puesta en evidencia, en la muestra biológica, de las modificaciones o anomalías de ADN a nivel del gen que codifica para el marcador tumoral de interés se puede realizar mediante cualquier procedimiento de determinación de las alteraciones del ADN en una muestra. A saber la detección directa de mutaciones, o bien la puesta en evidencia de alteraciones en el perfil de metilación de los locus de interés, o cualquier otro procedimiento de determinación de alteraciones del ADN en una muestra, conocido por el experto en la materia.

Las mutaciones pueden incluir unas sustituciones puntuales de un nucleótido por otro, unas deleciones de uno o varios nucleótidos y unas inserciones de uno o varios nucleótidos. Las mutaciones pueden estar situadas en la parte que codifica el gen del marcador tumoral de interés, o en las partes 5' y 3' no codificantes como la región promotora o la región terminadora de transcripción.

Las estrategias de puesta en evidencia de mutación se apoyan en las técnicas de la biología molecular y comprenden unas etapas de extracción de ADN, de amplificación por PCR u otra técnica de amplificación, de hibridación y/o de secuenciación. En el caso del cáncer colorrectal, se ha utilizado el procedimiento siguiente con éxito para realizar la detección de mutaciones en el ADN de las heces: concentración del ADN por precipitación, enriquecimiento en diana utilizando unos oligonucleótidos de captura sobre perlas magnéticas, amplificación PCR de los genes de interés, secuenciación en fase sólida para identificar las mutaciones puntuales[64]. Las deleciones se identificaron con respecto a la diferencia de tamaño entre el fragmento de referencia esperado y el fragmento mutado. Imperiale *et al.*[64] han descrito un abanico de 21 mutaciones situadas en los genes K.*ras*, APC, y p53 que permite detectar 16/31 de los cánceres invasivos.

Otros marcadores de ADN utilizados son la deleción BAT-26, que es un marcador de inestabilidad de los microsatélites y el ADN altamente amplificable denominado ADN largo (L-ADN), que no es un marcador específico pero que parece reflejar la apoptosis desordenada de las células tumorales exfoliadas en el lumen cólico[65]. Estos marcadores no son satisfactorios ni con respecto a su sensibilidad, ni con respecto a su especificidad.

Como se ha indicado anteriormente, las alteraciones del ADN pueden también corresponder a una modificación del perfil de metilación del gen que corresponde al marcador tumoral de interés. La modificación del perfil de metilación

puede corresponder a una hipometilación (disminución del número de metilaciones) o a una hipermetilación (aumento del número de metilaciones). Las unidades alteradas pueden estar situadas en la parte codificante del gen del marcador tumoral de interés, o en las partes 5' y 3' no codificantes como la región promotora o la región terminadora de transcripción.

El análisis de la metilación del ADN se puede efectuar utilizando unas técnicas basadas en la PCR cualitativa y/o cuantitativa como la MSP (metilación-específica PCR), la secuenciación bisulfito, la digestión por una enzima de restricción sensible a las metilaciones acoplada con la PCR, COBRA (análisis de restricción combinado bisulfito) y Ms-SNuPE (extensión del cebador en un único nucleótido sensible a la metilación). El conjunto de estas técnicas se repasó en detalle y de manera comparada en un artículo de metodología[66].

En la bibliografía, se han detallado varios genes hipermetilados en caso de cáncer colorrectal. A título de ejemplo, se puede citar el gen ALX4 (homeocaja-4 de tipo Aristaless)[56], la región promotora del gen TPEF/HHP1 (factor de crecimiento epidérmico que contiene una proteína transmembranaria y dominio folistatina)[67] o también el gen septina-9[68].

Cuando, en el procedimiento de la invención, se detectan al menos dos marcadores, estos pueden ser puestos en evidencia de manera separada, por ejemplo con la ayuda de kids diferentes, o bien de manera simultánea, en ensayo multiplex.

Cuando, en el procedimiento de la invención, se detectan dos marcadores de naturaleza diferente, por ejemplo un marcador proteico y un marcador ARNm, se pueden utilizar dos procedimientos de detección diferentes, seleccionados entre los descritos anteriormente. Se les puede detectar también simultáneamente, en el mismo medio de detección y en las mismas condiciones de reacción, como se describe en la solicitud de patente WO03/104490. Las etapas del procedimiento de detección descrito en esta solicitud de patente, que consiste en detectar simultáneamente unas reacciones de hibridación e inmunológicas en una muestra susceptible de contener unos analitos diana constituidos de al menos un ácido nucleico y de al menos otro ligando de naturaleza diferente, consisten en:

(i) depositar una cantidad conocida en volumen de la muestra diluida en un tampón de reacción, en una superficie de captura previamente revestida de parejas de captura de dichos analitos diana, consistiendo dichas parejas de captura en al menos una sonda nucleica y al menos un anti-ligando,

(ii) poner a reaccionar a una temperatura comprendida entre 15ºC y 60ºC, y

(iii) visualizar las reacciones de hibridación e inmunológicas así obtenidas.

La muestra biológica puede necesitar un tratamiento particular ya que puede contener el o los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención como tales, o bien puede contener unas células tumorales circulantes que contienen los marcadores buscados en el procedimiento de la invención y/o unas células tumorales circulantes que son capaces de segregar el o los marcadores buscados en el procedimiento de la invención.

Así, según un modo de realización de la invención, la muestra biológica es previamente tratada para aislar las células tumorales circulantes contenidas en dicho fluido.

Por aislar las células tumorales circulantes, se entiende obtener una fracción celular enriquecida en células tumorales circulantes.

El tratamiento de la muestra biológica para aislar las células tumorales circulantes se puede efectuar por clasificación celular en un citómetro de flujo, por enriquecimiento sobre Ficoll, por enriquecimiento por bolas magnéticas recubiertas de anticuerpos específicos, o por cualquier otro método de enriquecimiento específico conocido por el experto en la materia.

En el caso de la sangre como muestra biológica, las células tumorales circulantes se pueden aislar gracias a una técnica de separación celular sobre Ficoll asociada a una depleción de las células sanguíneas que utilizan unos anticuerpos anti-CD45 acoplados a perlas magnéticas (Dynal Biotech ASA, Noruega).

La detección del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención se puede efectuar entonces directamente a partir de células tumorales circulantes aisladas de la muestra biológica, por ejemplo por marcado inmunocitoquímico de estas células con un anticuerpo anti-marcador(es) tumoral(es) buscado(s) en el procedimiento de la invención, después de depositar las células tumorales circulantes en una lámina por Cytospin. La detección del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención se puede efectuar asimismo directamente en las células tumorales circulantes utilizando el método de citometría de flujo, tal como se describe en Métézeau *et al.*[69].

En estas condiciones, dichas células circulantes pueden ser tratadas en condiciones que permiten el bloqueo del o

de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención en el interior de dichas células. Tal tratamiento está descrito por Mathieu *et al.*[70].

La detección del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención se realiza después de hacer que la membrana de las células sea permeable para hacer entrar las parejas de unión específicas del o de los marcadores buscados en el procedimiento de la invención.

La detección directa del o de los marcadores tumorales utilizados en el procedimiento de la invención a partir de las células circulantes puede también ser realizado con la ayuda de un procedimiento ELISPOT, por ejemplo con la ayuda del procedimiento descrito en la solicitud de patente WO03/076942 depositada por la solicitante. Este procedimiento es un procedimiento de detección y/o cuantificación de células tumorales circulantes de una muestra biológica, las cuales son capaces de liberar o segregar *in vitro* uno o varios marcadores tumorales, que comprende las etapas que consisten en:

(i) depositar una cantidad de dichas células en el fondo de una superficie de cultivo sobre la cual se fija al menos una pareja de unión específica de dicho o dichos marcadores tumorales,

(ii) cultivar dichas células en condiciones tales que liberan o segregan dichos marcadores tumorales que están inmunocapturados en el fondo de la superficie de cultivo,

(iii) eliminar las células por lavado,

(iv) añadir al menos un conjugado marcado específico de dichos marcadores tumorales

(v) visualizar el marcado así obtenido.

La detección directa del o de los marcadores tumorales utilizados en el procedimiento de la invención en las células tumorales se puede también realizar en el medio de cultivo de dichas células después de haberlas cultivado en condiciones tales que segregan uno o unos marcadores tumorales utilizados en el procedimiento de la invención.

Las condiciones de cultivo para la liberación o la expresión de los marcadores tumorales son unas condiciones clásicas tales como 37ºC bajo atmósfera húmeda y al 5% de CO_2.

Cuando la muestra biológica es una muestra sólida, la presencia del o de los marcadores tumorales puede también ser mostrada *in vivo*, *in situ* en los tumores.

Para mostrar la presencia de un marcador tumoral dentro de un tumor *in vivo*, se puede utilizar cualquier método de diagnóstico por imágenes conocido por el experto en la materia. Para ello, se puede acoplar una pareja de unión de dicho marcador tumoral a un trazador de diagnóstico por imagen.

Por acoplamiento de las parejas de unión a un trazador de diagnóstico por imágenes, se entiende la fijación de un trazador capaz de ser detectado mediante cualquier método de diagnóstico por imágenes, conocido por el experto en la materia y generar directa o indirectamente una señal detectable. Así, el trazador puede ser un trazador radioactivo como el tecnetio-99. En este caso, el órgano que padece cáncer primitivo o metástasis fijará el marcador tumoral y su trazador. La radiación emitida por el órgano puede ser grabada por una cámara especial, por ejemplo una cámara gamma. El aparato recoge los centelleos generados por la sustancia radioactiva y permite así visualizar el órgano.

En otro procedimiento de la invención, el trazador puede comprender un cuerpo radioactivo que emite positrones (Fluor 18). Las imágenes serán adquiridas después por un sistema de tomografía por emisión de positrones.

En otro procedimiento preferido de la invención, la pareja del o de los marcadores tumorales puede estar acoplada a nanopartículas. A título de ejemplo, puede tratarse de nanopartículas supramagnéticas. Por ejemplo unas nanopartículas magnéticas aniónicas para la aplicación al marcado celular directo y la detección *in vivo* por diagnóstico por imágenes por resonancia magnética nuclear. Puede también tratarse de nanopartículas de oro.

Gracias a los procedimientos de la invención que permiten la detección del marcador tumoral *in vivo*, se podrá visualizar las zonas del organismo en las que hubo fijación de la pareja de unión del marcador tumoral, los cánceres que producen el marcador tumoral.

El procedimiento de la invención se puede utilizar tanto para el diagnóstico precoz, como para la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de las recaídas en el ámbito del cáncer colorrectal ya que la disminución de la concentración de apolipoproteína AI en la muestra distante tiene lugar sea cual sea la fase de cáncer colorrectal, lo que constituye otro objeto de la invención.

La invención se entenderá mejor con la ayuda de los ejemplos siguientes dados a título ilustrativo y no limitativo, así

como con la ayuda de las figuras 1 a 21 anexas, en las que:

- la figura 1 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de LEI, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 2 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la Ezrina, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 3 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la Aminociclasa 1, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 4 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de L-FABP, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 5 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de I-FABP, en pg/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 6 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la Apolipoproteína AI, en µg/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-), bien en microplaca ELISA (figura 6A), o bien con el kit Lincoplex (figura 6B),

- la figura 7 es un gráfico relativo al ensayo por el kit multiplex de Linco de la Apolipoproteína AII, en µg/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 8 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la Plastina-I, en RFV (Valor de Fluorescencia Relativa), en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 9 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la beta2-Microglobulina, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 10 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de ACE, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 11 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de CA 19-9, en U/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 12 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la Testosterona, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 13 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la E-Cadherina, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 14 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la PAP1, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 15 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la Galectina-3, en RFV, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 16 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la LDH, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 17 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA del Proteasoma 20S, en ng/ml, en el suero de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 18 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de Aminociclasa 1, en ng/ml, en las heces de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 19 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de Galectina-3, en RFV, en las heces de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),

- la figura 20 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de Proteasoma 20S, en RFV, en las heces de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-), y

- la figura 21 es una representación gráfica de un ensayo ELISPOT de LEI, de Ezrina y de la Galectina-3, en número de puntos por 10^6 células cancerosas de las líneas Caco-2, HT-29 y HT29-B6.

Ejemplo 1: Clonación de los genes que codifican para los marcadores tumorales y expresión de las proteínas recombinantes

1. Amplificación del ADNc y clonación

Se cultiva la línea de cáncer colorrectal Caco-2 en el medio DMEM que contiene 2 mM de L-Glutamina, sin SVF (suero fetal de ternera) (todos de Gibco).

Para la clonación de los genes LEI, L-FABP y Gal-3, se han extraído los ARN mensajeros a partir del residuo de 10^8 células Caco-2 utilizando el kit FastTrack 2.0 de Invitrogen (Cat. nº 45-0019), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La etapas de transcripción inversa y de PCR se realizan de una sola vez a partir de 450 ng de ARNm Caco-2, con el kit Superscript III One Step RT-PCR System (Invitrogen Cat. nº 12574-018) utilizando la enzima Platinum Taq DNA polimerasa, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los cebadores de PCR utilizados para la amplificación de los genes se dan en la Tabla 1.

Tabla 1

Genes y Cebadores	Oligonucleótidos
LEI	
OL215 (SEQ ID 1)	5'-ATGGAGCAGCTGAGCTCAGCAAAC-3'
OL216 (SEQ ID 2)	5'-CTAAGGGGAAGAAAATCTCCCCAA-3'
L-FABP	
Sentido (SEQ ID 3)	5'-CGGAGCGTCTCCCATGAGTTTCTCCGGCAAGTA-3'
antisentido (SEQ ID 4)	5'-GAAATGCAGACTTGTCTAGATGCGCTTGCTGATG CGCTTGAAGACAATG-3'
Gal-3	
OL217 (SEQ ID 5)	5'-ATGGCAGACAATTTTTCGCTCC-3'
OL218 (SEQ ID 6)	5'-TTATATCATGGTATATGAAGCACTGG-3'

Los fragmentos de ADN obtenidos se clonaron en el vector pCR2.1 TOPO (LEI y Gal-3) con el TA Cloning kit (Invitrogen Cat. nº K4520-01) o el vector pCMV6-XL4 de Origene (L-FABP) después de la digestión por Bsm BI y Xba I. Se secuenciaron los plásmidos a fin de verificar que el ADNc es conforme a la secuencia esperada.

Para la clonación del gen que codifica para la Aminociclasa 1, los ARN totales se extrajeron a partir de un residuo de 10^8 células Caco-2 utilizando el kit RNA Easy Mini de Qiagen, siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. La transcripción inversa se realiza a partir de 10 ng de ARN Caco-2, con la enzima Superscript II (Invitrogen) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El cebador de transcripción inversa es un oligo(dT).

El ADNc procedente de esta reacción se utilizó como matriz en una reacción de PCR que utiliza el kit AccuPrime Pfx (Invitrogen Cat. nº 12344-024) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los cebadores de PCR son: ACY-1 Fwd2 (SEQ ID 7: 5'-GCGAATTCTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGAGCAAAGG-TCCGGAAGAGGAGCACCCATCG-3') y ACY-1 Rev (SEQ ID 8: 5'-GCAAGCTTCAGCTGTCACTGGGCAGGGC-3')

En estas condiciones, se ha podido amplificar un fragmento de 1,3 kb que se ha clonado en un vector de clonación de tipo Zéro Blunt TOPO PCR Cloning kit (Invitrogen Cat. nº K2820-20). Este plásmido se ha secuenciado a fin de verificar que el ADNc es conforme a la secuencia esperada.

El fragmento de ADN siguiente (SEQ ID 9) que contiene el marco de lectura abierto *I-FABP* se ha obtenido por síntesis química, efectuada por la compañía Geneart.

SEQ ID°9 :

GGTACCGAATTCCGCGTTTGACAGCACTTGGAAGGTAGACCGGAGTGAAAACTATGACAAG
TTCATGGAAAAAATGGGTGTTAATATAGTGAAAAGGAAGCTTGCAGCTCATGACAATTTGA
AGCTGACAATTACACAAGAAGGAAATAAATTCACAGTCAAAGAATCAAGCGCTTTTCGAA
ACATTGAAGTTGTTTTTGAACTTGGTGTCACCTTTAATTACAACCTAGCAGACGGAACTGAA
CTCAGGGGGACCTGGAGCCTTGAGGGAAATAAACTTATTGGAAAATTCAAACGGACAGAC
AATGGAAACGAACTGAATACTGTCCGAGAAATTATAGGTGATGAACTAGTCCAGACTTATG
TGTATGAAGGAGTAGAAGCCAAAAGGATCTTTAAAAAGGATTCTAGAGTCGACGAGCTC

2. Construcción de los vectores de expresión

Se han subclonado los genes que codifican para LEI y Galectina-3 en el vector de expresión procariota pMR78[71] y el gen de L-FABP en el vector pET3d (New England Biolabs). Se han introducido los sitios de restricción necesaria a la clonación por PCR utilizando como matriz los plásmidos pCR2.1 TOPO-LEI, pCR2.1 TOPO-Gal-3 y pCMV6-LFABP. La enzima de PCR es la Pfu ADN polimerasa de Promega, la reacción de PCR se ha realizado según las instrucciones del fabricante con los cebadores dados en la Tabla 2.

Tabla 2

Genes y Cebadores	Oligonucleótidos
LEI	
OL228 (SEQ ID 10)	5'-ATGGGAATTCAGGAGCAGCTGAGCTCAGCAA-3'
OL229 (SEQ ID 11)	5'-CGATAAGCTTAAGGGGAAGAAAATCTCCCC-3'
L-FABP	
Sentido (SEQ ID 12)	5'-GCTGGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCATCA CATGAGTTTCTCCGGCAAGTACCAAC-3'
Antisentido (SEQ ID 13)	5'-GCACGGATCCTAGATGCGCTTGCTGATGCGCTTGAA GAC-3'
Gal-3	
OL230 (SEQ ID 14)	5'-ATGGGAATTCAGGCAGACAATTTTTCGCTCC-3'
OL231 (SEQ ID 15)	5'-CGATAAGCTTATATCATGGTATATGAAGCACTGG-3'

Los productos de PCR que contienen los marcos de lectura abiertos que codifican para LEI o Galectina-3 se han digerido por las enzimas de restricción Eco RI y Hind III. Los fragmentos se han introducido en el vector pMR78 restringido por las mismas enzimas (plásmidos pMR-LEI y pMR-Gal-3). El vector pMR78 contiene una secuencia 6-histidina en fase con la proteína a expresar que permite la purificación por cromatografía de afinidad metal-quelato. El producto de PCR L-FABP se ha clonado en el vector pET3d, a nivel de los sitios de restricción Nco I y Bam HI.

