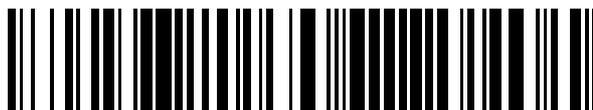


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 627**

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 08827062 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.02.2016 EP 2167971**

54 Título: **Ensayo in vitro de Ezrina para el diagnóstico del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

19.07.2007 FR 0705197

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

19.05.2016

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (33.3%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy-L'Etoile, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%) y
INSTITUT CURIE (33.3%)**

72 Inventor/es:

**ARPIN, MONIQUE;
ATAMAN-ÖNAL, YASEMIN;
BEAULIEU, CORINNE;
BUSSERET, SANDRINE;
CHARRIER, JEAN-PHILIPPE;
CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIÈVE y
ROLLAND, DOMINIQUE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 570 627 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

Ensayo in vitro de Ezrina para el diagnóstico del cáncer colorrectal

5 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 por ensayo de la presencia de la Ezrina 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.

10 El cáncer colorrectal (CCR) es un problema importante de salud pública. Su incidencia mundial se ha estimado en 875.000 nuevos casos en 1996¹. 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%.

15 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.

20 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 (Feecal Occult Blood test, FOBT, comercializado por ejemplo bajo el nombre de Hemocult[®]). Esta técnica ha demostrado su utilidad 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 colorrectal². 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:

30 * 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.

35 * 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 Hemocult[®] son difíciles de interpretar, deben ser leídos por lo tanto en centros especializados, por un personal cualificado y competente.

40 También se han descrito unas pruebas inmunológicas específicas de la hemoglobina humana (Feca EIA[®], Heme Select[®], etc.). Constituyen probablemente un progreso con respecto a Hemocult[®] 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.

45 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.

50 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.

55 El ACE se utiliza para el seguimiento. No se puede utilizar 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.

60 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 Colopath[®]/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 Colopath[®]/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.

• D70[®], 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.

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 intestinales³. W.G. Jiang y S. Hiscox⁴ 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 autores⁵ 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.⁶ han utilizado un ensayo ELISA para cuantificar la Ezrina plasmática de pacientes que padecen cáncer de pulmón. No han observado diferencias con respecto a sujetos de control. Finalmente, en la solicitud de patente WO2006/015079, la ezrina se ha descrito como marcador de diagnóstico para algunos cánceres, como el cáncer de colon. Sin embargo, sólo se han ilustrado el cáncer de ovario y de endometrio, de manera que no se dispone hoy día de un procedimiento de diagnóstico sensible y específico de diagnóstico del cáncer colorrectal utilizando la Ezrina como marcador.

Los solicitantes han puesto en evidencia ahora de manera sorprendente que los tumores cólicos no sólo segregaban específicamente Ezrina, sino sobre todo la liberaban fuera del tejido canceroso, como será puesto en evidencia de manera más detallada a continuación, que su concentración en la muestra biológica en la que se realiza el procedimiento de la invención aumentaba con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, y que la utilización de anticuerpos monoclonales anti-Ezrina particulares permitía disponer de un procedimiento de diagnóstico del cáncer colorrectal sensible y específico.

Así, la presente invención tiene como primer objeto un procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal por determinación de la presencia de Ezrina en unas muestras biológicas procedentes de pacientes sospechosos de padecer cáncer colorrectal, y preferentemente distantes de los tumores, utilizando al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de la Ezrina seleccionado entre los epítipos de secuencia SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 3, SEQ ID n° 4 + SEQ ID n° 5, SEQ ID n° 6 + SEQ ID n° 7 y SEQ ID n° 8.

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 de manera específica y precoz el cáncer colorrectal mediante una prueba sencilla que consiste en buscar la presencia de la Ezrina en una muestra biológica extraída de un paciente preferentemente distante del tumor potencial.

La determinación de la presencia de Ezrina en una muestra biológica distante o no del tumor permite entonces deducir la patología buscada. Una de las ventajas del procedimiento de la invención reside también 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 marcadores tisulares, por ejemplo sobre una muestra de tejido (inmunohistoquímica) puede presentar un interés pronóstico pero ningún interés para la detección o el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Por la determinación de la presencia del marcado tumoral, se entiende la determinación de la presencia de la proteína utilizando al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de la Ezrina

seleccionado entre los epítomos de secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5, SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7 y SEQ ID nº 8.

5 Por epítomo, se entiende un péptido que tiene al menos las secuencias tales como las definidas mediante las secuencias SEQ ID nº 1 a 8, y como máximo 10, 8, 6 o 4 aminoácidos suplementarios distribuidos a ambos lados de la secuencia considerada, de manera homogénea o no, o bien en un único lado, así como sus análogos y homólogos.

10 De manera general, el término "análogo" se refiere a unos péptidos que tienen una secuencia y una estructura polipeptídica nativa, que presenta una o varias adiciones, sustituciones (generalmente conservadoras en términos de naturaleza) y/o deleciones de aminoácido con respecto a la molécula nativa, en la medida en la que las modificaciones no destruyen la reactividad antigénica.

15 Los análogos particularmente preferidos incluyen las sustituciones conservadoras en la naturaleza, es decir las sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos. Específicamente, los aminoácidos están generalmente divididos en 4 familias, a saber (1) los aminoácidos ácidos tales como el aspartato y el glutamato, (2) los aminoácidos básicos tales como la lisina, la arginina y la histidina, (3) los aminoácidos no polares tales como la alanina, la leucina, la isoleucina, la prolina, la fenilalanina, la metionina y el triptófano y (4) los aminoácidos no cargados polares tales como la glicina, la asparagina, la glutamina, la cisteína, la serina, la treonina y la tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina están a veces clasificados en aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir de manera razonable que una sustitución aislada de leucina por la isoleucina o la valina, de un aspartato por un glutamato, de una treonina por una serina o una sustitución conservadora similar de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una relación estructural, no tendrá efecto mayor sobre la actividad biológica. El experto en la materia determinará fácilmente las regiones de la molécula peptídica de interés que pueden tolerar un cambio por referencia a los argumentos de Hopp/Woods y Kyte-Doolite, bien conocidos en la técnica.

20 Por "homología" se entiende el porcentaje de identidad entre dos moléculas peptídicas. Dos secuencias de aminoácidos son "sustancialmente homólogas" la una con respecto a la otra cuando las secuencias presentan al menos el 60%, preferentemente al menos el 75%, más preferentemente al menos el 80-85%, aún más preferentemente al menos el 90% y aún más preferiblemente al menos el 95-98% o más identidad de secuencia en una longitud definida de las moléculas peptídicas.

30 Por epítomo de secuencia SEQ ID nº X + SEQ ID nº Y, se entiende un epítomo constituido por dos partes distintas de la proteína de las cuales procede el epítomo, reconociendo el anticuerpo este epítomo, que debe reconocer estas dos partes. Este reconocimiento está muy probablemente relacionado a una proximidad de las secuencias en la estructura tridimensional de la proteína.

35 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.