Para la Aminociclasa 1, el vector de clonación TOPO se ha digerido directamente por las enzimas de restricción Eco RI y Hind III a fin de generar un fragmento de 1,3 kb que contiene el marco de lectura abierto *acyl*, que se introdujo en el vector pStaby1 (Eurogentec). El plásmido recombinante se denomina pStaby1-ACY.

Para la I-FABP, el vector de clonación proporcionado por Geneart se ha digerido por las enzimas de restricción Eco RI y Sal I a fin de generar un fragmento de aproximadamente 400 pb que contiene la secuencia codificante que se introdujo en el vector pMRCH79 (derivado del vector pMR78, bioMérieux). El plásmido recombinante se denomina pMRCH-*IFABP*.

Los plásmidos pGEX-Ezrina y pGEX-Plastina-I, que permiten expresar respectivamente la Ezrina y la Plastina-I en fusión con la GST (Glutatión S-transferasa), se han proporcionado por el Institut Curie.

3. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes

Los plásmidos de expresión que permiten producir los marcadores tumorales se introducen en unas bacterias E. coli BL21 y derivadas (Stratagene). Se realizan los cultivos a temperatura ambiente bajo agitación. Las condiciones de cultivo precisas para cada proteína se recogen en la Tabla 3. El IPTG es la isopropil-beta-D-1-tiogalactosidasa.

Los residuos bacterianos se recogen en tampón PBS 2X (tampón fosfato salino) y se pasan en un desintegrador de células a 1,5 kbar (Constant System). Los lisados se centrifugan a 3000 *g* durante 30 min. a 4ºC. El sobrenadante contiene las proteínas solubles. El residuo contiene los cuerpos de inclusión. El tampón de solubilización de los cuerpos de inclusión depende de la proteína.

Para el LEI, la purificación se lleva a cabo a partir de la fracción soluble, sobre una columna que contiene 5 ml de resina Ni-NTA-sefarosa (Qiagen) y la proteína se eluye con PBS 2X que contiene imidazol 450 mM, pH 7,5.

Para la Galectina-3, los cuerpos de inclusiones son solubilizados en PBS 2X, urea 1M, pasados en 5 ml de resina Ni-NTA-sefarosa (Qiagen) y la proteína Gal-3 se eluye con PBS 2X que contiene imidazol 450 mM, urea 1M pH 7,5.

Para la L-FABP, la purificación se lleva a cabo a partir de la fracción soluble, utilizando el kit Ni-IDA de Macherey-Nagel.

Tabla 3

	Cepa	Volumen de cultivo	Inducción IPTG	Purificación
LEI	BL21	250 ml	0,1 mM	Ni-NTA
Gal-3	BL21-Codón más (DE3)-RIPL	400 ml	0,5 mM	Ni-NTA
L-FABP	BL21	500 ml	0,1 mM	Ni-IDA

GST-Ezrin	BL21	250 ml	0,1 mM	GST
ACY-1	BL21-Codón más (DE3)-RIPL	500 ml	0,1 mM	Otra

Para la GST-Ezrina, la purificación se lleva a cabo a partir de los cuerpos de inclusión solubilizados en el tampón Tris 100 mM, urea 8M, DTT 10 mM por cromatografía de afinidad GST. Se utiliza una columna que contiene 5 ml de gel "Glutathione Sepharose 4 fast flow" (Amersham). El tampón de equilibración y de lavado es el PBS 2x, Tween 20 0,05%. El tampón de elución es el Tris-HCl 50 mM, glutationa reducida 20 mM, pH 8.

Para la Aminoacilasa 1, la fracción soluble del cultivo se pasa en una columna Amersham HiTrap Q FF y la proteína ACY-1 se diluye con 0,3M NaCl a pH 7,5. Como otras diversas proteínas se han co-eluido en estas condiciones, la purificación se prosiguió sobre una columna de interacción hidrófoba (HIC Phenyl HP, Amersham). La proteína ACY-1 se ha eluido por 0,5M NaCl a pH 7.

La proteína recombinante GST-Plastina-I se ha proporcionado por el Institut Curie en forma purificada.

La proteína recombinante Calreticulina se ha producido por la compañía Proteus Services for Industry (Dijon, Francia). Se obtuvo la secuencia que codifica para la Calreticulina por síntesis química.

Ejemplo 2: Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores tumorales

1. Modelo animal

Los experimentos de inmunización se han realizado en unos ratones BALB/c (H-2^d) hembras de 6 a 8 semanas de edad en el momento de la primera inmunización.

2. Inmunógenos e inmunizaciones

Con el fin de aumentar las respuestas inmunes obtenidas en los ratones y poder generar unos anticuerpos monoclonales, se han producido los marcadores tumorales en forma de proteínas recombinantes producidas según los modos de realización descritos en el ejemplo 1. La proteína LDH se ha obtenido de la compañía SciPac (Cat. nº 103-133). Estas proteínas se mezclaron volumen por volumen con el adyuvante de Freund (Sigma), preparado en forma de emulsión agua en aceite y del cual se sabe que presenta un buen poder inmunógeno. Para cada marcador tumoral, se han inmunizado 3 ratones. Los ratones han recibido 3 dosis sucesivas de 10 μg de los inmunógenos a 0, 2 y 4 semanas. Todas las inyecciones se han realizado por vía sub-cutánea. La primera inyección se realiza en mezcla con el adyuvante de Freund completo, los dos siguientes se realizan en mezcla con el adyuvante de Freund incompleto. Entre D50 y D70 después de la primera inyección, se han re-estimulado las respuestas humorales con una inyección intravenosa de 100 μg de la proteína recombinante.

3. Seguimiento de la aparición de la respuesta humoral

Con el fin de supervisar la aparición de los anticuerpos, se efectúan regularmente en los ratones unas extracciones de sangre. La presencia de los anticuerpos anti-marcador tumoral se ensaya utilizando un ELISA. La proteína de interés se utiliza en captura (1 μg/pocillo), después de la saturación, se hacen reaccionar con el antígeno diferentes diluciones de sueros a ensayar (incubación a 37ºC, durante 1h). Los anticuerpos específicos presentes en el suero se revelan mediante un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón AffiniPure conjugado con la fosfatasa alcalina (H+L, Jackson Immunoresearch, Cat. no. 115-055-146), que se une a los anticuerpos buscados (0,1 μg/pocillo).

4. Obtención de anticuerpos monoclonales

Tres días después de la última inyección, para cada marcador tumoral, se ha sacrificado uno de los ratones inmunizado; se han extraído la sangre y el bazo. Los esplenocitos obtenidos a partir del bazo se han puesto en cultivo con las células de mieloma Sp2/0-Ag14 para que funcionen y se inmortalicen, según el protocolo descrito por Köhler y Molstein[72,73]. Después de un periodo de incubación de 12-14 días, los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos se cribaron para determinar la presencia de anticuerpos antimarcador tumoral utilizando el ensayo ELISA descrito en el punto 3 de este ejemplo. Cuando se utilizan unas proteínas de fusión GST como inmunógeno, los clones dirigidos contra la GST se eliminan efectuando un cribado ELISA con, en captura, la GST no acoplada. Las colonias de hibridoma positivas se sub-clonaron dos veces según la técnica de la dilución límite, bien conocida por el experto en la materia.

5. Caracterización de los anticuerpos monoclonales por inmunotransferencia

La lista de los anticuerpos monoclonales obtenidos contra los diferentes marcadores tumorales se presenta en la Tabla 4. Estos anticuerpos monoclonales se analizaron mediante la técnica de transferencia Western.

Tabla 4

Marcadores tumorales	Nombre de los anticuerpos monoclonales
Inhibidor de la elastasa de leucocitos (LEI)	21B10A5 y 10E1H1
Ezrina	4A7A6C1 y 4A9H5
Aminoacilasa 1	2A7F6 y 11H7D9
Plastina-I	3D11D10, 8C8C5, 3A3H2, 8G2D2
Calreticulina	5C10H10 y 11B6D11
L-lactato deshidrogenasa cadena B (LDH)	3F11E11 y 12F10G8
Galectina-3	12F8A12 y 14A5G1

5.1. Metodología

Los extractos de cultivo celulares de líneas Caco-2 y HT-29 se preparan lisando directamente el residuo celular por 600 µl de una solución en agua de urea 8,3M, tiourea 2M, sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propano (CHAPS) 4%, DTT 100 mM, Servalyte 4-9 (Serva, Heidelberg, Alemania) 2%, Orange G 0,1g/l, y después se tratan según el protocolo de preparación de muestra de los geles NuPAGE Novex (Invitrogen). Para obtener los extractos de tejido, las biopsias tumor y mucosas de los pacientes GHBD001, GHBD004 y CLSP109 se disociaron con escalpelo, después sufrieron 10 ciclos de extracción en el sistema Medimachine (Becton Dickinson) utilizando unos Medicons 50 µm con 1 ml de tampón PBS, 2,5 mM EDTA, inhibidores de proteasas (pastillas Roche). Estos 10 ml de suspensión celular se agrupan, se completan a 25 ml y después se centrifugan durante 15 min a 600g. El sobrenadante corresponde al extracto de tejido que se trata según el protocolo de preparación de muestra de los geles NuPAGE Novex. Se utilizan unas muestras reducidas, a una concentración final en proteína total de 0,4 mg/ml. El volumen de depósito es de 20 µl por pocillo, en un gel NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12%, tampón de migración MOPS. Después de la migración (bajo 200V, durante 1 hora) y transferencia sobre membrana de PVDF (bajo 400 mA, durante 45 min.), la calidad de la transferencia se aprecia por una coloración con negro amido.

Las membranas son saturadas con el 5% de leche desnatada (Régilait) en una solución de TNT (Tris 15 mM, NaCl 0,14M, Tween 20 0,5% pH8) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la saturación, las membranas se incuban durante 1 hora con los diferentes anticuerpos a ensayar diluidos a 10 µg/ml en la solución de saturación. Después del aclarado con TNT, las membranas se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente con un conjugado anti-ratón-peroxidasa de rábano picante diluido al 1:5000, (Cat No. 115-035-062, Jackson Immunoresearch) en la solución de saturación. Después del aclarado, se realiza la revelación con el kit Substrat Supersignal West Dura Extended (Cat No. 34076, Pierce) según los datos de utilización recomendados.

La señal de quimioluminiscencia sobre las membranas se midió con el sistema de diagnóstico de imágenes VersaDoc de Biorad. A partir de la imagen de la transferencia Western, los volúmenes de las bandas que corresponden a los diferentes marcadores tumorales se evaluaron con el programa QuantityOne (Bio-Rad). El volumen corresponde a la intensidad de la señal de quimioluminiscencia multiplicada por la superficie de la banda.

5.2. Resultados

Los resultados de la transferencia Western se recogen en la Tabla 5, que da el volumen de las bandas que corresponden al marcador tumoral de interés sobre los análisis por transferencia Western, en función de las diferentes muestras ensayadas. Estos resultados muestran que los marcadores tumorales ensayados están bien expresados por las líneas de cáncer de colon Caco-2 y HT-29, así como en los tejidos, como se muestra con los extractos de tumor y mucosa, obtenidos a partir de pacientes. La intensidad de la señal obtenida con un anticuerpo sobre una muestra se puede comparar a las señales obtenidas con las otras muestras y el mismo anticuerpo. La técnica utilizada permite confirmar la presencia o la ausencia del marcador en el tejido (muestra no distante) y la especificidad de los anticuerpos frente a marcadores. Esta técnica no se ha realizado en este ejemplo en las muestras distantes, ya que no permitiría deducir la presencia o no del marcador tumoral en las muestras distantes, ni determinar si su concentración sería aumentada o disminuida en estos. Además, el esquema experimental utilizado no permite comparar la reactividad de un anticuerpo con el otro.

Tabla 5

Marcador tumoral y anticuerpo	Caco-2	HT-29	Tejido tumor GHBD001	Tejido mucosa GHBD004	Tejido tumor GHBD004	Tejido mucosa CLSP109	Tejido tumor CLSP109
LEI							
21B10A5	8365	7678	NT	60200	36506	NT	NT
10E1H1	0	0	NT	13357	6893	NT	NT
Ezrina							
4A9H5	7066	4742	NT	NT	NT	1588	2446

4A7A6C1	123436	116448	42480	15303	67439	NT	NT
Amiroacilasa 1							
2A7F6	10687	4787	NT	NT	NT	4477	7238
11H7D9	217664	232005	36093	10513	30233	NT	NT
Plastina-I							
3D11D10	136725	NT	NT	NT	NT	275477	246564
8C8C5	557	1110	4364	77	0	NT	NT
Calreticulina							
5C10H10	2842	3040	NT	NT	NT	2503	3294
11B6D11	3261	2937	NT	NT	NT	2070	2764
LDH							
3F11E11	45391	NT	NT	NT	NT	30411	13942
12F10G8	122907	154593	11841	15811	53285	NT	NT
Galectina-3							
12F8A12	245712	65790	18262	12961	7307	NT	NT
14A5G1	254531	120010	79833	98361	45872	NT	NT

NT: no ensayado.

5.3. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la Plastina-I

En el paciente GHBD004, el anticuerpo 8C8C5 no enciende, o enciende muy débilmente, la banda que corresponde a la Plastina-I. La presencia de Plastina-I en estas muestras puede ser demostrada utilizando por ejemplo el anticuerpo 8G2D2, que presenta una mejor afinidad para la Plastina-I en transferencia.

Como la Plastina-I es miembro de una familia de proteínas que comprende otras 2 isoformas (Plastinas L y T) con las que presenta más del 70% de homología, se ha ensayado el conjunto de los clones de anticuerpos monoclonales obtenidos para su reactividad frente a proteínas GST-Plastina-L y GST-Plastina-T (proporcionadas por el Institut Curie). Al final de este cribado, se han seleccionado los clones 3D11D10, 8C8C5, 3A3H2 y 8G2D2 que no presentan reactividad cruzada con los otros miembros de la familia. Estos anticuerpos son muy específicos de la isoforma Plastina-I.

Ejemplo 3: Valoraciones séricas de los marcadores tumorales

1. Pacientes y extracciones

La recogida de las muestras de sangre se realiza a nivel de una red de 8 centros clínicos repartidos en toda Francia, en el ámbito de 2 protocolos de ley Huriet.

Para la obtención del suero, la extracción sanguínea se realiza en tubo seco. Para la obtención del plasma, la extracción sanguínea se realiza en tubo EDTA. Después de la coagulación, el tubo se centrifuga durante 10 minutos a 1000 g, el suero se extrae, se alícuota y se conserva a -80ºC. El tubo de plasma es directamente centrifugado durante 10 minutos a 1000 g, el plasma se extrae, se alícuota y se conserva a -80ºC. Las muestras están perfectamente documentadas para la historia clínica de los pacientes.

2. Valoración sérica del marcador tumoral LEI

La proteína LEI se ha ensayado con la ayuda de los anticuerpos descritos en el ejemplo 2 y de un ensayo ELISA que utiliza el autómata Vidas® (bioMérieux). Para hacer esto, se ha construido el ensayo ELISA utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Los reactivos se han utilizado tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

1. Los clones se sensibilizaron con el anticuerpo de captura 10E1H1 a una concentración de 10 µg/ml.

2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se sustituyó por 300 µl de anticuerpos de revelación 21B10A5, acoplado a la biotina, diluido a 1 µg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).

3. Las muestras de suero, de plasma o de heces (50µl) se diluyeron directamente en el segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra, puro o después de una dilución previa al 1/20 en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).

4. Se realizó la reacción ELISA con la ayuda del autómata Vidas® y del protocolo del kit HBs Ag Ultra.

5. Los resultados se obtuvieron en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo (lectura del sustrato antes de la reacción).

Se estableció una curva patrón ensayando una gama de concentraciones del marcador tumoral en forma de proteína recombinante. La curva patrón se trazó detallando en las abscisas la concentración del marcador tumoral y en las ordenadas la señal leída por Vidas® (RFV o Valor de Fluorescencia Relativa). La concentración de marcador tumoral presente en el fluido corporal a ensayar (sangre, suero, plasma, heces) se calculó detallando la concentración que corresponde a la señal RFV leída por Vidas®.

Las dosis obtenidas para los pacientes analizados se detallan en la figura 1. Se puede señalar en esta figura que 3 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV y 1 suero de paciente que padece cáncer colorrectal de fase III muestran un claro aumento de su dosis de LEI sérica.

3. Valoración sérica del marcador tumoral Ezrina

La proteína ezrina se ha ensayado con la ayuda de los anticuerpos descritos en el ejemplo 2 y de un ensayo ELISA que utiliza el autómata Vidas® (bioMérieux). Para hacer esto, se ha construido el ensayo ELISA utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Los reactivos se utilizaron tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

1. Los conos se han sensibilizado con el anticuerpo de captura 4A9H5 a una concentración de 30 μg/ml.

2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido con 300 μl de anticuerpo de revelación 4A7A6C1, acoplado con biotina, diluido a 1 μg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).

3. Las muestras de suero, de plasma o de heces (50μl) se diluyeron directamente en el segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra.

4. La reacción ELISA se realizó con la ayuda del autómata Vidas® y del protocolo HBS AG ULTRA, cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación fue llevada a 100 ciclos.

5. Los resultados se obtuvieron en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo (lectura del sustrato antes de la reacción).

La concentración del marcador tumoral presente en el fluido corporal a ensayar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado según el modo de realización descrito en el párrafo 2 que se refiere a la valoración del LEI.

Las dosis obtenidas para los pacientes analizados se detallan en la figura 2. Se puede señalar en esta figura que 3 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV muestran un claro aumento de su dosis de ezrina sérica.

4. Determinación sérica del marcador tumoral Aminociclasa 1

La proteína Aminoacilasa 1 se ha ensayado con la ayuda de los anticuerpos descritos en el ejemplo 2 y de un ensayo ELISA utilizando el autómata Vidas® (bioMérieux). Para hacer esto, se ha construido el ensayo ELISA utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Los reactivos se utilizan tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

1. Se sensibilizaron los conos con el anticuerpo de captura 2A7F6 a una concentración de 20 μg/ml.

2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se sustituyó por 300 μl de anticuerpo de revelación 11H7D9, acoplado a la biotina, diluido a 1 μg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).

3. Las muestras de suero, de plasma o de heces (100 μl) se diluyeron directamente en el segundo pocillo del cartucho HBS Ag Ultra.

4. La reacción ELISA se realizó con la ayuda del autómata Vidas® y del protocolo HBS AG ULTRA cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación fue llevada a 100 ciclos.

5. Los resultados se obtuvieron en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo (lectura del sustrato antes de la reacción).