40 Por muestra biológica en la que se utiliza el procedimiento de la invención, se entiende cualquier muestra biológica susceptible de contener el marcador tumoral de interés. A título de ejemplo de muestra biológica no distante del tumor, se pueden citar las muestras sólidas tales como el tejido que proviene del tumor, biopsias de este tumor, ganglios linfáticos, metástasis del paciente, y las células purificadas a partir de estas muestras sólidas. 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, la orina, 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.

45 El procedimiento de la invención se puede mejorar detectando, además de la Ezzrina, 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 dos marcadores permite mejorar la especificidad y la sensibilidad de la prueba de diagnóstico del cáncer colorrectal.

50 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:

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

65 - 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 Aristales) 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 detección 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 Ezrina, siendo el otro un marcador tumoral seleccionado del grupo A, a saber: Inhibidor de la elastasa de leucocitos, Aminoacilasa 1, Proteína de unión a ácidos grasos de hígado, Proteína de unión a ácidos grasos de intestino, Apolipoproteína AI, 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 (n° Swiss Prot P30740, también denominado LEI, Serpin B1, inhibidor de la elastasa monocito/neutrófilo, M/NEI o EI) se secuenció en 1992⁷. El LEI inhibe específicamente las proteasas que tienen unas propiedades de tipo elastasa o quimotripsina por formación de complejo no disociable bajo la acción de SDS⁸. 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 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 aminoácidos⁹. Un ensayo inmunoquímico de la actividad enzimática aminoacilasa se ha desarrollado a partir de 1975 por K. Lorentz *et al.*¹⁰ y se ha utilizado para determinar diferentes tejidos y sueros¹¹. 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 3p21.1¹². 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 indetectable¹³. Asimismo S. Balabanov *et al.*¹⁴ 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 (n° Swiss Prot P07148, también denominado L-FABP, FABP1, FABPL, proteína Z o proteína transportadora de esteroles) 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 1985¹⁵. 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 normal¹⁶. 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 dimensiones¹⁷. 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 hígado¹⁸. 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 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 1987¹⁹. 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)²⁰. 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 sujetos²⁰. 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 normal¹⁶. 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)²¹. 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.

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 patologías²². La concentración plasmática de las apolipoproteínas no es insignificante, del orden del mg/ml²³.

El marcador apolipoproteína AI (N° NCBI 490098, también denominado Apo A-I, Apo AI y Apo A1) es una proteína de 243 aminoácidos y de 28 kDa. Está esencialmente sintetizado 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-TOF²⁴. 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 el 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 CCR²⁵. Hachem *et al.*²⁶, 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.*²⁴ 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.*²⁵.

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.*²⁶ 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 I-plastina. 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 normales²⁷. 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 cáncer²⁸. 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 Ezrina y de al menos 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 Ezrina, 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 (n° Swiss Prot P61769, también denominado $\beta 2$ Microglobulina, $\beta 2M$) 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 $\beta 2$ 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 eritematoso, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjogren, las enfermedades malignas del sistema linfático (mieloma múltiple, linfoma de células B), algunas enfermedades virales (hepatitis o SIDA) en los pacientes hemofílicos. La microglobulina $\beta 2$ 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 $\beta 2$ 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 ubiquitiniladas²⁹. 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 ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ y $\alpha 7$) y 10 unidades beta ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$). 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 Bortezomib (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. T 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 metastásica³¹. 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 (n° 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 (n° 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 gonadotropina 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 colon³³.

El marcador calreticulina (n° 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 sanguínea³⁵. 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 (PANPEPAP) 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 colorrectal³⁷. 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 cánceres³⁸. 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 PanorexTM. 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 cancerosas⁴¹. 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 citoqueratinas 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 sanguínea 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. Freedman⁴⁷, 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 hepáticas⁴⁸ 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 heces⁴⁹. 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 elevado⁵⁰. 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 colorrectal. 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 Metaloproteínasa 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 Prodefensina-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 sangre 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, Galectina-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.

5 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.

10 Contrariamente a la Ezrina, que siempre se detecta en forma de proteína, se detecta el o los marcadores tumorales de interés distinto de la Ezrina, o bien en forma de proteína, o bien en forma de ARN mensajero, o bien por alteración del ADN correspondiente (mutación o modificación de las metilaciones).

15 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.

20 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.

25 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.

30 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.

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

40 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.

45 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.

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

60 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 Clon ELA-1 se ha descrito en el artículo de Yasumatsu *et al.*⁵⁸.

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

ES 2 570 627 T3

- 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.
- 5 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.
- 10 Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Apolipoproteína AI y están disponibles en particular en el catálogo Biotools Meridian Life Sciences, anticuerpo monoclonal anti-Apo AI Clon 4A90, Cat. nº H45402M y anticuerpo policlonal de cabra anti-Apo AI, Cat. nº K45252P.
- 15 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 Biotools Meridian Life Sciences anticuerpo policlonal de cabra anti-Apo AII, Cat. nº K74001P.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-Proteasoma 20S y están disponibles en particular en el catálogo de Affinity Research Products.
- 35 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.
- 40 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).
- 45 Se conocen ejemplos de anticuerpo anti-CA 242, anti-CA 50, anti-CA 72-4 y están disponibles en particular en el catálogo Fujirebio.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 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.
- 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.

5 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:

10 * 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,

15 * 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.

20 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
25 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.

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

35 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 Western y la transferencia Dot.

40 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.

45 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 pajas 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
50 materia, se pueden agotar, por ejemplo, en primer lugar, las proteínas predominantes de la muestra.

55 Cuando el procedimiento de la invención es un método "sandwich", este puede utilizar dos anticuerpos monoclonales o bien un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal. Por supuesto, en este último caso, el anticuerpo monoclonal es al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de la Ezrina seleccionado entre los epítipos de secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5, SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7 y SEQ ID nº 8.

60 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-Ezrina y están disponibles en particular en el catálogo Abcam, por ejemplo el anticuerpo policlonal de conejo anti-Ezrina, Cat. Nº Ab47418.

65 Según un modo de realización de la invención, el procedimiento de la invención utiliza dos anticuerpos monoclonales, preferentemente al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de secuencia SEQ ID nº 1 y al menos otro anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo de la Ezrina seleccionado entre los epítipos de secuencia SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5 y SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7. Más preferentemente, el procedimiento de la invención utiliza al menos un anticuerpo anti-Ezrina dirigido contra un

epítipo de secuencia SEQ ID nº 1 y al menos otro anticuerpo dirigido contra un epítipo de secuencia SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5.

5 Por otro lado, cuando el procedimiento de la invención es la inmunohistoquímica, se prefiere utilizar al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de secuencia SEQ ID nº 2, lo que constituye un modo de realización particular de la invención.

10 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.

15 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.

20 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
25 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
30 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 70°C, en particular entre 35 y 65°C 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.

40 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.

45 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:

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

55 - 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.

60 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 nucleicos⁶¹. Los marcadores apropiados son tales como se han definido anteriormente.

65 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.

5 La sonda de detección puede ser en particular una sonda de detección "molecular beacons"⁶². 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.