La concentración del marcador tumoral presente en el fluido corporal a ensayar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado según el modo de realización descrito en el párrafo 2, que se refiere a la valoración de LEI.

Las dosis obtenidas para los pacientes analizados se detallan en la figura 3. Se puede señalar en esta figura que 1 suero de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase II, 1 suero de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase III y 2 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV muestran un claro aumento de su dosis de Aminoacilasa 1 sérica.

5. Valoración sérica del marcador tumoral L-FABP

Se ha utilizado un kit ELISA comercializado por la compañía Hycult biotechnology para determinar la proteína L-FABP humana (Cat. nº HK404). Este kit permite cuantificar la proteína L-FABP en los sobrenadantes de cultivo celular, en el suero, el plasma o la orina, a fin de determinar la presencia de lesiones a nivel hepático. Se ha seguido el modo de realización recomendado por el fabricante con 2 modificaciones: las incubaciones se efectuaron a 37ºC y no a temperatura ambiente, los sueros se diluyeron al 1/10 antes del ensayo. La valoración de la proteína L-FABP se puede efectuar mediante técnicas alternativas, bien conocidas por los expertos en la materia.

La figura 4 presenta los resultados de este ensayo. En el grupo de suero que se ha ensayado, 41 pacientes de 141 que padecen cáncer colorrectal tiene una concentración sérica de L-FABP superior a 17 ng/ml, mientras que en el grupo control, ningún sujeto supera este valor. Entre estos 41 pacientes, se encuentran 8 pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase I, 8 que padecen cáncer colorrectal de fase II, 13 que padecen cáncer colorrectal de fase III y 12 que padecen cáncer colorrectal de fase IV. La concentración media de L-FABP sérica observada para 141 pacientes con un cáncer colorrectal es de 16,6 ± 1,3 ng/ml. El valor medio es de 6,6 ± 0,2 ng/ml para 112 individuos sanos (control negativo). Esta diferencia es estadísticamente significativa (P<0,0001, *t*.ensayo unilateral con corrección de Welch para varianzas desiguales).

6. Valoración sérica del marcador tumoral I-FABP

Se utilizó un kit ELISA comercializado por la compañía Hycult biotechnology para ensayar la proteína I-FABP humana (Cat. nº HK406). Este kit permite cuantificar la proteína I-FABP en los sobrenadantes de cultivo celular, en el suero, el plasma o la orina, a fin de determinar la presencia de lesiones isquémicas a nivel del intestino delgado. Se ha seguido el modo de realización recomendado por el fabricante. La valoración de la proteína I-FABP se puede efectuar mediante técnicas alternativas, bien conocidas por el experto en la materia.

La figura 5 presenta los resultados de este ensayo. En el grupo de suero ensayado, 15 pacientes de 40 que padecen un cáncer colorrectal tienen una concentración sérica de I-FABP superior a 40 pg/ml, mientras que en el grupo control únicamente 2 sujetos de 24 superan este valor. Más claramente, 3 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase I, 2 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase III y 1 suero de paciente que padece cáncer colorrectal de fase IV tienen una concentración sérica de I-FABP superior a 100 pg/ml. No se ha encontrado ninguna concentración superior a este valor en el grupo control CCR.

7. Valoración sérica del marcador tumoral Apolipoproteína AI

La valoración de la Apolipoproteína AI sérica se ha realizado mediante dos técnicas diferentes de inmunoensayo. En primer lugar, se ha utilizado un ELISA sándwich en microplaca. Las placas de 96 pocillos se han recubierto después con el anticuerpo monoclonal anti-Apo AI Clon 1404 (Biodesign Cat. nº H45404) a 1μg por pocillo. Después de 3 lavados en PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T), las placas se saturan con un 10% de leche en PBS-T durante 1h a 37ºC. Se lava de nuevo 3 veces en PBS-T, se deposita en placas de 100 μl unas diluciones de la gama estándar o 100 μl de la dilución al 1/100 000 de las muestras de suero a ensayar, y se incuba durante 2h a 37 C. La gama estándar se realiza diluyendo la proteína Apo AI (Biodesign Cat. nº A50620H) en PBS-T, BSA 1% (1,6 a 100 ng/ml). Después de 3 lavados en PBS-T, el anticuerpo de detección policlonal se acopla con peroxidasa de rábano picante (Biodesign Cat. nº K45452P) se añade a 0,1 μg por pocillo y se incuba durante 2h a 37ºC. Se efectúa de nuevo 3 lavados en PBS-T, antes de añadir el sustrato OPT EIA (BD), 100 μl/pocillo. Al final de 20 min., cuando el desarrollo de la coloración tiene lugar, se para la reacción mediante ácido sulfúrico 2N y se mide la absorbancia a 450 nm.

Los resultados de la valoración de Apo AI sérica en los pacientes por ELISA microplaca se dan en la Tabla 6A.

Tabla 6A

Patología[a]	Identificador de la muestra	Naturaleza	Fase	TNM[b]	Apo A1 µg/ml
Cáncer del hígado	HEPA 1/F0 1 1 9C	Suero			1267
Cáncer del hígado	HEPA 10/F0 1 1 9C	Suero			1358
Cáncer del hígado	HEPA 11/F0 1 1 9C	Suero			1475
Cáncer del hígado	HEPA 12/F0 1 1 9C	Suero			689
Cáncer del hígado	HEPA 13/F0 1 5B	Suero			975
Cáncer del hígado	HEPA 2/F0 1 1 9C	Suero			947

Cáncer del hígado	HEPA 3/F0 1 1 9C	Suero			741
Cáncer del hígado	HEPA 4/F0 1 1 9C	Suero			1051
Cáncer del hígado	HEPA 5/F0 1 1 9C	Suero			1273
Cáncer del hígado	HEPA 6/F0 1 1 9C	Suero			1084
Cáncer del hígado	HEPA 7/F0 1 1 9C	Suero			1851
Cáncer del hígado	HEPA 8/F0 1 1 9C	Suero			1408
Cáncer del hígado	HEPA 9/F0 1 1 9C	Suero			1160
CCR +	CBSE007/F0 GS 1 7 2C	Suero	I	TisN0M0	957
CCR +	CBSE016/F0 GS 2 5 8C	Suero	I	T1N0M0	835
CCR +	GHBD035/F0 GS 2 7B	Suero	I	TisN0M0	945
CCR +	CLSP059/F0 GS 1 7 5C	Suero	I	TisN0M0	787
CCR +	CBSE022/F0 GS 2 5 10C	Suero	I	T1N0M0	409
CCR +	CLSP118/F0 GS 1 5 9C	Suero	I	T2N0M0	639
CCR +	CLSP145/F0 GS 2 5 11C	Suero	I	T1N0M0	343
CCR +	CBSE011/F0 GS 1 1 6C	Suero	I	TisN0M0	354
CCR +	CLSP150/F0 GS 2 5 6C	Suero	I	T2N0M0	389
CCR +	GHBD003/F0 GS 2 1 5C	Suero	I	T2N0M0	508
CCR +	GHBD015/F0 GS 2 1 10C	Suero	I	TisN0M0	808
CCR +	P38868 s1 10C	Suero	II	T3N0M0	894
CCR +	GHBD039/F0 GS 1 1 4C	Suero	II	T3N0M0	805
CCR +	GHBD066/F0 GS 3 7B	Suero	II	T3N0M0	1181
CCR +	CLSP096/F0 GS 2 5 9C	Suero	II	T3N0M0	538
CCR +	CLSP154/F0 GS 2 5 9C	Suero	II	T3N0M0	686
CCR +	CBSE004/F0 GS 3 1 6C	Suero	II	T3N0M0	731
CCR +	CLSP105/F0 GS 1 10 5C	Suero	II	T3N0M0	540
CCR +	CLSP133/F0 GS 2 5 10C	Suero	II	T3N0M0	507
CCR +	CLSP136/F0 GS 4 5 10C	Suero	II	T3N0M0	423
CCR +	GHBD016/F0 GS 2 1 10C	Suero	II	T3N0M0	751
CCR +	GHBD037/F0 GS 1 4 4C	Suero	III	T3N2M0	604
CCR +	GHBD058/F0 GS 2 5 12C	Suero	III	T3N1M0	1248
CCR +	CBSE023/F0 GS 6 5 9C	Suero	III	T4N2M0	750
CCR +	GHBD005/F0 GS 1 5 9C	Suero	III	T3N1M0	500
CCR +	CLSP074/F0 GS 1 5 8C	Suero	III	T3N2M0	552
CCR +	CLSP144/F0 GS 4 5 9C	Suero	III	T3N1M0	804
CCR +	CLSP044/F0 GS 1 4 8C	Suero	III	T3N1M0	526
CCR +	CLSP097/F0 GS 1 8 2C	Suero	III	T3N1M0	630
CCR +	CLSP098/F0 GS 3 9 1C	Suero	III	T3N2M0	384
CCR +	CLSP121/F0 GS 2 7 1C	Suero	III	T3N2M0	706
CCR +	CLSP095/F0 GS 4 1 9C	Suero	IV	T3N1M1	540
CCR +	CLSP161/F0 GS 2 10 8C	Suero	IV	T3N2M1	573
CCR +	GHBD056/F0 GS 4 10 9C	Suero	IV	T3N2M1	719
CCR +	CBSE027/F0 GS 3 1 6C	Suero	IV	T4N2M1	907
CCR +	CLSP109/F0 GS 2 5 4C	Suero	IV	T3N1M1	460
CCR +	GHBD030/F0 GS 2 6B	Suero	IV	TxN0M1	957
CCR +	GHBD071/F0 GS 3 7 1C	Suero	IV	T4N2M1	760
CCR -	N017197/F0 HS 1 1 1C	Suero			639
CCR -	N440478/F0 HS 1 3 1C	Suero			774
CCR -	N748022/F0 HS 1 3 1C	Suero			476
CCR -	N862300/F0 HS 1 3 1C	Suero			930
CCR -	N376912/F0 HS 1 1 1C	Suero			962
CCR -	N440216/F0 HS 2 1 1C	Suero			1172
CCR -	N527135/F0 HS 1 1 1C	Suero			1200
CCR -	N527450/F0 HS 1 1 1C	Suero			934
CCR -	N593116/F0 HS 1 1 1C	Suero			1265
CCR -	N593183/F0 HS 1 1 1C	Suero			1086
CCR -	N370537/F0 HS 2 1 1C	Suero			1041
CCR-	N017365/F0 HS 1 4B	Suero			945
CCR-	N484882/F0 HS 0 1 5C	Suero			1016
CCR-	N376461/F0 HS 1 4B	Suero			1148
CCR -	N009901/F0 HS 1 3B	Suero			1152
CCR-	N011147/F0 HS 1 4B	Suero			1185
CCR-	N011155/F0 HS 1 3B	Suero			1156
CCR-	N017234/F0 HS 1 4B	Suero			1390

CCR -	N017269/F0 HS 1 4B	Suero			833
CCR-	N017402/F0 HS 1 4B	Suero			929
CCR -	N017410/F0 HS 1 4B	Suero			966
CCR-	N018552/F0 HS 1 4B	Suero			988
CCR-	N045730/F0 HS 1 4B	Suero			1129
CCR-	N314164/F0 HS 1 4B	Suero			1098
CCR -	N325015/F0 HS 1 4B	Suero			1129
CCR-	N376904/F0 HS 1 4B	Suero			1174
CCR-	N376920/F0 HS 1 4B	Suero			1375

a: CCR+: pacientes que padecen cáncer colorrectal / CCR-: sujeto sano
b: TNM: fase de invasión tisular (T), ganglionaria (lymph nodes, N) y a distancia (metástasis, M)

La Figura 6A presenta los resultados de este ensayo. Se ha puesto en evidencia una disminución de la concentración sérica de Apo AI en los sujetos que padecen cáncer colorrectal. La concentración media en 38 sujetos que padecen CCR de fase I a IV es de 675 ± 36 μg/ml mientras que es mucho más elevada en 27 sujetos sanos (controles): 1040 ± 39 μg/ml. Esta diferencia es estadísticamente muy significativa (P<0,0001, *t*-ensayo unilateral). A título de comparación, en 13 sujetos que padecen cáncer de hígado, la concentración sérica media de Apo AI es de 1175 ± 87 μg/ml con la técnica ELISA sándwich utilizada. La disminución de la concentración sérica demuestra que Apo AI es por lo tanto un marcador específico del cáncer colorrectal, pudiendo esta disminución ser demostrada por una valoración por inmunoensayo no turbidimétrico.

La segunda técnica de ensayo utilizada es un ensayo multiplex comercializado por la compañía Linco que permite ensayar varias Apolipoproteínas, incluyendo AI y AII, simultáneamente en la misma muestra (Cat. nº APO-62K). Se ha aplicado el modo de realización recomendado por el fabricante.

Los resultados de la valoración de Apo AI sérica en los pacientes por esta valoración multiplex se dan en la Tabla 6B.

Tabla 6B

Patología[a]	Identificador de la muestra	Naturaleza	Fase	TNM[b]	Apo A1 µg/ml
CCR +	CBSE011/F0 GS 1 1 2C	Suero	I	TisN0M0	970
CCR +	CBSE016/F0 GS 2 2B	Suero	I	T1N0M0	1146
CCR +	CBSE022/F0 GS 2 2B	Suero	I	T1N0M0	551
CCR +	CLSP118/F0 GS 1 2B	Suero	I	T2N0M0	729
CCR +	CLSP145/F0 GS 1 2B	Suero	I	T1N0M0	897
CCR +	CLSP150/F0 GS 2 5 2C	Suero	I	T2N0M0	580
CCR +	GHBD003/F0 AS 2 1 2C	Suero	I	T2N0M0	852
CCR +	GHBD015/F0 GS 2 1 2C	Suero	I	TisN0M0	747
CCR +	CBSE004/F0 GS 3 1 2C	Suero	II	T3N0M0	784
CCR +	CLSP076/F0 GS 1 3 2C	Suero	II	T3N0M0	886
CCR +	CLSP096/F0 GS 2 2B	Suero	II	T3N0M0	626
CCR +	CLSP105/F0 GS 1 10 2C	Suero	II	T3N0M0	630
CCR +	CLSP133/F0 GS 2 5 2C	Suero	II	T3N0M0	718
CCR +	CLSP136/F0 GS 4 5 2C	Suero	II	T3N0M0	679
CCR +	CLSP154/F0 GS 2 2B	Suero	II	T3N0M0	926
CCR +	GHBD016/F0 GS 2 1 2C	Suero	II	T3N0M0	1225
CCR +	GHBD020/F0 GS 1 5 2C	Suero	II	T3N0M0	916
CCR +	CBSE023/F0 GS 6 2B	Suero	III	T4N2M0	804
CCR +	CLSP044/F0 GS 1 4 2C	Suero	III	T3N1M0	871
CCR +	CLSP074/F0 GS 1 8 2C	Suero	III	T3N2M0	815
CCR +	CLSP078/F0 GS 1 7 3C	Suero	III	T3N1M0	863
CCR +	CLSP097/F0 GS 1 2B	Suero	III	T3N1M0	803
CCR +	CLSP098/F0 GS 3 2B	Suero	III	T3N2M0	351
CCR +	CLSP121/F0 GS 2 2B	Suero	III	T3N2M0	780
CCR +	CLSP144/F0 GS 1 2B	Suero	III	T3N1M0	702
CCR +	GHBD005/F0 GS 1 2B	Suero	III	T3N1M0	587
CCR +	CBSE021/F0 GS 2 2 4C	Suero	IV	T4N2M1	703
CCR +	CBSE026/F0 GS 4 2B	Suero	IV	T4N1M1	610
CCR +	CBSE027/F0 GS 3 1 2C	Suero	IV	T4N2M1	746
CCR +	CLSP095/F0 GS 4 5 2C	Suero	IV	T3N1M1	957
CCR +	CLSP109/F0 GS 2 5 2C	Suero	IV	T3N1M1	502
CCR +	CLSP161/F0 GS 2 2B	Suero	IV	T3N2M1	683
CCR +	GHBD056/F0 GS 1 2B	Suero	IV	T3N2M1	757

CCR +	GHBD071/F0 GS 2 2B	Suero	IV	T4N2M1	703
CCR -	N017197/F0 HS 1 2 1C	Suero			1303
CCR -	N017218/F0 HS 1 1 7C	Suero			1360
CCR -	N017365/F0 HS 2 1 3C	Suero			1413
CCR -	N018544/F0 HS 1 3 9C	Suero			1190
CCR -	N314199/F0 HS 1 3 9C	Suero			1060
CCR -	N370510/F0 HS 1 3 2C	Suero			769
CCR -	N440478/F0 HS 1 3 7C	Suero			1334
CCR -	N748022/F0 HS 1 3 7C	Suero			1675
CCR -	N862300/F0 HS 1 3 8C	Suero			959
CCR -	N376912/F0 HS 1 1 9C	Suero			1089
CCR -	N440216/F0 HS 2 1 9C	Suero			973
CCR -	N527135/F0 HS 1 1 9C	Suero			1271
CCR -	N527450/F0 HS 1 1 9C	Suero			1037
CCR -	N593116/F0 HS 1 1 9C	Suero			1333
CCR -	N593183/F0 HS 1 1 9C	Suero			1111
CCR -	N744056/F0 HS 1 1 9C	Suero			1220
CCR -	N370537/F0 HS 2 1 3C	Suero			1199

La Figura 6B presenta los resultados de este ensayo. Se confirma mediante esta segunda técnica la disminución de la concentración sérica de Apo AI en los pacientes que padecen CCR. La concentración media de Apo AI en 34 sujetos que padecen CCR de fase I a IV es de 768 ± 30 μg/ml mientras que es mucho más elevada en 17 sujetos sanos (controles): 1194 ± 51 μg/ml. Esta diferencia es estadísticamente muy significativa (P<0,0001, *t*-ensayo unilateral).

8. Valoración sérica del marcador tumoral Apolipoproteína AII

La valoración de la Apolipoproteína AII sérico se ha realizado con el kit multiplex de Linco. La Figura 7 presenta los resultados de este ensayo. Se ha demostrado una disminución de la concentración sérica de Apo AII en los sujetos que padecen cáncer colorrectal. La concentración media de Apo AII en 34 sujetos que padecen CCR de fase I a IV es de 170 ± 11 μg/ml mientras que es mucho más elevada en 17 sujetos sanos (controles): 277 ± 16 μg/ml. Esta diferencia es estadísticamente muy significativa (P<0,0001, *t*-ensayo unilateral).