10 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
15 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 microdeposición, la síntesis *in situ* y la fotolitografía.
20

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
25 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
30 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
35 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 puntuales⁶³. Las deleciones se identificaron con respecto a la diferencia de tamaño entre el fragmento de referencia esperado y el fragmento mutado. Imperiale *et al.*⁶³ han descrito un abanico de 21 mutaciones situadas en los genes *K.ras*, *APC*, y *p53* que
40 permite detectar 16/31 de los cánceres invasivos.

Otros marcadores de ADN utilizados son la delección 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
45 pero que parece reflejar la apoptosis desordenada de las células tumorales exfoliadas en el lumen cólico⁶⁴. 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
50 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.

55 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 metodología⁶⁵.
60

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*)⁶⁶, la región promotora del gen *TPEF/HHP1* (factor de crecimiento epidérmico que contiene una proteína transmembranaria y dominio folistatina)⁶⁶ o también el gen *septina-9*⁶⁷.
65

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 valoraciones por inmunoensayos diferentes, o bien de manera simultánea, en ensayo multiplex.

5 Cuando, en el procedimiento de la invención, se detectan dos marcadores de naturaleza diferente, por ejemplo un
 10 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
 15 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
 20 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 15°C y 60°C, y

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

25 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.

30 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.

35 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.

40 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).

45 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 Métézéau *et al.*⁶⁸.

50 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.*⁶⁹.

55 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.

60 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:

65 (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 37°C bajo atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

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 tecnecio-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 podrán visualizar las zonas del organismo en las que hubo fijación de la pareja de unión del marcador tumoral, produciendo los cánceres un marcador tumoral, y en particular el cáncer colorrectal, así como las localizaciones de sus metástasis a distancia y las afecciones ganglionares.

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 sólo las células cancerosas segregan la Ezrina, y esta producción está en función del grado de cáncer, lo que constituye otro objeto de la invención.

Por otra parte, los epítomos descritos en esta solicitud, de secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5, SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7 y SEQ ID nº 8, son nuevos y constituyen 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 Aminociclase 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-),
- 5 - 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-),
- 10 - 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-),
- 15 - 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-),
- 20 - 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-),
- 25 - 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-),
- 30 - 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-),
- 35 - 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-),
- 40 - la figura 18 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de Aminociclase 1, en ng/ml, en las heces de pacientes que presentan un cáncer colorrectal (CCR+) y de pacientes sanos (CCR-),
- 45 - 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
- 50 - 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 10⁶ células cancerosas de las líneas Caco-2, HT-29 y HT29-B6.

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

1. Amplificación del ADNc y clonación

60 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).

65 Para la clonación de los genes LEI, L-FABP y Gal-3, se han extraído los ARN mensajeros a partir del residuo de 10⁸ 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
<i>LEI</i>	
OL215 (SEQ ID 9)	5'-ATGGAGCAGCTGAGCTCAGCAAAC-3'
OL216 (SEQ ID 10)	5'-CTAAGGGGAAGAAAATCTCCCCAA-3'
<i>L-FABP</i>	
Sentido (SEQ ID 11)	5'-CGGAGCGTCTCCCATGAGTTTCTCCGGCAAGTA-3'
antisentido (SEQ ID 12)	5'-GAAATGCAGACTTGTCTAGATGCGCTTGTCTGATG CGCTTGAAGACAATG-3'
<i>Gal-3</i>	
OL217 (SEQ ID 13)	5'-ATGGCAGACAATTTTTCGCTCC-3'
OL218 (SEQ ID 14)	5'-TTATATCATGGTATATGAAGCACTGG-3'

5 Los fragmentos de ADN obtenidos se clonaron en el vector pCR2.1 TOPO (LEI y Gal-3) con el TA Cloning kit (Invitrogen Cat. n° 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.

10 Para la clonación del gen que codifica para la Aminociclase 1, los ARN totales se extrajeron a partir de un residuo de 10⁸ 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).

15 El ADNc procedente de esta reacción se utilizó como matriz en una reacción de PCR que utiliza el kit AccuPrime Pfx (Invitrogen Cat. n° 12344-024) siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Los cebadores de PCR son: ACY-1 Fwd2 (SEQ ID 15: 5'-GCGAATTCTTTAAGAAGGAGATATACATATGACGAGCAAAGG-TCCGGAAGAGGAGCACCCATCG-3') y ACY-1 Rev (SEQ ID 16: 5'-GCAAGCTTCAGCTGTCACTGGGCAGGGC-3')

20 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. n° K2820-20). Este plásmido se ha secuenciado a fin de verificar que el ADNc es conforme a la secuencia esperada.

25 El fragmento de ADN siguiente (SEQ ID 17) que contiene el marco de lectura abierto *I-FABP* se ha obtenido por síntesis química, efectuada por la compañía Geneart.

SEQ ID⁹ :

GGTACCGAATTCCGCGTTTGACAGCACTTGGAAAGGTAGACCGGAGTGAAAACATGACAAG
TTCATGGAAAAAATGGGTGTTAATATAGTGAAAAGGAAGCTTGCAGCTCATGACAATTTGA
AGCTGACAATTACACAAGAAGGAAATAAATTCACAGTCAAAGAATCAAGCGCTTTTCGAA
ACATTGAAGTTGTTTTTGAACCTTGGTGTCACTTTAATTACAACCTAGCAGACGGAACCTGAA
CTCAGGGGGACCTGGAGCCTTGAGGGAAATAAACTTATTGGAAAATTCAAACGGACAGAC
AATGGAAACGAAGTGAATACTGTCCGAGAAATATAGGTGATGAACTAGTCCAGACTTATG
TGTATGAAGGAGTAGAAGCCAAAAGGATCTTTAAAAAGGATTCTAGAGTTCGACGAGCTC

2. Construcción de los vectores de expresión

30 Se han subclonado los genes que codifican para LEI y Galectina-3 en el vector de expresión procariota pMR78⁷⁰ 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.

35

Tabla 2

Genes y Cebadores	Oligonucleótidos
<i>LEI</i>	
OL228 (SEQ ID 18)	5'-ATGGGAATTCAGGAGCAGCTGAGCTCAGCAA-3'
OL229 (SEQ ID 19)	5'-CGATAAGCTTAAGGGGAAGAAAATCTCCCC-3'
<i>L-FABP</i>	
Sentido (SEQ ID 20)	5'-GCTGGCCATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCA CATGAGTTTCTCCGGCAAGTACCAAC-3'

Antisentido (SEQ ID 21) 5'-GCACGGATCCTAGATGCGCTTGCTGATGCGCTTGAA
GAC-3'

Gal-3

OL230 (SEQ ID 22) 5'-ATGGAATTCAGGCAGACAATTTTCGCTCC-3'
OL231 (SEQ ID 23) 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-*I-FABP*.

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 4°C. 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-Ezrina	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, glutatona 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 37°C, 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^{71,72}. 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, 4A9H5, 4D9B9, 4G11B5, 5G2D12, 8A8G6, 8B5G6G4, 9D2A11, 2A7F6 y 11H7D9
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

5 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.

10 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.

20 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

25 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
<i>LEI</i>							
21B10A5	8365	7678	NT	60200	36506	NT	NT
10E1H1	0	0	NT	13357	6893	NT	NT
<i>Ezrina</i>							
4A7A6C1	123436	116448	42480	15303	67439	NT	NT
4D9B9	121564	103833	4205	1810	11848	NT	NT
4G11B5	105774	120944	63626	23879	130522	NT	NT
8B5G6G4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
4A9H5	7066	4742	NT	NT	NT	1588	2446
5G2D12	1361	558	NT	NT	NT	206	259
8A8G6	458	199	NT	NT	NT	51	40
9D2A11	1580	1736	NT	NT	NT	542	476
<i>Amiroacilasa 1</i>							
2A7F6	10687	4787	NT	NT	NT	4477	7238
11H7D9	217664	232005	36093	10513	30233	NT	NT
<i>Plastina-I</i>							
3D11D10	136725	NT	NT	NT	NT	275477	246564
8C8C5	557	1110	4364	77	0	NT	NT
<i>Calreticulina</i>							
5C10H10	2842	3040	NT	NT	NT	2503	3294
11B6D11	3261	2937	NT	NT	NT	2070	2764
<i>LDH</i>							
3F11E11	45391	NT	NT	NT	NT	30411	13942
12F10G8	122907	154593	11841	15811	53285	NT	NT
<i>Galectina-3</i>							
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

5 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.

10 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.

15 6. Caracterización de los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales utilizando la técnica del Spotscan

6.1. Metodología

20 La técnica del Spotscan, adaptada según Frank y Döring⁷³, permite sintetizar de manera simultánea un gran número de péptidos fijados sobre una membrana de celulosa. Estos péptidos reproducen la secuencia del antígeno diana en forma de péptidos de 8 a 12 aminoácidos, que se solapan de 1 a 4 restos. Estos péptidos se ponen después en contacto con el anticuerpo a estudiar en un ensayo colorimétrico de tipo transferencia, y la identificación de los péptidos inmunorreactivos permite deducir la secuencia mínima del epítomo del anticuerpo y localizarlo precisamente en el antígeno.

25 La síntesis se efectúa en una membrana de celulosa que lleva uniformemente unas ramas de polietilenglicol (PEG) de una longitud de 8 a 10 unidades, que presenta una función NH₂ libre al final de cadena. Se desarrolla desde el extremo C-terminal hacia el extremo N-terminal de los péptidos. Los aminoácidos tienen su función aminada protegida por un grupo Fmoc (9-fluoremetiloxycarbonilo), y sus cadenas laterales, susceptibles de reaccionar durante la síntesis, son asimismo protegidas por unos grupos tritilo, t-butilo o t-butil-éter. Las soluciones madre de aminoácidos se preparan a una concentración de 0,33 M en NMP (N-metil-pirrolidona) que contiene 0,5 M de HOBt (hidroxibenzotriazol). El depósito de los aminoácidos se efectúa con la ayuda del robot ASP 222 (Abimed, Langenfeld, Alemania), controlado por medio del programa AutoSpot XL. La utilización de este robot permite realizar simultáneamente hasta 4 membranas de 96 puntos, es decir 384 péptidos.

35 Para un ciclo de acoplamiento de un aminoácido, el robot deposita 0,7 µl de la solución de aminoácido activado extemporáneamente (un volumen de solución de diisopropilcarbodiimida 1,1 M diluido en NMP para 3 volúmenes de solución madre de aminoácido) sobre las membranas. Este depósito se repite una segunda vez, después las membranas se aclaran en DMF (N,N-dimetilformamida). Los grupos NH₂ que no han reaccionado se acetilan después mediante 4 a 6 incubaciones de 10 minutos en una solución de anhídrido acético al 10% en DMF, a fin de evitar la aparición de péptidos abortivos o truncados. Después de 3 lavados de 2 minutos en DMF, los grupos Fmoc que protegen la función aminada de los aminoácidos son escindidos por una incubación de 5 minutos en una solución de piperidina al 20% en DMF. Después de 4 lavados en DMF, los puntos son coloreados con la ayuda de una solución de azul de bromofenol al 1% en DMF, después la membrana se aclara 3 veces en metanol y se seca al aire libre antes del ciclo de acoplamiento siguiente.

40 Este protocolo se repite para la adición de cada nuevo aminoácido. Después del acoplamiento del último aminoácido, los péptidos se acetilan a fin de permitir el bloqueo de todos los grupos NH₂ libres, impidiendo así la adición de otro aminoácido. Después, las cadenas laterales de todos los péptidos son desprotegidas por la incubación de las membranas en un baño ácido trifluoroacético/diclorometano/trisobutilsilano (5 : 5 : 0,3) durante 1 hora. Las membranas son después aclaradas 4 veces en diclorometano, 3 veces en DMF y 3 veces en metanol antes de ser secadas al aire libre y conservadas a -20°C hasta la inmunorrevelación.

55 Para inmunorrevelar los puntos con un anticuerpo monoclonal, las membranas se aclaran en primer lugar en metanol, después se lavan en TBS (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 140 mM, KCl 3 mM) antes de ser incubadas durante una noche a temperatura ambiente en la solución de saturación (solución concentrada 10X a base de caseína (Western Blocking reagent, Roche) diluida en TBS-Tween 20 0,05% (TBS-T) y que contiene un 5% de sacarosa). Después de un lavado de 10 minutos en TBS-T, las membranas se incuban durante 1h30 a 37°C con el anticuerpo monoclonal diluido a 20 µg/ml en solución de saturación. Las membranas son después lavadas 3 veces en TBS-T, después se incuban con el conjugado anti-ratón acoplado a la fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch), diluida al 1/2000 en solución de saturación. Después 2 lavados de 10 minutos en TBS-T, después 2 lavados en CBS (ácido cítrico 10 mM pH 7, NaCl 140 mM, KCl 3 mM), el revelador, preparado extemporáneamente (5-bromo, 4-cloro, 3-indol, fosfato 600 µM, bromuro de tetrazolio tiazolil blue 720 µM, y MgCl₂

mM en CBS), se pone en contacto con la membrana durante 30 a 45 minutos en la oscuridad. Los péptidos inmunorreactivos aparecen en azul-violeta. Después de 3 aclarados en agua destilada, las membranas se escanean y después se conservan en agua hasta la regeneración.

- 5 La regeneración permite eliminar los anticuerpos y los conjugados fijados en los péptidos, lo que permite así realizar un nuevo ensayo de inmunorreactividad frente a otro anticuerpo. Las membranas sufren una serie de lavados de 10 minutos cada uno: 1 lavado en agua destilada, 6 lavados en DMF, 3 lavados en tampón de regeneración A (urea 8M, SDS (sulfato de sodio dodecílico) 35 mM, β -mercaptoetanol 0,1%), 3 lavados en tampón de regeneración B (agua destilada / etanol / ácido acético 4 : 5 : 1), después 2 lavados en metanol. Las membranas son después secadas al
10 aire libre antes de ser almacenadas a -20°C.