9. Valoración sérica del marcador tumoral Plastina-I

La proteína Plastina-I se ha ensayado con la ayuda de los anticuerpos descritos en el ejemplo 2 y de un ensayo ELISA utilizando el autómata Vidas® (bioMérieux). Para hacer esto, se ha construido el ensayo ELISA utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Los reactivos se han utilizado tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

1. Los conos se han sensibilizado con el anticuerpo de captura 3D11D10 a una concentración de 15 μg/ml.

2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido con 300 μl de anticuerpo de revelación 8C8C5, acoplado a la biotina, diluido a 1 μg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).

3. Las muestras de suero, de plasma o de heces (100 μl) se diluyeron directamente en el segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra.

4. La reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómata Vidas® y del protocolo HBS AG ULTRA.

5. Los resultados se han obtenido en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo (lectura del sustrato antes de la reacción).

La concentración del marcador tumoral presente en el fluido corporal a ensayar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado según el modo de realización descrito en el párrafo 2, que se refiere a la valoración del LEI.

Las dosis obtenidas para los pacientes analizados se detallan en la figura 8. Los 2 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal ensayados muestran un claro aumento de su dosis de Plastina-I sérica.

10. Valoración sérica de los marcadores tumorales del Grupo B

Los marcadores tumorales Beta2 Microglobulina, ACE, CA19-9 y Testosterona se han ensayado con la ayuda de los equipamientos de ensayo de la solicitante, respectivamente Vidas® β2 Microglobulina, Vidas® ACE, Vidas® CA19-9™ y Vidas® Testosterona, siguiendo el protocolo de realización propio a cada equipamiento.

La proteína E-Cadherina se ha ensayado con la ayuda del kit E-Cadherina EIA kit (Takara Biochemicals, Tokyo, Japon) siguiendo el protocolo de realización del kit.

La proteína 3 alfa derivada del islote regenerador, denominada de otra forma Proteína Asociada a la Pancreatitis (PAP1), se ha ensayado con la ayuda del kit ELISA PANCREPAP (DynaBio, Marsella, Francia) siguiendo el protocolo de realización del kit.

Las proteínas Galectina-3 y LDH se han ensayado con la ayuda de los anticuerpos descritos en el ejemplo 2. El Proteasoma 20 S se ha ensayado con la ayuda de los anticuerpos descritos en la patente EP0434670. Para hacer esto, los ensayos ELISA se han construido utilizando el autómata Vidas® (bioMérieux) y los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Los reactivos se han utilizado tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

1. Los conos se han sensibilizados con el anticuerpo de captura a una concentración de entre 5 y 30 μg/ml.

2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido por 300 μl de anticuerpos de revelación, acoplado a la biotina, diluido a 1 μg/ml en un tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l.

3. Las muestras de suero, de plasma o de heces se diluyeron directamente en el segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra después, si es necesario, una dilución en tampón del segundo pocillo.

4. La reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómata Vidas® y del protocolo HBS Ag Ultra. La etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación estaba comprendida entre 14 y 100 ciclos.

5. Los resultados se han obtenido en forma de valores brutos después de la sustracción del ruido de fondo (lectura del sustrato antes de la reacción).

La concentración del marcador tumoral presente en el fluido corporal a ensayar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado según el modo de realización descrito en el párrafo 2, que se refiere a la valoración de LEI. Las condiciones de ensayo para diferentes marcadores tumorales se han recogido en la Tabla 7.

Tabla 7

Proteína	Galectina-3	LDH-B	Proteasoma 20 S
Anticuerpo de captura	12F8A12 a 15 μg/ml	3F11E11 a 10 μg/ml	GD6 a 30 μg/ml
Anticuerpo de revelación	14A5G1	12F10G8	7A11
Suero de cabra en el tampón de dilución	Con	Con	Sin
Volumen de heces	50 μl	50 μl	200μl
Volumen de suero	50 μl	50 μl	100 μl
Depósito de muestra	2º pocillo	2º pocillo	1º pocillo
Duración de la incubación	100 ciclos	14 ciclos	14 ciclos

Las dosis obtenidas para los pacientes analizados con los marcadores tumorales Beta2 Microglobulina, ACE, CA19-9, Testosterona, E-Cadherina, proteína 3 alfa derivada del islote regenerador, Galectina-3, LDH y Proteasoma 20S se han detallado respectivamente en las figuras 9 a 17.

Tres sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal muestran un aumento de su dosis de β2-Microglobulina sérica.

Diez sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal muestran un aumento de su dosis de ACE sérica. Más claramente, 1 suero de paciente que padece cáncer colorrectal de fase III y 7 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV muestran una elevación importante de su dosis de ACE sérica.

Nueve sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal muestran un aumento de su dosis de CA 19-9 sérica. Más claramente, 1 suero de paciente que padece cáncer colorrectal de fase III y 7 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV muestran una elevación importante de su dosis de CA 19-9 sérica.

Diez sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal muestran una disminución de su dosis de Testosterona sérica. Más claramente, 1 suero de paciente que padece cáncer colorrectal de fase II, 1 suero de paciente que

padece cáncer colorrectal de fase III y 2 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV muestran una caída de su dosis de Testosterona sérica.

Dos sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal muestran un aumento de su dosis de proteína 3 alfa derivada del islote regenerador sérico.

Cuatro sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase IV, 2 sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal de fase III y 1 suero de paciente que padecen cáncer colorrectal de fase II muestran un claro aumento de su dosis de Galectina-3 sérica.

Ejemplo 4: Utilización de las valoraciones séricas de los marcadores tumorales en combinación

La solicitante ha mostrado en el ejemplo 3 que unas dosis anormalmente elevadas o anormalmente bajas de marcadores tumorales se podían observar en la circulación sanguínea de algunos pacientes que padecen cáncer colorrectal. De manera sorprendente, el aumento o la disminución de la dosis sanguínea de dos marcadores dados no es observado sistemáticamente en los mismos pacientes. Así, la combinación de varios marcadores tumorales permite aumentar el número de pacientes identificados como que padecen cáncer colorrectal. Es así que un paciente A puede presentar un aumento o una disminución de uno o más marcadores tumorales (grupo X), pudiendo dichos marcadores del grupo X ser normales en un paciente B; en este mismo paciente B uno u otros diversos marcadores tumorales (grupo Y) pueden ser elevados o disminuidos, pudiendo dichos marcadores del grupo Y ser normales en el paciente A.

Los diferentes marcadores tumorales ensayados por la solicitante pueden así ser combinados mediante diversos algoritmos matemáticos bien conocidos por el experto en la materia. A título de ilustración y sin que este ejemplo tenga un carácter exhaustivo, se ha realizado el procedimiento siguiente:

1. Se ha fijado un valor límite para cada marcador tumoral.

2. Cuando la prueba sanguínea del marcador tumoral aumentaba en caso de cáncer colorrectal, la dosis sanguínea obtenida para un paciente dado se dividía por su valor límite. Cuando la dosis sanguínea del marcador tumoral disminuía en caso de cáncer colorrectal, la dosis sanguínea obtenida para un paciente dado se invertía y después se multiplicaba por su valor límite.

3. Cuando la relación dosis sanguínea dividida por valor límite era superior a 1, la relación se multiplicaba por un coeficiente, por ejemplo 10. El valor así obtenido se bautizó "resultado" para el paciente estudiado del marcador tumoral considerado.

4. Los resultados obtenidos para diferentes marcadores tumorales se añadieron ponderándolos de un factor propio a cada marcador. En el caso del ejemplo siguiente, todos los factores de ponderación se han fijado en 1.

5. La suma de los resultados se ha dividido por el número total de resultados sumados y el valor así obtenido se ha bautizado "resultado total".

6. El paciente se diagnostica como que padece un cáncer colorrectal cuando su resultado total aumentaba con respecto a un resultado límite.

Los resultados totales para una selección de 2, 4, y 8 marcadores que comprenden apolipoproteína AI se dan en la tabla 8.

La asociación de los marcadores tumorales apolipoproteína AI y galectina-3 permite así obtener para el mismo grupo de 13 pacientes unos resultados totales «2» aumentados en 9 pacientes que padecen cáncer colorrectal, mientras que la valoración sólo de apolipoproteína AI o galectina-3 se disminuía o aumentada respectivamente en 6 y 5 pacientes solamente. Conforme a las enseñanzas del ejemplo 3, el marcador apolipoproteína AI se disminuía en el caso de cáncer colorrectal y el marcador galectina-3 se aumentaba en caso de cáncer colorrectal.

La asociación de los marcadores tumorales apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, E-cadherina y galectina-3 permite así obtener para el mismo grupo de 13 pacientes unos resultados totales de «4» aumentos en 10 pacientes que padecen cáncer colorrectal, mientras que la valoración sólo de apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, E-cadherina o galectina-3 se disminuía o aumentada respectivamente en 6, 7, 1 y 5 pacientes solamente. Conforme a las enseñanzas del ejemplo 3, los marcadores apolipoproteína AI y apolipoproteína AII se disminuían en caso de cáncer colorrectal y los marcadores E-cadherina y galectina-3 se aumentaban en caso de cáncer colorrectal.

La asociación de los marcadores tumorales apolipoproteína AI, apolipoproteína AI, testosterona, LEI, LDH-B, L-FABP E-cadherina y galectina-3 permite así obtener, para el mismo grupo de 13 pacientes que padecen cáncer colorrectal, unos resultados totales de «8» aumentos en 11 pacientes mientras que la valoración sólo de apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, testosterona, LEI, LDH-B, L-FABP, E-cadherina o galectina-3 era disminuída

o aumentada respectivamente en 6, 7, 4, 3, 1, 6, 1 y 5 pacientes solamente. Conforme a las enseñanzas del ejemplo 3, los marcadores apolipoproteína AI, testosterona y apolipoproteína AII se disminuían en caso de cáncer colorrectal y los marcadores LEI, LDH-B, L-FABP, E-cadherina o galectina-3 se aumentaban en caso de cáncer colorrectal.

Tabla 8

Patología	Identificador de la muestra	Fase	TNM	Apo AI µg/ml	Resultado total 2[a]	Resultado total 4[b]	Resultado total 8[c]
CCR+	CLSP076/F0	II	T3N0M0	886,00	0,51	0,51	16,09
CCR+	CBSE021/F0	IV	T4N2M1	703	10,63	9,07	14,20
CCR+	CBSE026/F0	IV	T4N1M1	610	12,93	15,66	66,80
CCR+	CLSP074/F0	III	T3N2M0	815	0,47	2,97	3,96
CCR+	CLSP076/F0	II	T3N0M0	886	5,60	3,09	12,24
CCR+	CLSP078/F0	III	T3N1M0	863	7,62	6,75	39,48
CCR+	CLSP095/F0	IV	T3N1M1	957	0,40	0,45	0,60
CCR+	CLSP133/F0	II	T3N0M0	718	5,36	2,88	3,84
CCR+	CLSP136/F0	II	T3N0M0	679	5,66	7,01	9,34
CCR+	CLSP161/F0	IV	T3N2M1	683	5,63	7,35	9,80
CCR+	GHBD015/F0	I	TisN0M0	747	5,15	5,28	7,03
CCR+	GHBD016/F0	II	T3N0M0	1225	0,31	0,32	0,43
CCR+	GHBD020/F0	II	T3N0M0	916	9,63	5,15	12,60
CCR -	N017197/F0			1303	0,68	0,45	0,61
CCR -	N017218/F0			1360	0,28	0,28	0,38
CCR -	N017365/F0			1413	0,27	0,30	0,39
CCR -	N018544/F0			1190	0,32	0,36	0,48
CCR -	N314199/F0			1060	0,58	0,72	0,59
CCR -	N370510/F0			769	1,00	0,92	0,79
CCR -	N370537/F0			1199	0,32	0,37	0,49
CCR -	N376912/F0			1089	0,35	0,39	0,53
CCR -	N440216/F0			973	0,40	0,45	0,60
CCR -	N440478/F0			1334	0,29	0,30	0,40
CCR -	N527135/F0			1271	0,30	0,33	0,44
CCR -	N527450/F0			1037	0,37	0,35	0,46
CCR -	N593116/F0			1333	0,29	0,32	0,43
CCR -	N593183/F0			1111	0,35	0,38	0,50
CCR -	N744056/F0			1220	0,32	0,47	0,47
CCR -	N748022/F0			1675	0,23	0,23	0,31
CCR -	N862300/F0			959	0,40	0,40	0,53
Límite				769,00	1,00	0,92	0,79

a: asociación apolipoproteína AI y galectina-3

b: asociación apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, E-cadherina y galectina-3

c: asociación apolipoproteína AI, apolipoproteína AII, testosterona, LEI, LDH-B, L-FABP, E-caderina y galectina-3

Ejemplo 5: Valoración de los marcadores tumorales en las heces

La extracción de las heces se realiza a partir de un trozo que pesa aproximadamente 1g, al que se añade 10 ml de tampón fosfato de sodio 100 mM, pH 7,2 que contiene 1 g/l de azida. Se homogeniza en un Vortex durante 1 min. La muestra sufre después 4 ciclos de ultrasonidos de 7s en hielo. La fracción no solubilizada se elimina por centrifugación a 2000 g, durante 10 minutos, a 4ºC. El sobrenadante se conserva a -30ºC hasta la valoración.

Los ensayos ELISA descritos en el ejemplo 3 se han utilizado para buscar los marcadores tumorales en las heces después, si es necesario, de una dilución adaptada de las heces en el tampón del primer pocillo del cartucho HBs Ag Ultra.

Las valoraciones obtenidas con los ensayos, Aminoacilasa 1, Galectina-3 y Proteasoma 20S se han representado respectivamente en las figuras 18 a 20. Un aumento de la dosis de Aminoacilasa 1, de Galectina-3 y de Proteasoma 20S se observa respectivamente para 10, 14 y 8 heces de pacientes que padecen cáncer colorrectal.

Ejemplo 6: Detección mediante la técnica de ELISPOT de los marcadores tumorales

1. Cultivo celular

La línea de cáncer de próstata LnCAP se cultiva en el medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM L-Glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM piruvato sódico y un 10% SVF (todos de Gibco). Estas células son utilizadas como control negativo.

La línea de cáncer colorrectal Caco-2 se cultiva en el medio DMEM que contiene 2 mM de L-Glutamina, sin SVF (todos de Gibco).

La línea de cáncer colorrectal HT-29 se cultiva en el medio MEM que contiene 2 mM de L-Glutamina y un 10% SVF (todos de Gibco).

La línea de cáncer colorrectal HT-29/B6 se cultiva en el medio DMEM que contiene 4 mM de L-Glutamina, sin SVF (todos de Gibco).

Les células se mantienen a 37ºC, en una estufa con un 5% de CO_2.

2. Técnica ELISPOT

Este modo de realización permite determinar el número de células que segregan la proteína. Las placas de ELISPOT de 96 pocillos con unas membranas de PVDF (Multiscreen IP, Millipore) se recubren con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-marcador tumoral a 10μg/ml (anticuerpo de captura, véase la Tabla 9 siguiente que da los anticuerpos utilizados en ELISPOT), 100 μl por pocillo, en PBS estéril, durante una noche a +4ºC. Después, se lavan las placas con PBS y se saturan con un medio de cultivo que contiene un 10% de SVF. Paralelamente, las células son tripsinadas, contadas, y después diluidas a 10^5 células/ml. Se distribuyen 200 μl de esta suspensión celular por pocillo, así como unas diluciones en cascada de esta solución madre. Las placas se incuban entonces durante 20h a 37ºC en atmósfera húmeda al 5% de CO_2, después se lavan con PBS que contiene 0,05% de Tween-20. Las células restantes son entonces lisadas mediante un tratamiento con agua helada durante 10 minutos, después se lavan de nuevo las placas. Se añade después el anticuerpo de revelación, el monoclonal biotinilado dirigido contra el marcador tumoral a ensayar (Tabla 9), a 0,1μg/pocillo (incubación de 2h a temperatura ambiente). Los puntos son revelados por la adición de extravidina-fosfatasa alcalina (Sigma) y un sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/azul de nitro-tetrazolio (BCIP/NBT, Biorad). El ruido de fondo corresponde al número de puntos medido en los pocillos LnCap y varía entre 0 y 8 puntos en las condiciones de lectura utilizadas. El número medio de puntos no específicos se ha sustraído de la señal específica.

Tabla 9

Marcador	Ac de captura	Ac de detección
LEI	10E1H1	21B10A5
Ezrina	4A9H5	4A7A6C1
Galectina-3	12F8A12	14A5G1

3. Resultados

El número de células Caco-2, HT-29 y HT-29 B6 que segregan el marcador tumoral de interés por 1 millón de células incubadas se presenta en la figura 21. La técnica ELISPOT permite confirmar la liberación o la secreción de los marcadores tumorales por las líneas de cáncer de colon. Será posible efectuar una búsqueda de células tumorales circulantes en los pacientes utilizando esta técnica, según el procedimiento de la solicitud de patente WO03/076942 depositada por la solicitante.

Ejemplo 7: Detección de los marcadores tumorales a partir de tejidos cólicos por inmunohistoquímica

1. Metodología

En primer lugar, se desparafinan de las láminas de microarray de tejido. Para ello, se incuban sucesivamente en los baños siguientes durante 10 minutos: meticiclohexano (2 veces), etanol al 100%, etanol al 95%, etanol al 70% y agua. Las láminas son después aclaradas con TBS 0,1% Tween 20 (TBS-T), durante 10 min, bajo agitación. Los antígenos se reactivan en el tampón citrato 10 mM pH6, calentando hasta 90ºC durante 40 min, después dejando enfriarse hasta temperatura ambiente durante 30 min. Las peroxidasas endógenas se inhiben por incubación en TBS-T que contiene un 3% de H_2O_2, durante 5 min. Las láminas se saturan después mediante un 3% de BSA en TBS-T, durante 1h a 37ºC, en cámara húmeda.

Después, se incuban las láminas durante 2h con el anticuerpo primario anti-Inhibidor de la elastasa de leucocitos (clon 3D9C2), anti-Ezrina (clon 5G2D12), anti-Aminoacilasa 1 (clon 8A8A10) o anti-Plastina-I (clon 8D6A3) diluido a 10μg/ml en TBS-T que contiene un 3% de BSA (incubación a 37ºC en cámara húmeda). Después de 3 lavados de 10 minutos en TBS-T, las láminas se incuban durante 2h a 37 C en cámara húmeda con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a la peroxidasa de rábano picante (Cat. nº 115-035-003 Jackson Immunoresearch) diluido al

1/400 en la solución de saturación. Las láminas se lavan 3 veces durante 10 minutos en TBS-T, después de nuevo 3 veces durante 10 minutos en PBS. La revelación se realiza con el sustrato Sigma Fast (Cat. nº D-4168, Sigma-Aldrich) durante 5 min. La coloración se detiene por lavado en PBS. Se efectúa una contra-coloración con hematoxilina de Harris (Cat. nº MHS16, Sigma-Aldrich) durante 30 s. Después del lavado con agua y PBS, se montan las láminas para la observación en microscopio.

Los anticuerpos utilizados para el marcado por inmunohistoquímica se han seleccionado específicamente para esta aplicación, independientemente de su actividad en ELISA o en transferencia Western.

2. Detección del Inhibidor de la Elastasa de los leucocitos por inmunohistoquímica

Se han utilizado unas láminas de microarray de tejido para cribar un gran número de muestras. Se trata de tejidos cólicos punteados sobre láminas. Las características de los pacientes (características de los puntos de tejido cólico presentes en el array de tejido de cancer colorrectal), así como los resultados de los inmunomarcados por el anticuerpo anti-Inhibidor de la Elastasa de los leucocitos se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10

Diagnóstico	Histología y caracterización genética	Marcado en las células epiteliales	Marcado en el estroma
Tumor maligno	Adenocarnicoma conservado	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma conservado	Positivo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Tumor benigno	Adenoma	Negativo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma conservado	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma LOH	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma LOH	Positivo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma LOH	Negativo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma LOH	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma MSI alta	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma MSI alta	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma Coloide	Negativo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarnicoma Coloide	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo
Normal	Mucosa normal	Negativo	Negativo

Los resultados en la tabla ponen en evidencia que, en las biopsias de mucosas cólicas sanas, no hay marcado (10 negativos). El marcado es asimismo negativo en el adenoma (1/1). El marcado es positivo en las células epiteliales de las adenocarnicomas cólicas (+ en 8/11 pacientes). No hay marcado en el estroma.

3. Detección de Ezrina por inmunohistoquímica

Se han utilizado unas láminas de microarray de tejido para cribar un gran número de muestras. Se trata de tejidos cólicos punteados sobre láminas. Para cada paciente con un adenocarnicoma cólico, se han efectuado 3 extracciones en el centro del tumor, 3 extracciones a nivel del frente de invasión y 3 extracciones en el tejido sano. La Tabla 11 presenta los resultados de los inmunomarcados por el anticuerpo anti-Ezrina, el nivel de marcado indicado es el máximo de intensidad sobre las 3 muestras analizadas.

Tabla 11

Identificador del paciente	Centro del tumor	Frente de invasión tumoral	Tejido sano
55	+	++	0
127	+	+	0
329	+	++	+
475	+	++	+

544	+	++	+
726	+	+	+
1203	++	++	+
1310	++	+++	+
2003	+	0	+
2296	++	++	0
2301	+	++	+
2377	+	+	0
3095	+	+	0
3430	+	+	0
3636	+	+	0
3748	+	+	0
3839	+	++	0
3891	0	0	0
4054	+	+	0
4322	+	++	0
445	0	++	+
4474	++	++	0
4792	+	+	+
4958	++	++	+
5101	+	++	+
5318	++	+++	0
5374	+	+	0
5472	+	0	+
6340	++	+	0
6353	++	+	0

En un muestreo de 30 pacientes, 25 tienen una sobreexpresión de Ezrina a nivel tumoral (centro del tumor o frente de invasión) con respecto al tejido sano adyacente.

4. Detección de la Aminoacilasa-1 por inmunohistoquímica

Se han utilizado unas láminas de microarray de tejido para cribar un gran número de muestras. Se trata de tejidos cólicos punteados sobre láminas. Para cada paciente con una adenocarnicoma cólico se han efectuado 3 extracciones en el centro del tumor, 3 extracciones a nivel del frente de invasión y 3 extracciones en el tejido sano. La Tabla 12 presenta los resultados de los inmunomarcados por el anticuerpo anti-Aminociclasa, el nivel de marcado indicado es el máximo de intensidad sobre las 3 muestras analizadas.

Tabla 12

Identificador del paciente	Centro del tumor	Frente de la invasión tumoral	Tejido sano
55	++	++	0
127	0	0	0
329	++	++	0
475	++	++	+
544	+	0	0
726	0	0	0
1203	0	+	0
1310	0	+	+
2003	++	0	0
2296	+	+	0
2301	+	+	+
2377	+	+	+
3095	+	+	0
3430	+	+	+
3636	++	+	+
3748	++	++	0
3839	++	++	+

Identificador del paciente	Centro del tumor	Frente de la invasión tumoral	Tejido sano
3891	++	++	0
4054	+	++	0
4322	+++	+++	+
445	+	++	+
4474	+	++	+
4792	++	++	+
4958	+	+	+
5101	+	+	++
5318	+++	++	0
5374	+	+	0
5472	++	++	+
6340	++	++	+
6353	++	++	++

En un muestreo de 30 pacientes, 21 tienen una sobreexpresión de la Aminoacilasa a nivel tumoral (centro del tumor o frente de invasión) con respecto al tejido sano adyacente.

5. Detección de la Plastina-I por inmunohistoquímica

Se han utilizado unas láminas de microarray de tejido para cribar un gran número de muestras. Se trata de tejidos cólicos y rectales punteados sobre las láminas. Las características de los pacientes (características de los puntos del tejido cólico presentes en el microarray de tejido de cáncer colorrectal), así como los resultados de los inmunomarcados por el anticuerpo anti-Plastina-I se recogen en la Tabla 13.

Tabla 13

Diagnóstico	Histología y caracterización genética	Marcado en las células epiteliales	Marcado en el estroma
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma conservado	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma conservado	++	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Tumor benigno de colon	Adenoma	+	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma conservado	+	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma MSI alto	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Despegado
Colon normal	Mucosa normal	+	Despegado
Tumor maligno de colon	Adenocarnicoma coloide	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	++	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	++	Negativo
Recto normal	Mucosa recto normal	++	Negativo
Recto normal	Mucosa recto normal	No específico	Negativo
Recto normal	Mucosa recto normal	No específico	Negativo
Recto normal	Mucosa recto normal	No específico	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarnicoma LOH	+	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarnicoma LOH	++	Negativo

Diagnóstico	Histología y caracterización genética	Marcado en las células epiteliales	Marcado en el estroma
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	++	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	++	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	+	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	+	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	+	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	+	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	++	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	++	Negativo
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	++	Negativo

Los resultados en la tabla muestran que:

- en las biopsias de mucosas cólicas sanas, el marcado es bajo en 8 extracciones (+) y 2 extracciones son a ++. El marcado es también bajo a + en el adenoma cólico (1/1). El marcado es positivo fuerte ++ en las células epiteliales de los adenocarnicomas cólicos (++ en 6/9 pacientes y 3 bajos +, incluyendo los adenocarnicomas coloides cólicos). No hay ningún marcado en el estroma.

- en las biopsias de mucosas rectales sanas, el marcado está presente a nivel del epitelio de superficie de manera no específica (3/4) y a ++ en una extracción. El marcado es positivo fuerte a ++ en los adenomas rectales (5/9) o discreto a + (4/9). El marcado es asimismo fuerte ++ en las células epiteliales de los adenocarnicomas rectales (++ en 3/4 pacientes, 1 bajo +). No hay ningún marcado en el estroma.

Ejemplo 8: Detección de los marcadores tumorales mediante la técnica LC-MRM-MS

1. Metodología

A fin de poder bajar el límite de detección a algunos ng/ml, se ha realizado un procedimiento mejorado de MRM-MS. Las etapas sucesivas de este procedimiento son: 1) inmunodepleción de las proteínas abundantes, 2) digestión trípsica, 3) fraccionamiento SPE (extracción de la fase sólida) de los péptidos, 4) cromatografía líquida (LC) acoplada a la MRM-MS.

La puesta a punto se ha realizado en muestras sobrecargadas (spike) añadiendo las proteínas recombinantes ACY, ezrina, L-FABP, PDI o plastina I en un grupo de suero control, a una concentración de 10-250 ng/ml. Las apolipoproteínas A1 y A2 están naturalmente presentes en el suero.

Inmunodepleción. La depleción de las proteínas abundantes del suero se ha realizado utilizando el kit comercial Vivapure anti-HSA de Vivascience. Alternativamente, el kit Proteoextract Albumin/IgG de Calbiochem y el Aurum™ serum Protein Minikit de Bio-Rad también se han utilizado. Es asimismo posible producir las resinas específicas en laboratorio, acoplando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína a depletar en una resina sefarosa 4B activada con CNBr (Amersham Bioscience), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Digestión enzimática. Las muestras de sueros depletados son desnaturalizadas en una solución de urea 6M tamponada por 10 mM de Tris pH 8 y que contiene 30 mM de ditriotreitol, durante 40 minutos a 40ºC, después se alquila con yodoacetamida 50 mM, a temperatura ambiente, durante 40 minutos, en la oscuridad. Se diluyen 6 veces en agua, después se realiza la digestión trípsica a 37ºC, durante una noche, utilizando una relación enzima sustrato de 1:30 (Promega). La digestión se detiene por adición de ácido fórmico a una concentración final del 0,5%. Las muestras digeridas se desalan por extracción en fase sólida ((SPE, extracción de la fase sólida) utilizando los cartuchos en fase inversa Oasis HLB 3cc (60 mg)(Waters). Después de la aplicación de la muestra, los cartuchos se lavan mediante 1 ml de ácido fórmico al 0,1%, después se realiza la elución mediante una mezcla metanol/agua (80/20 v/v) que contiene un 0,1% de ácido fórmico. Los eluatos son secados a vacío.

Fraccionamiento SPE. Las muestras secas se recogen en 1 ml de tampón acetato y se cargan sobre los cartuchos mixtos (hidrófobo e intercambio de catión) Oasis MCX (cambio de catión mezclado) 60 mg (Waters) equilibradas previamente en tampón acetato y metanol. Los cartuchos se lavan por 1 ml de tampón acetato y 1 ml de metanol. Los péptidos de interés (tabla 14) se eluyen por 1 ml de una mezcla metanol/tampón acetato (50/50 v/v). El pH del tampón acetato se selecciona en función del punto isoeléctrico del péptido de interés. Los eluatos se secan a vacío, se disuelven en 200 μl de una solución de acetonitrilo/agua (3/97 v/v) que contiene un 0,1% de ácido fórmico. Se ha inyectado una parte alícuota de 50 μl en la LC acoplada a un sistema MS-MS.

Cromatografía líquida y espectrometría de masas. El análisis LC-MS se ha efectuado en un sistema cromatográfico de alta presión (HPLC) de tipo HP 1100 series con bomba binaria e inyector (Agilent Technologies) acoplado a un

espectrómetro de masas, o bien un Sciex API 2000 de tripo cuadrupolo, o bien un Sciex API 4000 Qtrap (MS híbrido de triple cuadrupolo - trampilla iónica) (MDS Sciex) para una mejor sensibilidad. La separación LC se ha efectuado en una columna C_{18} Symmetry (Waters), a un caudal de elución de 300 µl/min. (Eluyente A = 0,1% de ácido fórmico en agua, eluyente B = 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo, gradiente lineal de 5%B a 50%B en 25 minutos, después 50%B a 100%B en 3 minutos). El análisis MS se realiza en modo de ionización positiva a una tensión de 5500 V aplicada con aguja que permite la ionización en la fuente. El control del instrumento y la adquisición de los datos se realizan con el programa Analyst 1.4.1. Los caudales del gas de nebulización (aire) y del gas cortina (nitrógeno) son de 30 y 20 psi, respectivamente. La fuente iónica Turbo V™ se ajusta a 400ºC, el flujo de nitrógeno auxiliar a 40 psi. Las transiciones MRM registradas para cada péptido se resumen en la tabla 14. La energía de colisión (CE), la tensión de orificio (DP, declustering potential) y la tensión en la salida de la célula de colisión (CXP, collision cell exit potential) son optimizadas para cada una de las transiciones MRM seleccionadas.

2. Resultados

Para cada marcador tumoral (proteínas de la tabla 14), la lista de las transiciones MRM teórica se ha generado utilizando el programa MIDAS (MRM-initiated Detection and Sequencing). Esta lista comprende todos los iones parentales di- o tri-cargados de los péptidos trípticos teóricos en un intervalo de masa que va de 800 a 3000 Da y todos los iones fragmentos posibles de tipo y o b. Para cada proteína, cada transición posible se ha ensayo a fin de determinar las transiciones más sensibles y más específicas. El resultado de esta selección se resume en la tabla 14. Utilizando un péptido pesado de tipo AQUA (Sigma) o también una proteína recombinante pesada que servirán de patrón de ensayo, es posible cuantificar de manera absoluta el marcador tumoral de interés en un medio biológico complejo.

Tabla 14

ApolipoproteínaA1						
Secuencia (SEQ ID N°)	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
AKPALEDLR (SEQ ID N° 16)	6,38	338,2	288,2	14	20	5
			403,2	14	15	10
			532,3	14	15	25
ATEHLSTLSEK (SEQ ID N°17)	5,53	405,9	173,1	20	20	10
			363,2	20	25	20
LSPLGEEMR (SEQ ID N°18)	4,54	516,3	201,1	20	20	5
			831,4	20	20	40
			621,3	30	30	15
QGLLPVLESFK (SEQ ID N°19)	6,11	615,9	299,2	20	30	15
			819,5	20	35	40
			186,1	20	35	5
THLAPYSDELR (SEQ ID N°20)	5,39	651,3	239,1	20	30	5
			352,2	20	35	15
			879,4	20	35	25
VQPYLDDFQK (SEQ ID N°21)	3,71	626,8	228,1	15	25	5
			1025,5	15	20	30
			513,2	15	25	25
DYVSQFEGSALGK (SEQ ID N°22) \	4,13	700,8	279,1	15	35	5
			378,2	15	20	10
			1023,5	15	20	25
			204,1	15	25	5
Apolipoproteína A2						
EQLTPLIK (SEQ ID N°23)	6,4	471,3	260,2	20	30	15
			147,1	20	30	25
			684,5	20	20	35
Aminoacilasa						
Secuencia	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
AVGVPALGFSPMNR (SEQ ID N°24)	10,35	708,4	517,3	20	30	23
			808,4	20	35	28
			228,1	20	32	7
			1089,6	20	32	32
VVNSILAFR (SEQ ID N°25)	10,35	509,8	199,1	15	25	5
			820,5	15	25	28
			506,3	15	25	20
			393,2	15	25	15
EGSVTSVNLTK (SEQ ID N°26)	6,99	567,8	248,2	15	28	7
			661,4	15	28	25

			762,4	15	28	32
GPEEEHPSVTLFR (SEQ ID N°27)	4,58	749,3	819,5	20	38	35
			956,5	20	38	30
Ezrina						
Secuencia	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
IGFPWSEIR (SEQ ID N°28)	7,04	552,8	787,2	20	27	25
			288	20	27	10
			690,1	20	27	22
			504,1	20	27	20
ELSEQIQR (SEQ ID N°29)	4,31	501,8	303,0	20	25	15
			416,2	20	25	18
			760,2	20	25	25
SGYLSSER (SEQ ID N°30)	10,1	449,7	478,2	20	25	20
			591,4	20	22	20
			391,0	20	22	15
APDFVFYAPR (SEQ ID N°31)	6,76	591,8	272,2	20	28	10
			1111,6	20	28	35
L-FABP						
Secuencia	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
AIGLPEELIQK (SEQ ID N°32)	4,54	605,8	856,5	32	29	22
			1026,58	32	30	27
			185,1	32	30	5
			242,2	32	33	5
GVSEIVQNGK (SEQ ID N°33)	6,36	515,8	658,4	28	30	35
			545,3	28	30	30
			157,1	28	30	10
			446,2	28	30	25
TVVQLEGDNK (SEQ ID N°34)	4,13	551,8	261,2	35	28	10
			675,33	35	28	34
			201,1	35	28	10
FTITAGSK (SEQ ID N°35)	9,0	412,7	576,3	23	27	30
			463,3	23	27	30
			249,1	23	27	10
PDI						
Secuencia	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
EADDIVNWLK (SEQ ID N°36)	3,74	601,8	560,3	20	27	18
			659,4	20	27	22
DHENIVIAK (SEQ ID N°37)	5,24	519,8	253,1	20	25	10
			331,2	20	25	13
			786,4	20	25	30
			657,4	20	25	25
LITLEEEMTK (SEQ ID N°38)	4,01	603,8	328,2	20	30	11
			766,3	20	30	25
			980,5	20	30	32
ENLLDFIK	4,11	496,3	407,3	20	25	16
(SEQ ID N°39)			522,3	20	25	21
			635,4	20	25	26
Plastina I						
Secuencia	pI	Q1	Q3	DP	CE	CXP
QFTPADVVSGNPK (SEQ ID N°40)	6,96	729,8	983,4	20	27	30
			1183,6	20	27	35
SLADGILLCK (SEQ ID N°41)	6,08	545,3	889,4	20	25	28
			533,4	20	25	20
			703,4	20	25	25
			818,4	20	25	28

Referencias bibliográficas

1: J.D. Potter, 1999, J Natl Cancer Inst, 91, 916-32

2: J. Faivre, 2001, Epidémiologie et dépistage du cancer colorectal, Ed. Springer