6.2. Resultados

La tabla 6 resume los epítomos reconocidos por los 8 anticuerpos estudiados por la técnica del Spotscan.

15

Tabla 6

Anticuerpos	n° epítomo	Secuencia del epítomo ^a (SEQ ID n°)
4A7A6C1	1	LSEIQRALQLE (365-376) (SEQ ID n°1)
4D9B9	2	LAAELAEYT (417-425) (SEQ ID n°2)
4G11B5	1	LSEIQRALQLE (365-376) (SEQ ID n°1)
8B5G6G4	3	QIQRALQLEEER (368-379) (SEQ ID n°3)
4A9H5	4	DYEEKTKK (353-360) + QAKFGD (131-136) (SEQ ID N°4) + (SEQ ID n°5)
5G2D12	2	LAAELAEYT (417-425) (SEQ ID n°2)
8A8G6	5	LEADRMAAL (389-397) + LEEARRRKED (431-440) (SEQ ID n°6) + (SEQ ID n°7)
9D2A11	6	LEADRMAALRAK (389-400) (SEQ ID n°8)

^aSecuencia en aminoácido de la región de fijación de la Ezrina al anticuerpo ensayado. Los números entre paréntesis corresponden a la posición del epítomo en la secuencia de aminoácidos de la Ezrina, empezando la numeración en la metionina inicial.

- Los 8 anticuerpos monoclonales anti-Ezrina reconocen 6 epítomos de la proteína, los cuales están numerados de 1 a 6 (tabla 6). Los anticuerpos 4A7A6C1 y 4G11B5 tienen el mismo epítomo (epítomo n°1). Los anticuerpos 4D9B9H6 y 5G2D12 tienen también el mismo epítomo (epítomo n°2). Los anticuerpos 8A8G6 y 9D2A11 tienen unos epítomos que se solapan parcialmente, pero no totalmente idénticos.

20

7. Detección de la Ezrina por ELISA sandwich

7.1. Metodología

25

La Ezrina se ha detectado en inmunoensayo de tipo sándwich utilizando por ejemplo el autómatas de ELISA Vidas® (BioMérieux). Para ello, el ensayo ELISA se ha construido utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (BioMérieux, Cat. n° 30315). Los reactivos se han utilizado tales como se describen en el prospecto correspondiente (ref. 11728 D-FR-2005/05), modificados de la siguiente manera:

30

1. Los conos se han sensibilizado con los anticuerpos de captura a ensayar (4A9H5, 5G2D12, 8A8G6) a una concentración de 30 μ g/ml.
- 35 2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido por 300 μ l de anticuerpos de revelación a ensayar (4A7A6C1 y 4G11B5) acoplados a la biotina, diluidos a 1 μ g/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).
- 40 3. El lisado de Caco2 (que contiene la ezrina en forma nativa), preparado por sonicación el residuo celular en PBS (50 μ l), se diluye directamente en el segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra.
4. La reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómatas Vidas® y del protocolo HBS AG ULTRA cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación se llevaron a 100 ciclos.
- 45 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 señal está en RFV, valor relativo de fluorescencia.

7.2. Resultados

La tabla 7 resume la reactividad de las diferentes combinaciones de anticuerpos en una dilución al 1/50 del lisado Caco2. Los 2 anticuerpos que se fijan en el epítipo n°1, el 4A7A6C1 y el 4G11B5 generan unos perfiles de señales idénticos. Es posible detectar la Ezrina utilizando la combinación de los epítipos n°1 y 4, o n°1 y 2, o también n°1 y 5. Cuando no hay ninguna reactividad con el marcador tumoral, las señales observadas son mucho más bajas, del orden de 2,5 a 3 RFV. La combinación de los epítipos n°1 y 4 permite obtener las señales más elevadas.

Tabla 7^a

Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección (epítipo n°1)	
	4A7A6C1biotina	4G11B5biotina
4A9H5 (epítipo n°4)	6229,5	6166
5G2D12 (epítipo n°2)	52,5	46,5
8A8G6 (epítipo n°5)	241,5	234
Control neg.	3	2,5

^aSeñal en inmunoensayo sandwich VIDAS, en RFV (unidad relativa de fluorescencia).

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 -80°C. El tubo de plasma es directamente centrifugado durante 10 minutos a 1000 g, el plasma se extrae, se alícuota y se conserva a -80°C. 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. n° 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 detalle en el ejemplo 2 y de un ensayo ELISA que utiliza el autómata Vidas® (bioMérieux). Para hacer esto, se ha construido el ensayo ELISA

ES 2 570 627 T3

utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. n° 30315). Los reactivos se utilizaron tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

- 5 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).
 - 10 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.
 - 15 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.

Los resultados del ensayo de Ezrina sérica en los pacientes por ELISA en autómata Vidas se dan en la Tabla 8

Tabla 8

Patología ^a	Identificador de la muestra de suero	Naturaleza	Fase	TNM ^b	Ezrina ng/ml
CCR+	CLSP047/F0	Suero	I	T1N0M0	9
CCR+	CLSP076/F0	Suero	II	T3N0M0	8,579
CCR+	GHBD020/F0	Suero	II	T3N0M0	21,362
CCR+	GHBD023/F0	Suero	II	T3N0M0	7,955
CCR+	GHBD025/F0	Suero	II	T3N0M0	5,985
CCR+	GHBD029/F0	Suero	II	T3N0M0	13,343
CCR+	CBSE005/F0	Plasma	III	T3N1M0	20,248
CCR+	CLSP050/F0	Plasma	III	T2N1M0	11,706
CCR+	CLSP072/F0	Suero	III	T3N1M0	9,252
CCR+	CLSP089/F0	Suero	III	T4N2M0	8,916
CCR+	CLSP090/F0	Suero	III	T1N1M0	18,460
CCR+	GHBD019/F0	Suero	III	T3N1M0	7,810
CCR+	CBSE008/F0	Suero	IV	T4N3M1	9,781
CCR+	CBSE021/F0	Suero	IV	T4N2M1	18,846
CCR+	CBSE026/F0	Suero	IV	T4N1M1	52,641
CCR+	CLSP068/F0	Suero	IV	TxNxM1	392,369
CCR+	CLSP156/F0	Suero	IV	T4N0M1	12,188
CCR+	CSEM005/F1	Suero	IV	T4N2M1	89,383
CCR+	CLSP153/F0	Suero	III/IV	T3N2Mx	12,477
CCR-	N017197/F0	Plasma			12,958
CCR-	N017250/F0	Suero			8,435
CCR-	N017349/F0	Suero			19,668
CCR-	N018640/F0	Suero			8,964
CCR-	N030068/F0	Suero			11,802
CCR-	N143574/F0	Suero			17,155
CCR-	N146628/F0	Suero			12,091
CCR-	N148324/F0	Suero			15,900

CCR-	N314199/F0	Suero		5,314
CCR-	N314324/F0	Suero		13,006
CCR-	N417852/F0	Suero		26,598
CCR-	N491079/F0	Plasma		5,842
CCR-	N491124/F0	Plasma		8,531
CCR-	N491722/F0	Suero		23,735
CCR-	N518569/F0	Suero		14,453
CCR-	N835827/F0	Plasma		13,151
CCR-	N836221/F0	Plasma		11,802
CCR-	N836301/F0	Plasma		10,454
CCR-	N744056/F0	Suero		20,974
CCR-	N835886/F0	Suero		14,887
CCR-	N835931/F0	Suero		10,358
CCR-	N836125/F0	Suero		22,911

A: CCR+: pacientes que padece cáncer colorrectal/CCR-: Sujeto sano

B: TNM: fase de invasión tisular (T), ganglionar (nódulos linf., N), y a distancia (metástasis, M)

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.