3: E.E. Niederkofler *et al.*, 2003, J Lipid Res, 44, 630-639

4: G.L. Hortin, 2006, Clinical Chemistry, 52(7), 1223-1237

5: J.Y. Engwegen *et al.*, 2006, World J Gastroenterol, 12(10), 1536-1544

6: Z. Zhang *et al.*, 2004, Cancer Research, 64, 5882-5890

7: H. Hachem *et al.*, 1986, J Chem Clin Biochem, 24, 161-166

8: E. Remold-O'Donnell *et al.*, 1992, Proc Natl Acad Sci USA, 89, 563-5639

9: J. Cooley *et al.*, 2001, Biochemistry, 15762-15770

10: M. Algrain *et al.*, 1993, J Cell Biol, 120, 129-139

11: W.G. Jiang et S. Hiscox, 1996, Anticancer Res, 16, 861-865

12: S. Hiscox et W.G. Jiang, 1999, J Cell Sci, 112, 3081-3090

13: T. Xiao et al, 2005, Mol Cell Proteomics, 4, 1480-1486

14: M. Anders et W. Dekant, 1994, Advances in Pharmacology, 431-448

15: K. Lorentz *et al.*, 1975, Clinica Chimica Acta, 263-269

16: K. Lorentz et B. Flatter, 1975, Clinica Chimica Acta, 271-274

17: R.M. Cook *et al.*, 1993, J Bio Chem, 17010-17017

18: Y.E. Miller *et al.*, 1989, J Clin Invest, 2120-2124

19: S. Balabanov *et al.*, 2001, Eur J Biochem, 5977-5980

20: E. Chan *et al.*, 1985, J Biol Chem, 260, 2629-2632

21: R. Das *et al.*, 2001, Clin Cancer Res, 7, 1706-1715

22: J. Stulik *et al.*, 2001, Electrophoresis, 22, 3019-3025

23: T. Yamazaki *et al.*, 1999, J Surg Oncol, 72, 83-87

24: D.A. Sweetser *et al.*, 1987, J Biol Chem, 266, 16060-16071

25: M. Pelsers *et al.*, 2003, Clin Biochem, 36, 529-535

26: R. Xiao, *et al.*, 2005, Molecular Cancer, 4, 1-17

27: C.S. Lin, *et al.*, 1993, J Biol Chem., 268, 2781-92

28: V. Delanote *et al.*, 2005, Acta Pharama Sinica, 769-779

29: A.P. Arrigo *et al.*, 1988, Nature, 331, 192-194

30: T. Lavabre-Bertrand *et al.*, 2001, Cancer, 92, 2493-2500

31: S. Nakahara *et al.*, 2005, Apoptosis, 10, 267-275

32: I. Iurisci *et al.*, 2000, Clin Can Res, 6, 1389-1393

33: M.K. Schwartz, 2006, Clin Chim Acta, 1992, 77-82

34: D.J. McCool *et al.*, 1999, Biochem J, 593-600

35: J.L. Iovanna *et al.*, 1994, Gastroenterology, 106, 728-734

36: Y. Motoo *et al.*, 1999, Dig Dis Sci, 44, 1142-1147

37: M. Herlyn *et al.*, 1979, Proc Natl Acad Sci USA, 76, 1438-1442

38: A. Armstrong et S. Eck, 2003, Cancer Biol Ther, 2, 320-325

39: D. Herlyn *et al.*, 1982, Proc Natl Acad Sci USA, 79, 4761-4765

40: H Abe *et al.*, 2002, J Immunol Methods, 270, 227-233

41: V. Barak *et al.*, 2004, Clin Biochem, 37, 529-540

42: H. Kim *et al.*, 2006, Ann Clin Lab Sci, 36, 294-298

43: F. Roca *et al.*, 2006, J Surg Oncol, 151-160

44: C.H. Damsky *et al.*, 1983, Cell, 455-466

45: M. Katayama *et al.*, 1994, Br J Cancer, 580-585

46: C. Willmanns *et al.*, 2004, Clin Exp Metastasis, 75-78

47: P. Gold et S. Freedman, 1965, J Exp Med, 467-481

48: M. Duffy, 2001, Clin Chem 624-630

49: Y. Kim *et al.*, 2003, Ann Clin Lab Sci, 32-38

50: J.L. Magnani *et al.*, 1983, Cancer Research, 43, 5489-5492

51: J. Holmgren *et al.*, 1984, Br Med J (Clin. Re. Ed.), 288, 1479-1482

52: T.L. Klug *et al.*, 1986, Int J Cancer, 38, 6661-669

53: P. Kuusela *et al.*, 1991, Br J Cancer, 63, 636-640

54: M. Holland *et al.*, 1993, Medicina (B. Aires), 53(2), 117-23

55: F. Model *et al.*, julio de 2006, World Congress on Gastrointestinal Cancer, «Detection of Methylated DNA in Plasma from Colorectal Cancer Patients and Controls by Real-Time PCR Analysis of Septin 9»

56: M.P. Ebert *et al.*, 2006, Gastroentrology, 131(5), 1418-1430

57: C. Bianco *et al.*, 2006, Clin Cancer Res, 12, 5158-5164

58: R. Yasumatsu *et al.*, 2006, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291, L619-L627

59: J. Chevalier *et al.*, 1997, J Histochem Cytochem, 45, 481-491

60: S. Patterson, 2000, Physiological Genomics 2, 59-65

61: L. Anderson et C.L. Hunter, 2006, Mol Cell Proteomics, 5, 573-588.

62: L.J. Kricka *et al.*, 1999, Clinical Chemistry, 45(4), 453-458

63: S. Tyagi et F.R. Kramer, 1996, Nature Biotech, 14, 303-308

64: T. F. Imperiale *et al.*, 2004, N Engl J Med, 351(26), 2704-2714

65: D.A. Ahlquist *et al.*, 2000, Gastroenterology, 119, 1219-1227

66: I. H. Wong, 2006, Methods Mol Biol, 336, 33-46

67: M. P. Ebert *et al.*, 2005, Neoplasia, 7(8), 771-778

68: C. Lofton-Day *et al.*, 2007, AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, U.S.A., Poster no LB-165, Clinical case-control study in plasma shows that the DNA methylation biomarker, Septin-9, detects 70% of stage I-III colorectal cancer patients

69: P. Métézeau *et al.*, La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique (Tome I), Eds Medsi-MacGrawhill

70: Mathieu J. *et al.* 2006. Fonctions cellulaires et métabolisme. En: (coordonnateurs: Ronot X.*et al.*). La cytométrie en flux. Tec & Doc, 255-298. ISBN 978-2-7430-0898-7

71: V. Cheynet *et al.*, 1993, Protein Expr Purif, 4(5), 367-372

72: G. Köhler y C. Milstein, 1975, Nature, 256, 495-497

73: G. Köhler y C. Milstein, 1976, Eur J Immunol, 6, 511-519

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux
<120> Procedimiento de ensayo de Apolipoproteína AI para el diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal
<130> APOAIANDCO
<150> FR07 05211
<151> 2007-07-19
<160> 41
<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 1
atggagcagc tgagctcagc aaac 24

<210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 2
ctaaggggaa gaaaatctcc ccaa 24

<210> 3
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 3
cggagcgtct cccatgagtt tctccggcaa gta 33

<210> 4
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 4
gaaatgcaga cttgtctaga tgcgcttgct gatgcgcttg aagacaatg 49

<210> 5
<211> 22
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 5
atggcagaca atttttcgct cc 22

<210> 6
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 6
ttatatcatg gtatatgaag cactgg 26

<210> 7
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 7
gcgaattctt taagaaggag atatacatat gacgagcaaa ggtccggaag aggagcaccc 60

atcg 64

<210> 8
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 8
gcaagcttca gctgtcactg ggcagggc 28

<210> 9
<211> 424
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> I-FABP
<400> 9
ggtaccgaat tccgcgtttg acagcacttg gaaggtagac cggagtgaaa actatgacaa 60

gttcatggaa aaaatgggtg ttaatatagt gaaaaggaag cttgcagctc atgacaattt 120

gaagctgaca attacacaag aaggaaataa attcacagtc aaagaatcaa gcgcttttcg 180

aaacattgaa gttgtttttg aacttggtgt cacctttaat tacaacctag cagacggaac 240

tgaactcagg gggacctgga gccttgaggg aaataaactt attggaaaat tcaaacggac 300

agacaatgga aacgaactga atactgtccg agaaattata ggtgatgaac tagtccagac 360

ttatgtgtat gaaggagtag aagccaaaag gatctttaaa aaggattcta gagtcgacga 420

gctc 424

<210> 10
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 10
atgggaattc aggagcagct gagctcagca a 31

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 11
cgataagctt aaggggaaga aaatctcccc 30

<210> 12
<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 12
gctggccatg ggcagcagcc atcatcatca tcatcacatg agtttctccg gcaagtacca 60

ac 62

<210> 13
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 13
gcacggatcc tagatgcgct tgctgatgcg cttgaagac 39

<210> 14
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 14
atgggaattc aggcagacaa tttttcgctc c 31

<210> 15
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 15
cgataagctt atatcatggt atatgaagca ctgg 34

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> péptido ApoA
<400> 16
Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg
1 5

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> péptido ApoA1
<400> 17
Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys
1 5 10

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ApoA1
<400> 18
Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg
1 5

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ApoA1
<400> 19
Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys
1 5 10

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ApoA1
<400> 20
Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ApoA1
<400> 21
Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys
1 5 10

<210> 22
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ApoA1
<400> 22
Asp Tyr Val Ser Gln Phe Glu Gly Ser Ala Leu Gly Lys
1 5 10

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ApoA2
<400> 23
Glu Gln Leu Thr Pro Leu Ile Lys
1 5

<210> 24
<211> 14
<212> PRT
<213> artificial
<220>

<223> péptido Aminoacilasa
<400> 24
Ala Val Gly Val Pro Ala Leu Gly Phe Ser Pro Met Asn Arg
1 5 10

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido aminoacilasa
<400> 25
Val Val Asn Ser Ile Leu Ala Phe Arg
1 5

<210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido aminoacilasa
<400> 26
Glu Gly Ser Val Thr Ser Val Asn Leu Thr Lys
1 5 10

<210> 27
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido aminoacilasa
<400> 27
Gly Pro Glu Glu Glu His Pro Ser Val Thr Leu Phe Arg
1 5 10

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ezrina
<400> 28
Ile Gly Phe Pro Trp Ser Glu Ile Arg
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ezrina
<400> 29
Glu Leu Ser Glu Gln Ile Gln Arg
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ezrina
<400> 30
Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Glu Arg
1 5

<210> 31
<211> 10

<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido ezrina
<400> 31
Ala Pro Asp Phe Val Phe Tyr Ala Pro Arg
1 5 10

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido L-FABP
<400> 32
Ala Ile Gly Leu Pro Glu Glu Leu Ile Gln Lys
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido L-FABP
<400> 33
Gly Val Ser Glu Ile Val Gln Asn Gly Lys
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido L-FABP
<400> 34
Thr Val Val Gln Leu Glu Gly Asp Asn Lys
1 5 10

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido L-FABP
<400> 35
Phe Thr Ile Thr Ala Gly Ser Lys
1 5

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido PDI
<400> 36
Glu Ala Asp Asp Ile Val Asn Trp Leu Lys
1 5 10

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido PDI
<400> 37
Asp His Glu Asn Ile Val Ile Ala Lys
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido PDI
<400> 38
Leu Ile Thr Leu Glu Glu Glu Met Thr Lys
1 5 10

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido PDI
<400> 39
Glu Asn Leu Leu Asp Phe Ile Lys
1 5

<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido plastina-I
<400> 40
Gln Phe Thr Pro Ala Asp Val Val Ser Gly Asn Pro Lys
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Péptido plastina-I
<400> 41
Ser Leu Ala Asp Gly Ile Leu Leu Cys Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal por valoración inmunológica del marcador apolipoproteína AI por determinación de la disminución de la concentración en dicho marcador, con respecto a los valores de referencia determinados para los sujetos sanos, en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de padecer cáncer colorrectal, estando dicha muestra distante del tumor, entendiéndose que la valoración por inmunoensayo utilizada no es la turbidimetría.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que consiste también en determinar la presencia de al menos otro marcador tumoral seleccionado entre los marcadores siguientes: Inhibidor de la elastasa de los leucocitos, Ezrina, Aminoacilasa 1, proteína de unión a los ácidos grasos intestinales, Apolipoproteína AII y Plastina-I.

3. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que consiste también en determinar la presencia de al menos otro marcador tumoral seleccionado entre los marcadores siguientes: Microglobulina Beta 2, Proteasoma 20S, galectina-3, L-Lactato deshidrogenasa de Cadena B, Calreticuina, Proteína 3 alfa derivada del islote regenerador, Transductor 1 de la señal de calcio asociado a los tumores, queratina de tipo II Citoesqueleto 8, queratina de tipo I Citoesqueleto 18, keratina de tipo I Citoesqueleto 19, Cadherina epitelial, ACE, Villina, CA 19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, testosterona, TIMP-1, Cripto-1, Intelectina-1, Proteína Disulfuro Isomerasa, Citoqueratina 20, Proteína tumoral controlada translacionalmente, (Pro)defensina-A5, la detección de ADN metilado en la sangre, preferentemente el ADN metilado del gen AXL4 o el ADN metilado del gen Septina-9, la detección de alteraciones específicas de fragmentos de ADN en las heces como unas mutaciones específicas del ADN en las heces o alteraciones específicas del perfil de metilación del ADN en las heces y la detección de hemoglobina humana en las heces.

4. Utilización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer colorrectal.

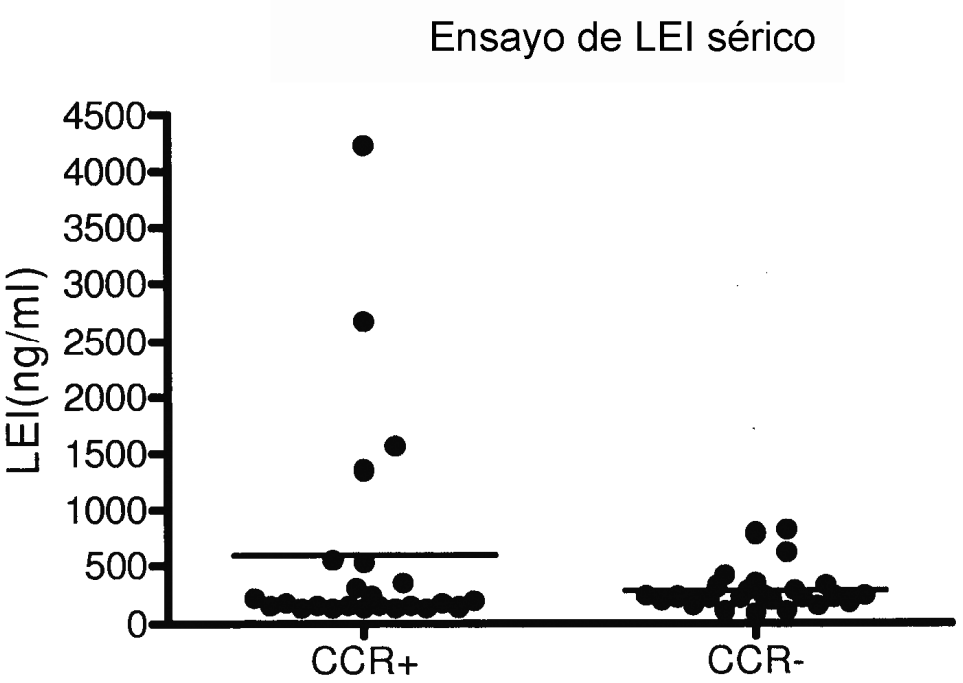


Figura 1

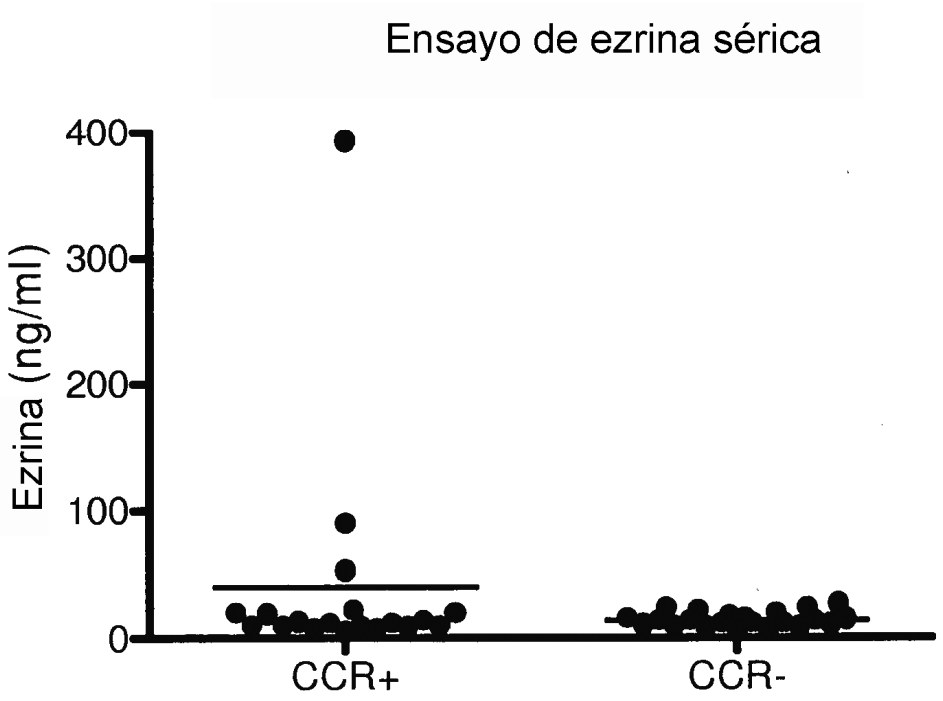


Figura 2

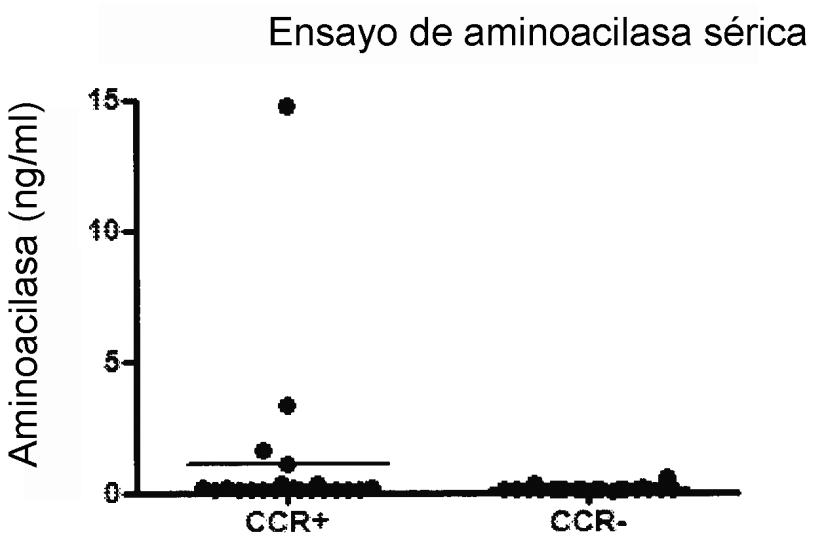


Figura 3

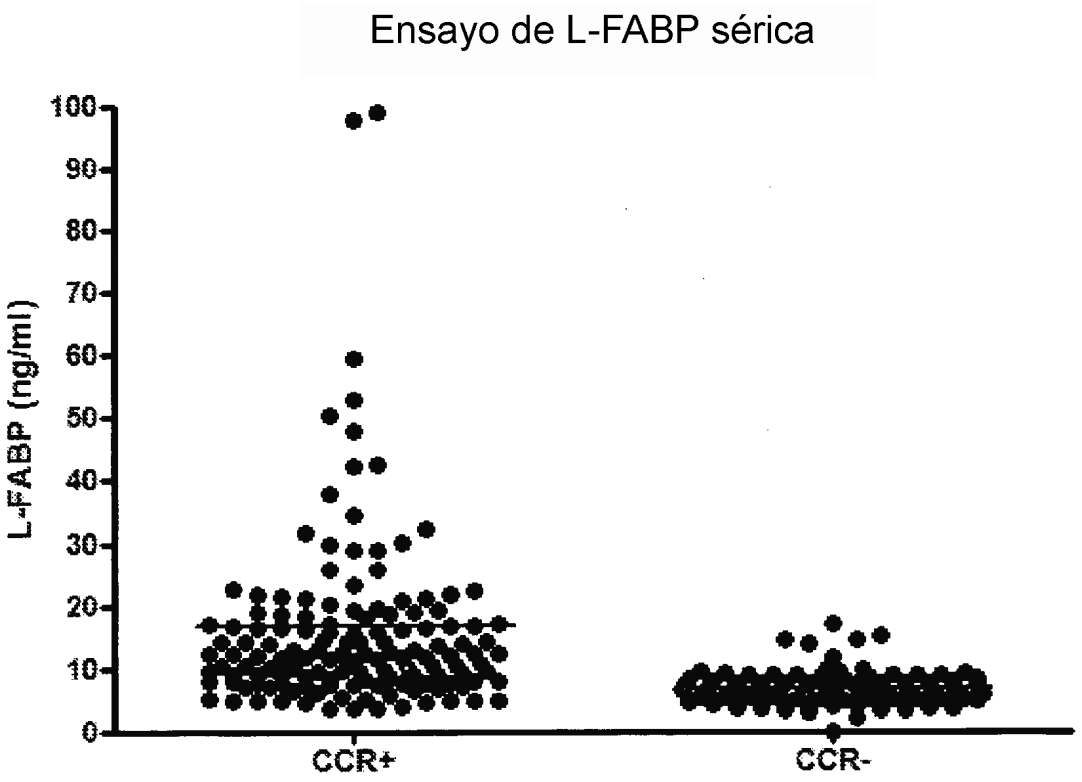


Figura 4

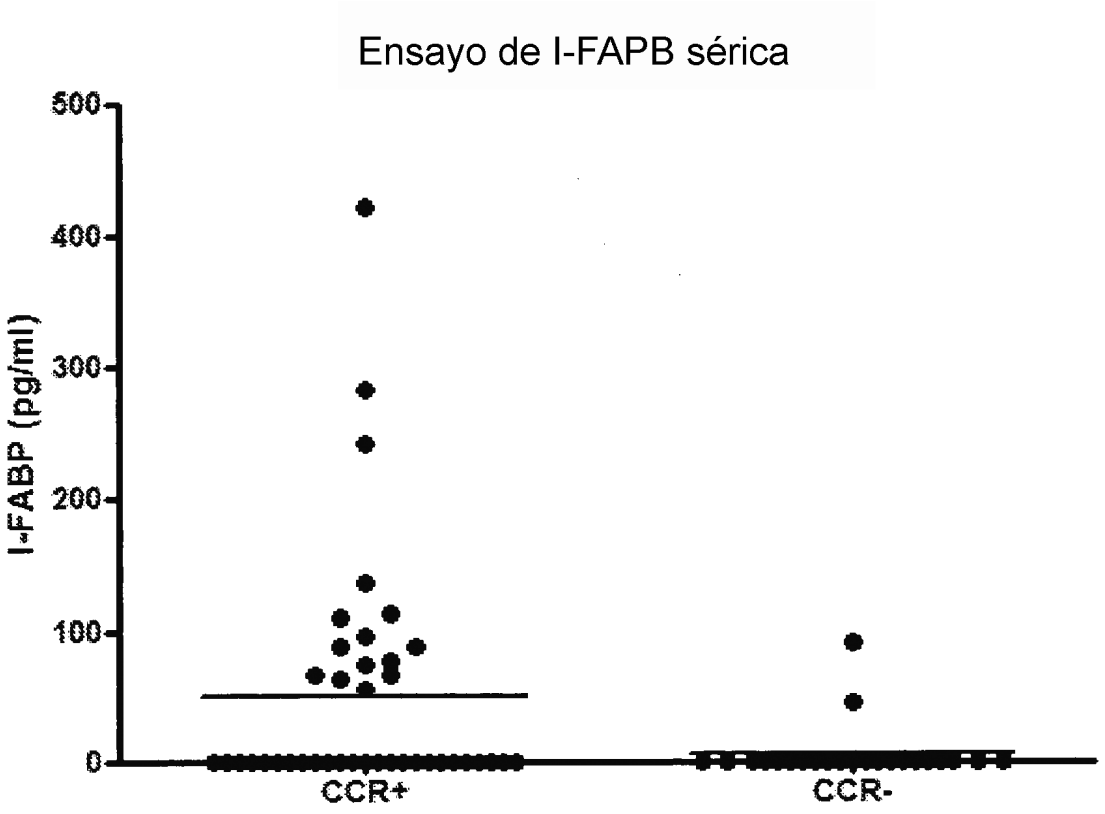
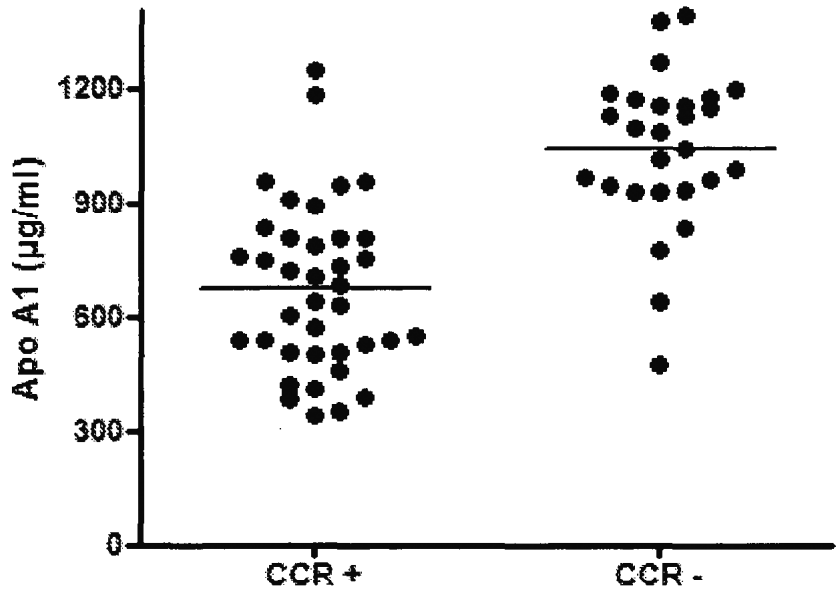

Ensayo de I-FAPB sérica
I-FABP (pg/ml)
500
400
300
200
100
0
CCR+
CCR-

Figura 5

A


Ensayo de apoproteína A1 sérica
(microplaca ELISA)
Apo A1 (µg/ml)
1200
900
600
300
0
CCR +
CCR -

B

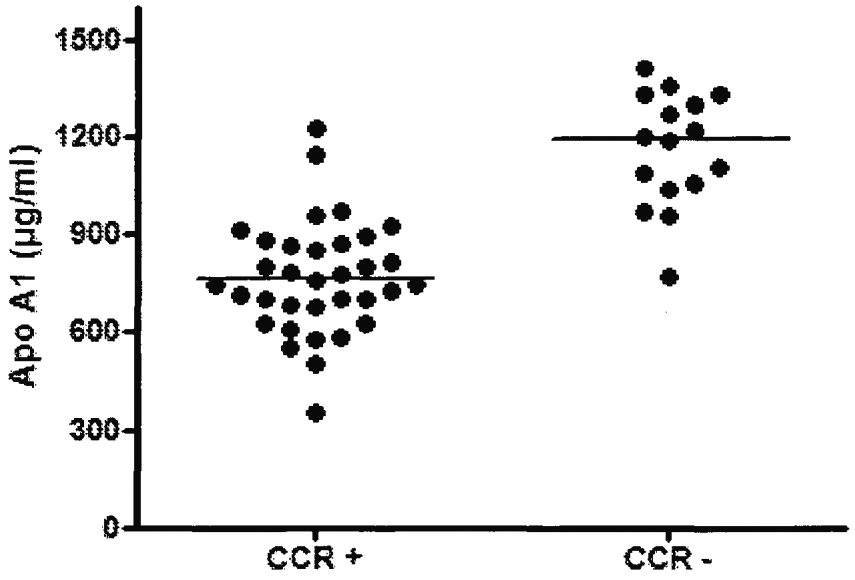

Ensayo de apoproteína A1 sérica
(kit Lincoplex)
Apo A1 (µg/ml)
1500
1200
900
600
300
0
CCR +
CCR -