5

4. Determinación sérica del marcador tumoral Aminocilasa 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. n° 30315). Los reactivos se utilizan tal como se describen en las instrucciones correspondientes (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las siguientes modificaciones:

10

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

15

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).

20

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.

25

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.

30

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.

35

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. n° 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 37°C 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.

40

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 $16,6 \pm 1,3$ ng/ml. El valor medio es de $6,6 \pm 0,2$ 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 $1 \mu\text{g}$ 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 37°C . Se lava de nuevo 3 veces en PBS-T, se deposita en placas de $100 \mu\text{l}$ unas diluciones de la gama estándar o $100 \mu\text{l}$ 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 $0,1 \mu\text{g}$ por pocillo y se incuba durante 2h a 37°C . Se efectúa de nuevo 3 lavados en PBS-T, antes de añadir el sustrato OPT EIA (BD), $100 \mu\text{l/pocillo}$. 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 .

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 $675 \pm 36 \mu\text{g/ml}$ mientras que es mucho más elevada en 27 sujetos sanos (controles): $1040 \pm 39 \mu\text{g/ml}$. 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 $1175 \pm 87 \mu\text{g/ml}$ 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.

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.

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 $768 \pm 30 \mu\text{g/ml}$ mientras que es mucho más elevada en 17 sujetos sanos (controles): $1194 \pm 51 \mu\text{g/ml}$. 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 sérica 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 $170 \pm 11 \mu\text{g/ml}$ mientras que es mucho más elevada en 17 sujetos sanos (controles): $277 \pm 16 \mu\text{g/ml}$. 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. n° 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[®] Beta2 Microglobulina, Vidas[®] ACE, Vidas[®] CA19-9TM 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. n° 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 9.

Tabla 9

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

5 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.

10 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.

15 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.

20 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.

25 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.

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

35 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.

45 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 la Ezrina se dan en la tabla 10.

La asociación de los marcadores tumorales Ezrina y Aminoacilasa 1 permite así obtener para el mismo grupo de 19 pacientes unos resultados totales «2» aumentados en 6 pacientes que padecen cáncer colorrectal, mientras que la valoración sólo de Ezrina y Aminoacilasa 1 aumentaba respectivamente en 3 y 3 pacientes solamente.

La asociación de los marcadores tumorales Ezrina, Beta-2 Microglobulina, Aminoacilasa 1 y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 19 pacientes, unos resultados totales «4» aumentados en 15 pacientes que padecen cáncer colorrectal, mientras que la valoración sólo de Ezrina Beta-2 Microglobulina, Aminoacilasa 1 o ACE aumentaba respectivamente en 3, 4, 3 y 9 pacientes solamente.

La asociación de los marcadores tumorales Ezrina, Beta-2 Microglobulina, Aminoacilasa 1, Proteasoma 20S, L-FABP, PAP, E-Cadherina y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 19 pacientes que padecen cáncer colorrectal, unos resultados totales «8» aumentados en 17 pacientes, mientras que la valoración sólo de Ezrina, Beta-2 Microglobulina, Aminoacilasa 1, Proteasoma 20S, L-FABP, PAP, E-Cadherina o ACE aumentaba respectivamente en 3, 4, 3, 6, 5, 3, 1 y 9 pacientes solamente.

Tabla 10

Patología	Identificador de muestra	Fase	TNM	Ezrina	Resultado total 2 ^a	Resultado total 4 ^b	Resultado total 8 ^c
				ng/ml			
CCR+	CLSP047/F0	I	T1N0M0	9,06	0,27	0,47	0,33
CCR+	CLSP076/F0	II	T3N0M0	8,58	0,28	0,45	1,95
CCR+	GHBD020/FC	II	T3N0M0	21,36	0,57	0,57	1,83
CCR+	GHBD023/F0	II	T3N0M0	7,95	0,24	2,85	1,62
CCR+	GHBD025/FC	II	T3N0M0	5,99	0,23	3,33	1,91
CCR+	GHBD029/FC	II	T3N0M0	13,34	9,52	4,96	2,73
CCR+	CBSE005/F0	III	T3N1M0	20,25	121,20	60,62	42,13
CCR+	CLSP050/F0	III	T2N1M0	11,71	0,36	4,11	3,52
CCR+	CLSP072/F0	III	T3N1M0	9,25	0,17	7,79	3,99
CCR+	CLSP089/F0	III	T4N2M0	8,92	0,32	21,60	11,11
CCR+	CLSP090/F0	III	T1N1M0	18,46	0,45	0,36	0,36
CCR+	GHBD019/F0	III	T3N1M0	7,81	0,25	4,87	2,69
CCR+	CBSE008/F0	IV	T4N3M1	9,78	27,55	13,86	7,02
CCR+	CBSE021/F0	IV	T4N2M1	18,85	0,47	162,85	83,63
CCR+	CBSE026/F0	IV	T4N1M1	52,64	10,02	135,24	72,28
CCR+	CLSP068/F0	IV	TxNxM1	392,37	74,03	261,23	142,23
CCR+	CLSP156/F0	IV	T4N0M1	12,19	0,39	30,46	17,03
CCR+	CSEM005/F1	IV	T4N2M1	89,38	16,80	8,60	7,07
CCR+	CLSP153/F0	III/IV	T3N2Mx	12,48	0,35	13,40	8,91
CCR -	N017197/F0			13,0	0,24	0,27	0,18
CCR -	N017250/F0			8,4	0,16	0,14	0,24
CCR -	N017349/F0			19,7	0,37	0,18	0,22
CCR -	N018640/F0			9,0	0,17	0,14	0,23