Figura 6

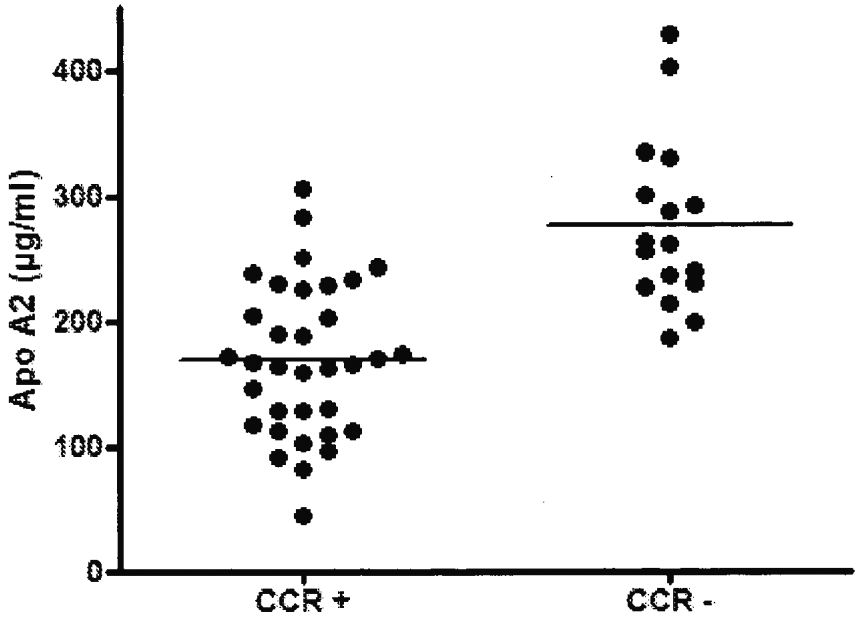


Figura 7

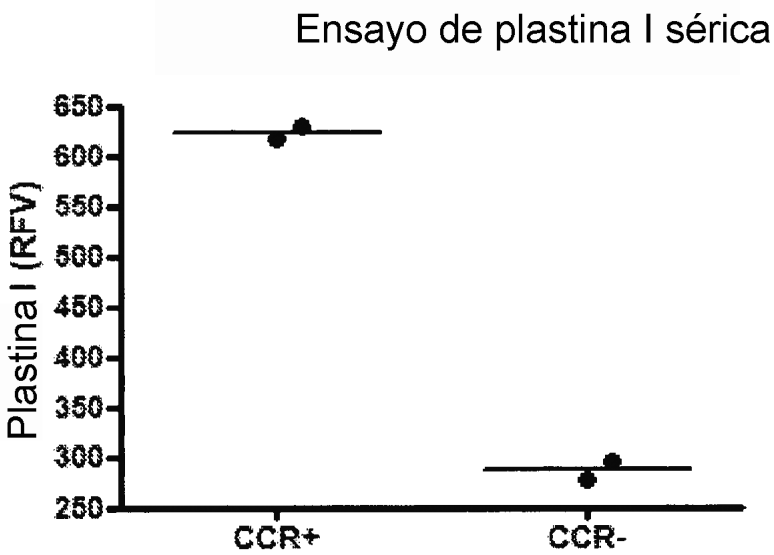


Figura 8

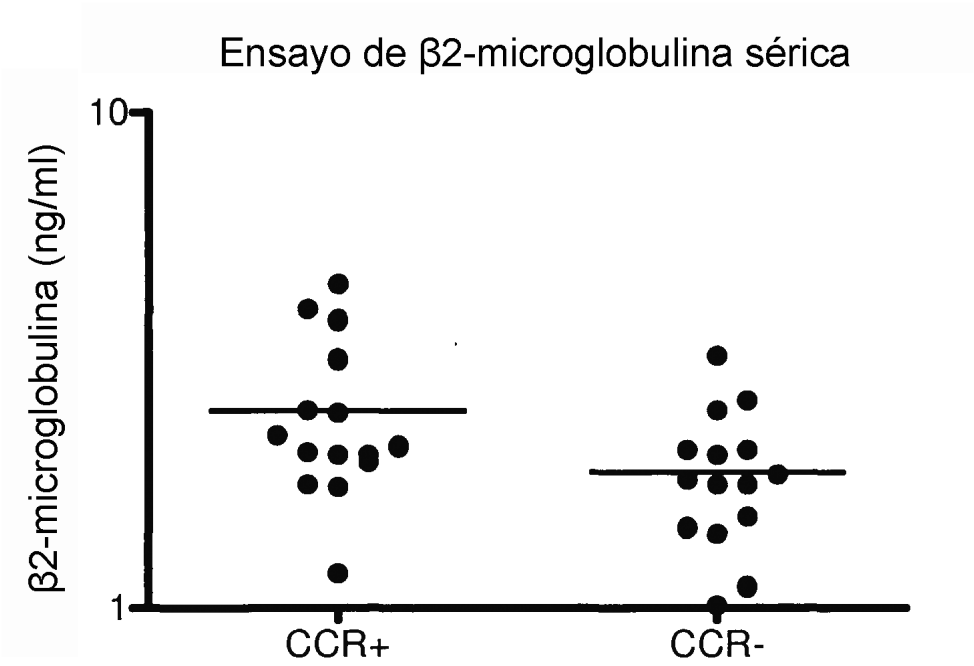


Figura 9

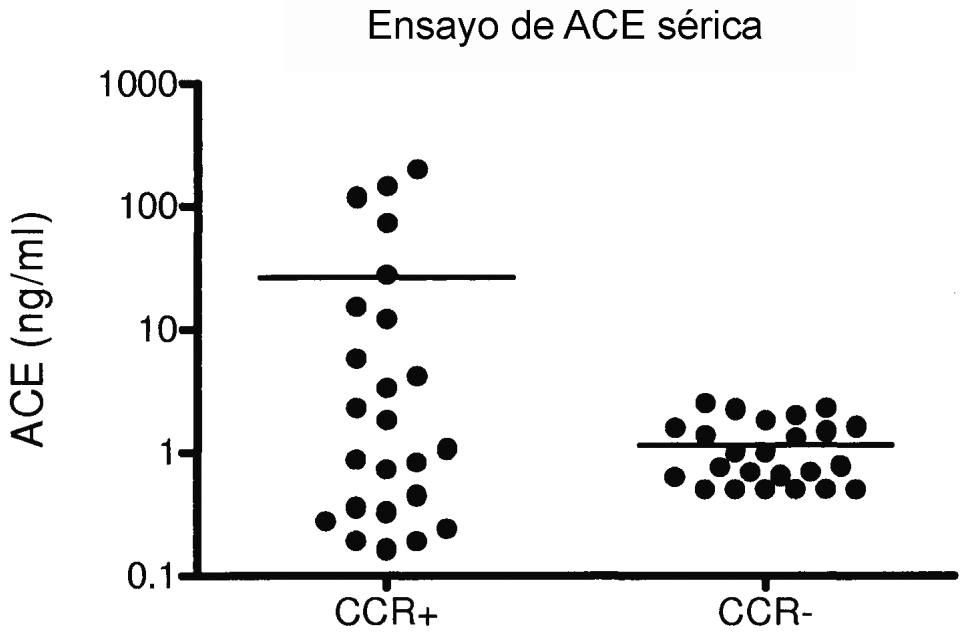


Figura 10

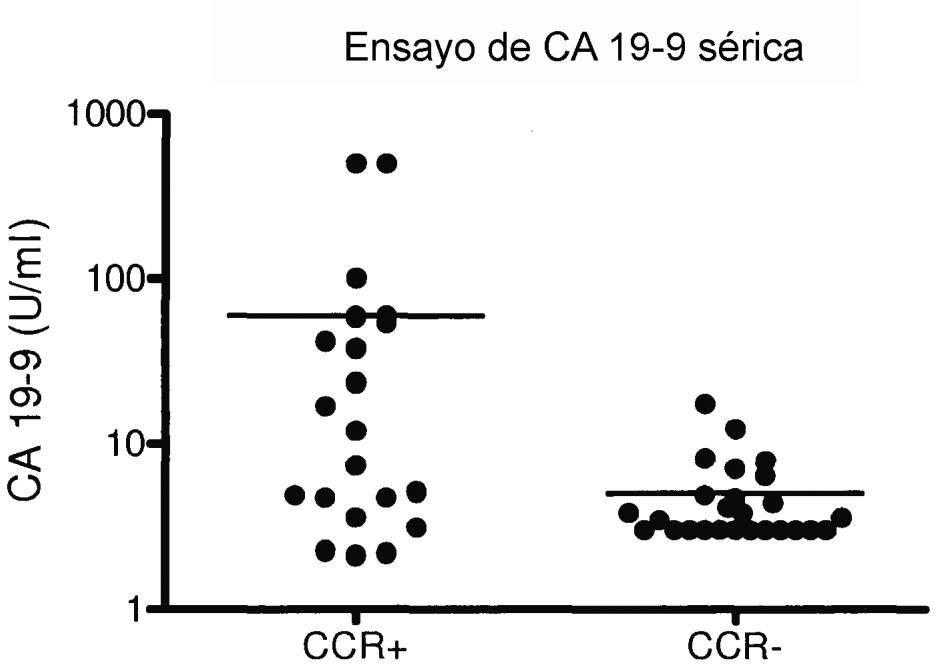


Figura 11

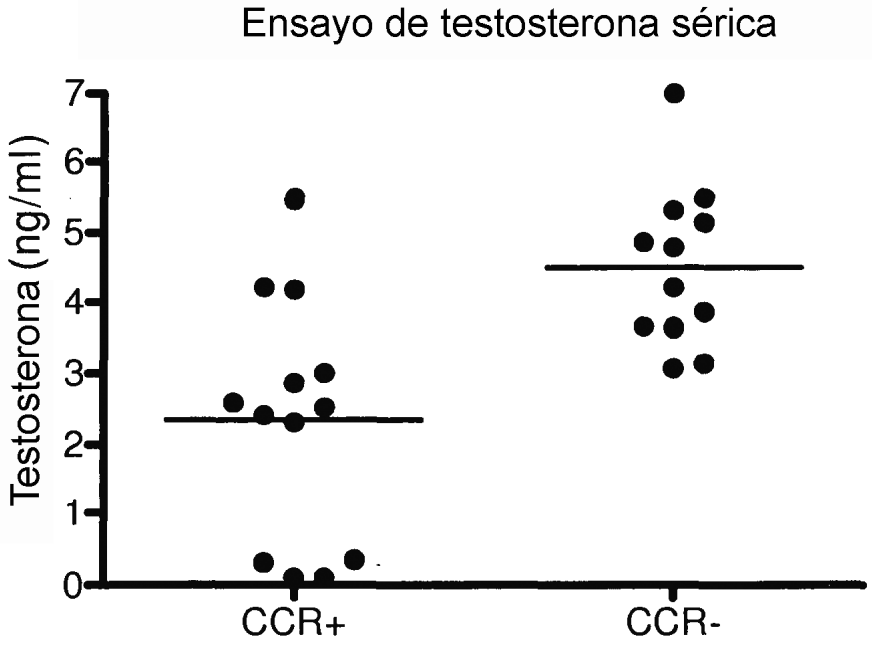


Figura 12

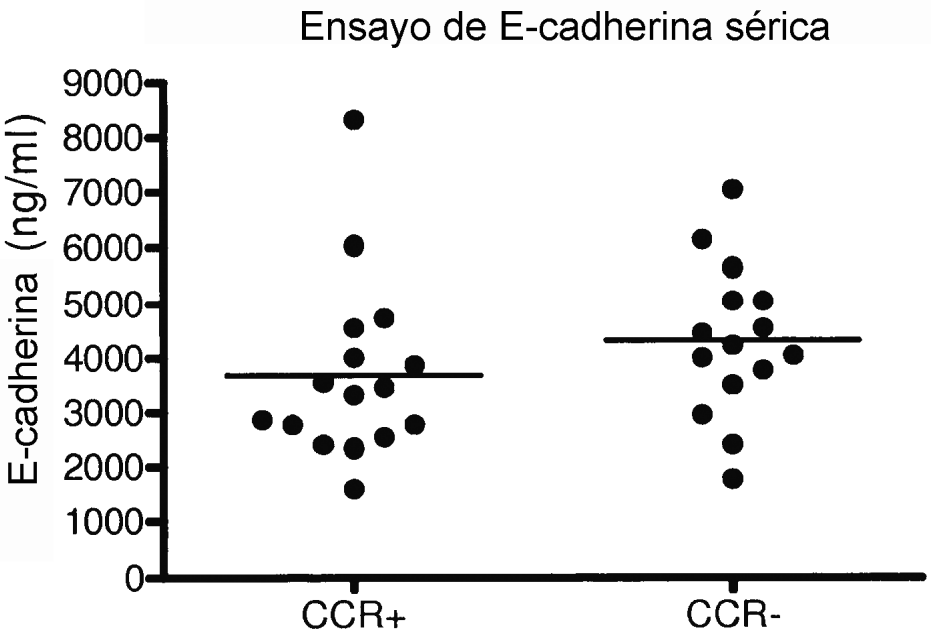


Figura 13

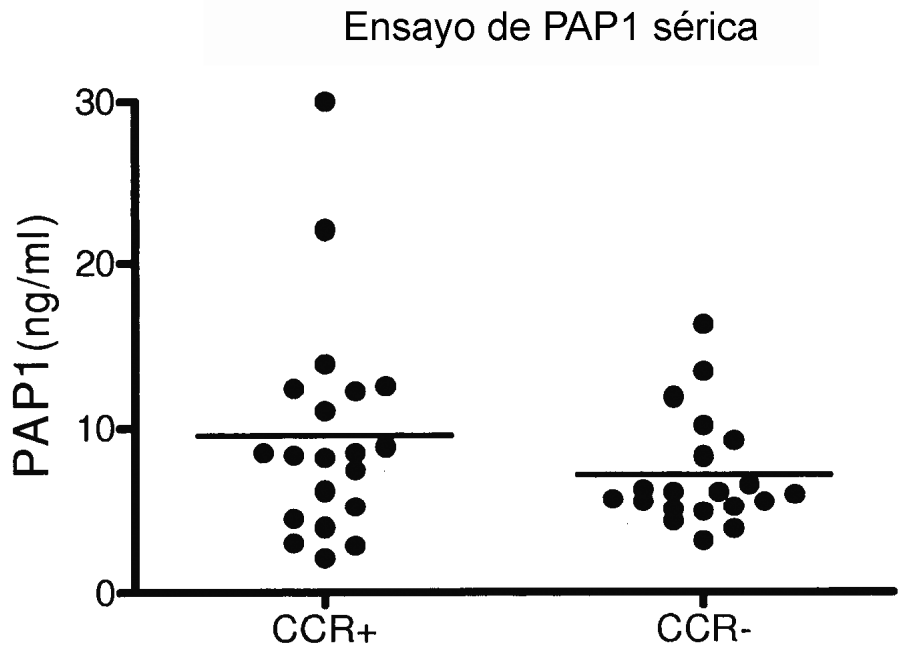


Figura 14

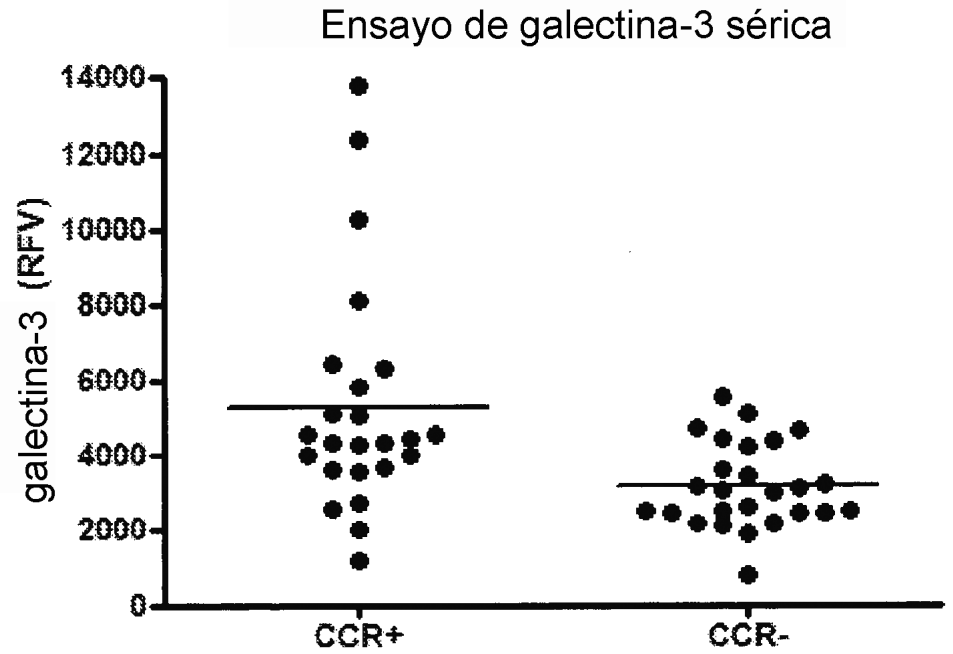


Figura 15

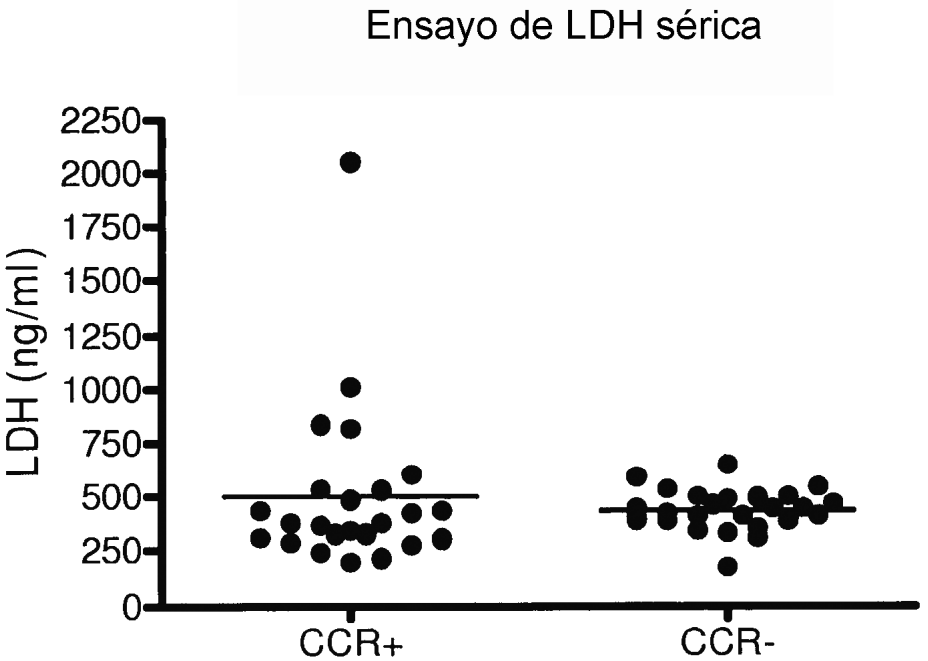


Figura 16

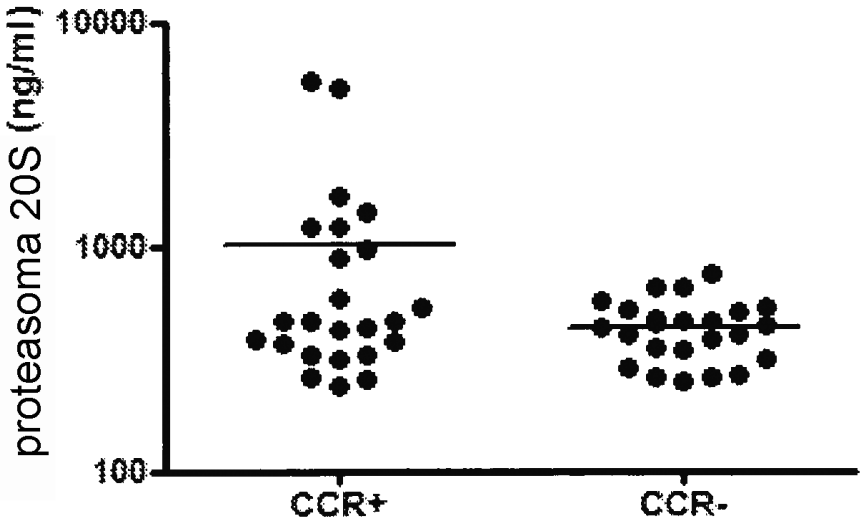


Figura 17

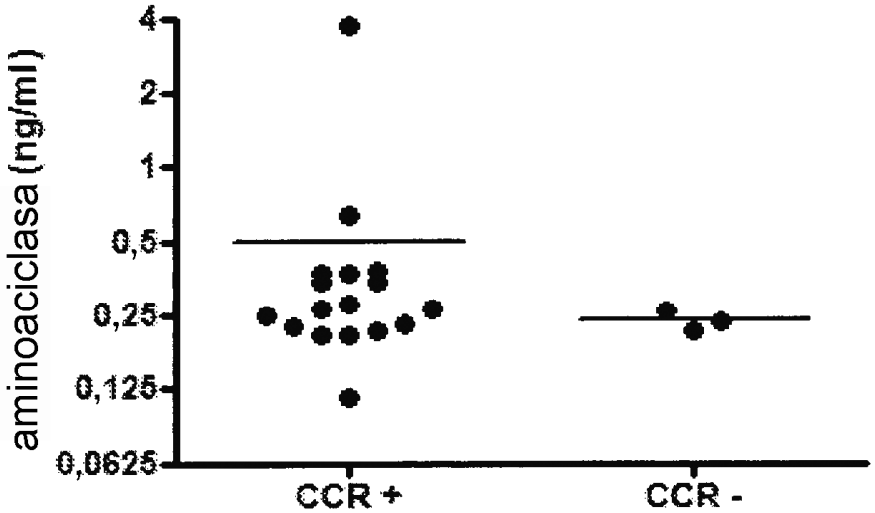


Figura 18

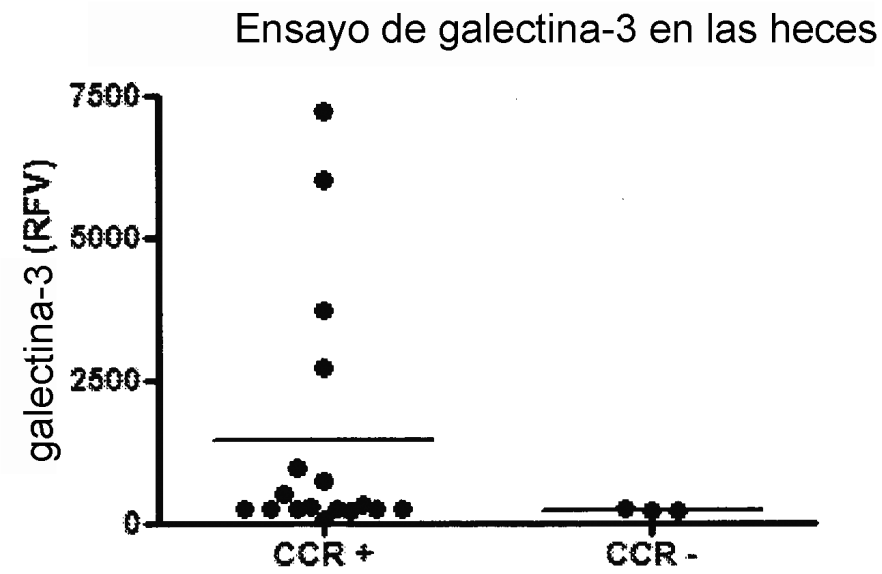


Figura 19

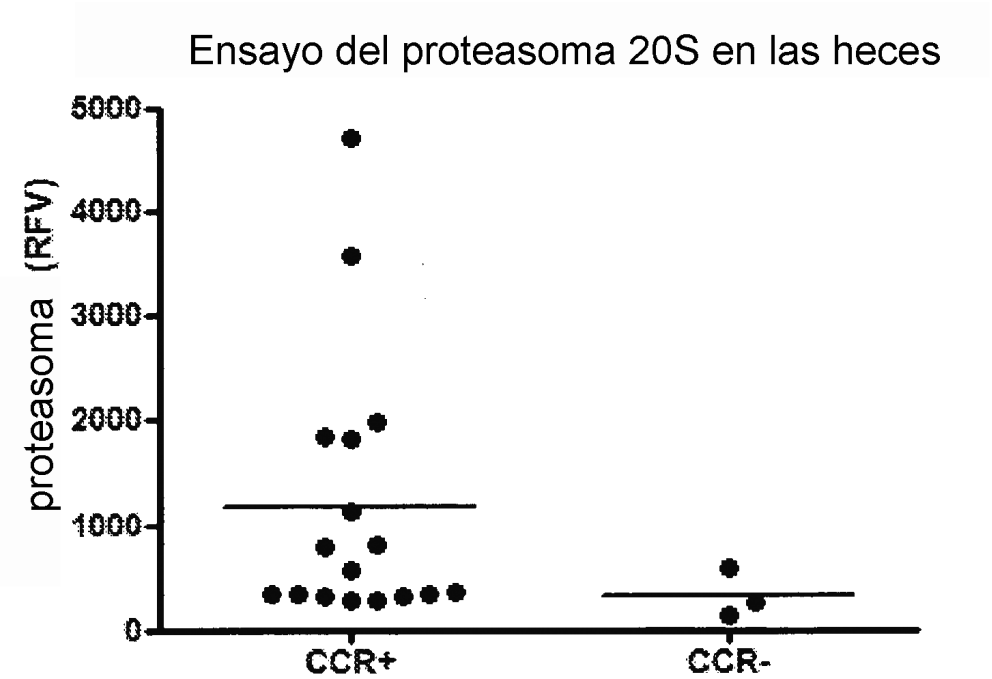


Figura 20

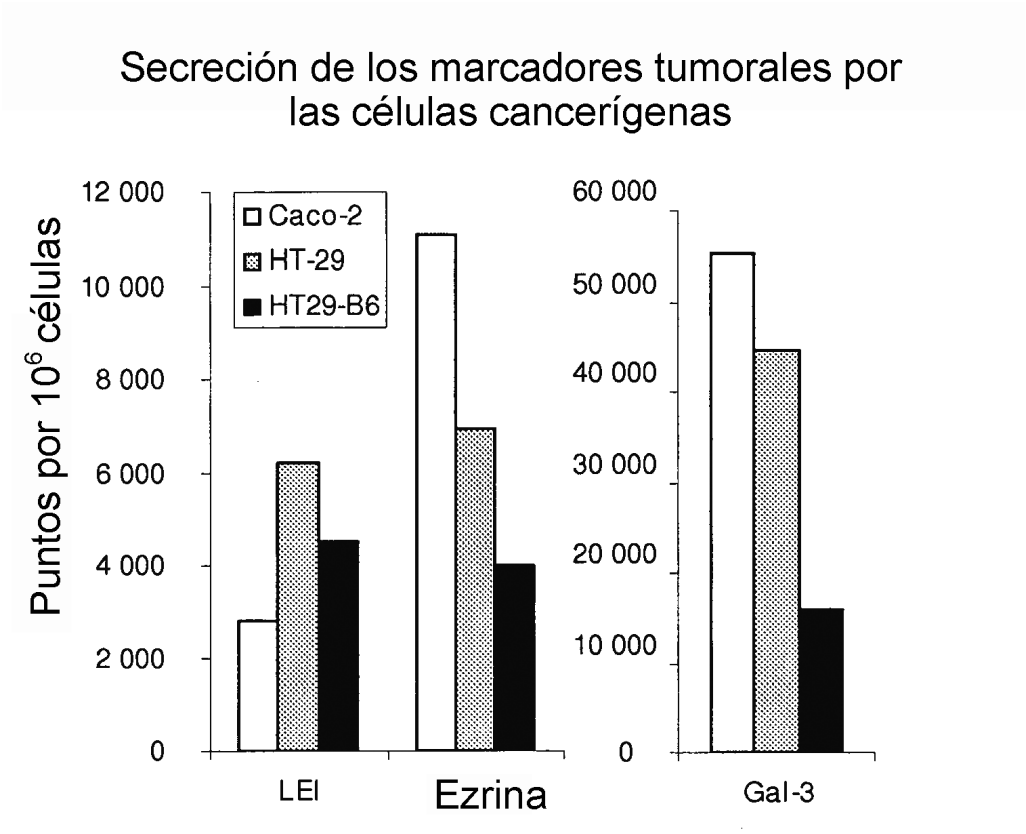

Secreción de los marcadores tumorales por las células cancerígenas
Puntos por 10^6 células
12 000
10 000
8 000
6 000
4 000
2 000
0
Caco-2
HT-29
HT29-B6
60 000
50 000
40 000
30 000
20 000
10 000
0
LEI
Ezrina
Gal-3

Figura 21