ES 2 570 627 T3

Patología	Identificador de muestra	Fase	TNM	Ezrina	Resultado total 2 ^a	Resultado total 4 ^b	Resultado total 8 ^c
				ng/ml			
CCR -	N030068/F0			11,8	0,31	0,36	0,35
CCR -	N143574/F0			17,2	0,39	0,62	0,51
CCR -	N146628/F0			12,1	0,32	0,49	0,47
CCR -	N148324/F0			15,9	0,37	0,48	0,51
CCR -	N314199/F0			5,3	0,19	0,24	0,33
CCR -	N314324/F0			13,0	0,38	0,25	0,48
CCR -	N417852/F0			26,6	0,60	0,41	0,49
CCR -	N491079/F0			5,8	0,40	0,25	0,34
CCR -	N491124/F0			8,5	0,16	0,19	0,15
CCR -	N491722/F0			23,7	0,95	0,53	0,43
CCR -	N518569/F0			14,5	0,37	0,26	0,48
CCR -	N835827/F0			13,2	0,33	0,41	0,38
CCR -	N836221/F0			11,8	0,29	0,46	0,38
CCR -	N836301/F0			10,5	0,27	0,52	0,61
CCR -	N744056/F0			21,0	0,50	0,25	0,35
CCR -	N835886/F0			14,9	0,36	0,18	0,33
CCR -	N835931/F0			10,4	0,30	0,15	0,30
CCR -	N836125/F0			22,9	0,52	0,26	0,30
Límite				26,60	0,95	0,62	0,61

a : asociación Ezrina y Aminoacilasi 1
b : asociación Ezrina, beta-2 microglobulina, Aminoacilasi 1 y ACE
c : asociación Ezrina, beta-2 microglobulina, Aminoacilasi 1, Proteasoma 20S, L-FABP, PAP, E-cadherina y ACE

Ejemplo 5: Valoración de los marcadores tumorales en las heces

5 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 4°C. El sobrenadante se conserva a -30°C hasta la valoración.

10 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.

15 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

20 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.

25 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).

5 Les células se mantienen a 37°C, en una estufa con un 5% de CO₂.

2. Técnica ELISPOT

10 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 11 siguiente que da los anticuerpos utilizados en ELISPOT), 100 µl por pocillo, en PBS estéril, durante una noche a +4°C. 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 10⁵ 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 37°C en atmósfera húmeda al 5% de CO₂, 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 11), 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.

25 Tabla 11

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

3. Resultados

30 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.

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

1. Metodología

40 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 90°C durante 40 min, después dejando enfriarse hasta temperatura ambiente durante 30 min. Las peroxidasa endógenas se inhiben por incubación en TBS-T que contiene un 3% de H₂O₂, durante 5 min. Las láminas se saturan después mediante un 3% de BSA en TBS-T, durante 1h a 37°C, en cámara húmeda.

45 Después, se incuban las láminas durante 2h con el anticuerpo primario anti-Inhibidor de la elastasa de leucocitos (clon 3D9C2) o anti-Plastina-I (clon 8D6A3) diluido a 10µg/ml en TBS-T que contiene un 3% de BSA (incubación a 37°C 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.

60 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 12.

5

Tabla 12

Diagnóstico	Histología y caracterización genética	Marcado en las células epiteliales	Marcado en el estroma
Tumor maligno	Adenocarcinoma conservado	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma 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	Adenocarcinoma conservado	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma LOH	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma 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	Adenocarcinoma LOH	Negativo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma LOH	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma MSI alta	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma MSI alta	Positivo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma Coloide	Negativo	Negativo
Tumor maligno	Adenocarcinoma 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 adenocarcinomas cólicas (+ en 8/11 pacientes). No hay marcado en el estroma.

10

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 adenocarcinoma 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 13 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.

15

Tabla 13

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	++	+

20

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.

5 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 adenocarcinoma 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 14 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 14

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	++	++	+
3891	++	++	0
4054	+	++	0
4322	+++	+++	+
445	+	++	+
4474	+	++	+
4792	++	++	+
4958	+	+	+
5101	+	+	++
5318	+++	++	0
5374	+	+	0
5472	++	++	+
6340	++	++	+
6353	++	++	++

15 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

20 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 15.

25

Tabla 15

Diagnóstico	Histología y caracterización genética	Marcado en las células epiteliales	Marcado en el estroma
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma conservado	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma 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	Adenocarcinoma conservado	+	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma LOH	++	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma MSI alto	+	Negativo
Colon normal	Mucosa normal	+	Despegado
Colon normal	Mucosa normal	+	Despegado
Tumor maligno de colon	Adenocarcinoma 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	Adenocarcinoma LOH	+	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarcinoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarcinoma LOH	++	Negativo
Tumor maligno del recto	Adenocarcinoma LOH	++	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
Tumor benigno del recto	Adenoma displasia de bajo grado	++	Negativo

Los resultados en la tabla muestran que:

5 - 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 adenocarcinomas cólicos (++ en 6/9 pacientes y 3 bajos +, incluyendo los adenocarcinomas coloides cólicos). No hay ningún marcado en el estroma.

10 - 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 adenocarcinomas rectales (++ en 3/4 pacientes, 1 bajo +). No hay ningún marcado en el estroma.

Referencias bibliográficas

- 15
1. Potter JD. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst* (1999) 91:916-932.
 2. Faivre J. *Epidémiologie et dépistage du cancer colorectal*. (2001) Ed. Springer.
 3. Algrain M et al. Ezrin contains cytoskeleton and membrane binding domains accounting for its proposed role as a membrane-cytoskeletal linker. *J Cell Biol* (1993) 120:129-139.
 - 20 4. Jiang WG et al. Cytokine regulation of ezrin expression in the human colon cancer cell line HT29. *Anticancer Res* (1996) 16:861-865.
 5. Hiscox S et al. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci* (1999) 112:3081-3090.
 - 25 6. Xiao T et al. An approach to studying lung cancer-related proteins in human blood. *Mol Cell Proteomics* (2005) 4:1480-1486.

7. Remold-O'Donnell E et al. Sequence and molecular characterization of human monocyte/neutrophil elastase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992) 89:5635-5639.
8. Cooley J et al. The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry* (2001) 40:15762-15770.
- 5 9. Anders MW et al. Aminoacylases. *Adv Pharmacol* (1994) 27:431-448.
- 10 10. Lorentz K et al. A new method for the assay of aminoacylase: élaboration of a fixed-incubation method for routine measurements. *Clin Chim Acta* (1975) 63:263-269.
11. Lorentz K et al. Clinical application of a new method for the détermination of aminoacylase in human sérum. *Clin Chim Acta* (1975) 63:271-274.
- 10 12. Cook RM et al. Human aminoacylase-1. Cloning, sequence, and expression analysis of a chromosome 3p21 gene inactivated in small cell lung cancer. *J Biol Chem* (1993) 268:17010-17017.
13. Miller YE et al. Lack of expression of aminoacylase-1 in small cell lung cancer. Evidence for inactivation of genes encoded by chromosome 3p. *J Clin Invest* (1989) 83:2120-2124.
14. Balabanov S et al. Tumour-related enzyme alterations in the clear cell type of human renal cell carcinoma identified by two-dimensional gel electrophoresis. *Eur J Biochem* (2001) 268:5977-5980.
- 15 15. Chan L et al. Human liver fatty acid binding protein cDNA and amino acid sequence. Functional and evolutionary implications. *J Biol Chem* (1985) 260:2629-2632.
16. Das R et al. Expression pattern of fatty acid-binding proteins in human normal and cancer prostate cells and tissues. *Clin Cancer Res* (2001) 7:1706-1715.
- 20 17. Stulik J et al. Proteome study of colorectal carcinogenesis. *Electrophoresis* (2001) 22:3019-3025.
18. Yamazaki T et al. Liver fatty acid-binding protein is a new prognostic factor for hepatic resection of colorectal cancer metastases. *J Surg Oncol* (1999) 72:83-87.
19. Sweetser DA et al. The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships. *J Biol Chem* (1987) 262:16060-16071.
- 25 20. Pelsers MM et al. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* (2003) 36:529-535.
21. Xiao R et al. Dietary exposure to soy or whey proteins alters colonie global gene expression profiles during rat colon tumorigenesis. *Mol Cancer* (2005) 4:1-17.
22. Niederkofler EE et al. Novel mass spectrometric immunoassays for the rapid structural characterization of plasma apolipoproteins. *J Lipid Res* (2003) 44:630-639.
- 30 23. Hortin GL. The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clin Chem* (2006) 52:1223-1237.
24. Engwegen JY et al. Identification of serum proteins discriminating colorectal cancer patients and healthy controls using surface-enhanced laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry. *World J Gastroenterol* (2006) 12:1536-1544.
- 35 25. Zhang Z et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the détection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* (2004) 64:5882-5890.
26. Hachem H et al. Serum apolipoproteins A-I, A-II and B in hepatic metastases. Comparison with other liver diseases: hepatomas and cirrhosis. *J Clin Chem Clin Biochem* (1986) 24:161-166.
- 40 27. Lin CS et al. Human plastin genes. Comparative gene structure, chromosome location, and differential expression in normal and neoplastic cells. *J Biol Chem* (1993) 268:2781-2792.
28. Delanote V et al. Plastins: versatile modulators of actin organization in (patho)physiological cellular processes. *Acta Pharmacol Sin* (2005) 26:769-779.
- 45 29. Arrigo AP et al. Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome). *Nature* (1988) 331:192-194.
30. Lavabre-Bertrand T et al. Plasma proteasome level is a potential marker in patients with solid tumors and hemopoietic malignancies. *Cancer* (2001) 92:2493-2500.
31. Nakahara S et al. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. *Apoptosis* (2005) 10:267-275.
- 50 32. Iurisci I et al. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* (2000) 6:1389-1393.
33. Schwartz MK. Enzymes as prognostic markers and therapeutic indicators in patients with cancer. *Clin Chim Acta* (1992) 206:77-82.
34. McCool DJ et al. Roles of calreticulin and calnexin during mucin synthesis in LS180 and HT29/A1 human colonic adenocarcinoma cells. *Biochem J* (1999) 341:593-600.
- 55 35. Iovanna JL et al. Serum levels of pancreatitis-associated protein as indicators of the course of acute pancreatitis. Multicentric Study Group on Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* (1994) 106:728-734.
36. Motoo Y et al. Serum levels of pancreatitis-associated protein in digestive diseases with special reference to gastrointestinal cancers. *Dig Dis Sci* (1999) 44:1142-1147.
37. Herlyn M et al. Colorectal carcinoma-specific antigen: detection by means of monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1979) 76:1438-1442.
- 60 38. Armstrong A et al. EpCAM: A new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol Ther* (2003) 2:320-326.
39. Herlyn D et al. IgG2a monoclonal antibodies inhibit human tumor growth through interaction with effector cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) 79:4761-4765.
- 65 40. Abe H et al. Preparation of recombinant MK-1/Ep-CAM and establishment of an ELISA system for determining soluble MK-1/Ep-CAM levels in sera of cancer patients. *J Immunol Methods* (2002) 270:227-233.

41. Barak V et al. Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clinical biochemistry* (2004) 37:529-540.
42. Kim H et al. Rapid fecal cytokeratin-19 test and fecal occult blood test in screening for gastrointestinal diseases. *Ann Clin Lab Sci* (2006) 36:294-298.
- 5 43. Roca F et al. Prognostic value of E-cadherin, beta-catenin, MMPs (7 and 9), and TIMPs (1 and 2) in patients with colorectal carcinoma. *J Surg Oncol* (2006) 93:151-160.
44. Damsky CH et al. Identification and purification of a cell surface glycoprotein mediating intercellular adhesion in embryonic and adult tissue. *Cell* (1983) 34:455-466.
45. Katayama M et al. Soluble E-cadherin fragments increased in circulation of cancer patients. *Br J Cancer* (1994) 69:580-585.
- 10 46. Wilmanns C et al. Soluble serum E-cadherin as a marker of tumour progression in colorectal cancer patients. *Clinical & experimental metastasis* (2004) 21:75-78.
47. Gold P et al. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J Exp Med* (1965) 122:467-481.
48. Duffy MJ. Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clin Chem* (2001) 15 47:624-630.
49. Kim Y et al. Gastrointestinal tract cancer screening using fecal carcinoembryonic antigen. *Ann Clin Lab Sci* (2003) 33:32-38.
50. Magnani JL et al. Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Res* (1983) 43:5489-5492.
- 20 51. Holmgren J et al. Détection by monoclonal antibody of carbohydrate antigen CA 50 in serum of patients with carcinoma. *Br Med J (Clin Res Ed)* (1984) 288:1479-1482.
52. Klug TL et al. Monoclonal antibody immunoradiometric assay for an antigenic déterminant (CA 72) on a novel pancarcinoma antigen (TAG-72). *Int J Cancer* (1986) 38:661-669.
53. Kuusela P et al. Comparison of a new tumour marker CA 242 with CA 19-9, CA 50 and carcinoembryonic antigen (CEA) in digestive tract diseases. *Br J Cancer* (1991) 63:636-640.
- 25 54. Holland M et al. [Serum testosterone: a possible marker for colorectal cancer]. *Medicina (B Aires)* (1993) 53:117-123.
55. Model F. et al. World Congress on Gastrointestinal Cancer "Détection of methylated DNA in plasma from colorectal cancer patients and controls by real-time PCR analysis of Septin 9". (2006)
- 30 56. Ebert MP et al. Aristaless-like homeobox-4 gene methylation is a potential marker for colorectal adenocarcinomas. *Gastroenterology* (2006) 131:1418-1430.
57. Bianco C et al. Identification of cripto-1 as a novel serologic marker for breast and colon cancer. *Clin Cancer Res* (2006) 12:5158-5164.
- 35 58. Yasumatsu R et al. SERPINB1 upregulation is associated with in vivo complex formation with neutrophil elastase and cathepsin G in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006) 291:L619-L627.
59. Chevalier J et al. Biotin and digoxigenin as labels for light and electron microscopy in situ hybridization probes: where do we stand? *J Histochem Cytochem* (1997) 45:481-491.
- 40 60. Patterson SD. Mass spectrometry and proteomics. *Physiol Genomics* (2000) 2:59-65.
61. Kricka LJ. Nucleic acid detection technologies -- labels, stratégies, and formats. *Clin Chem* (1999) 45:453-458.
62. Tyagi S et al. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* (1996) 14:303-308.
63. Imperiale TF et al. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* (2004) 351:2704-2714.
- 45 64. Ahlquist DA et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* (2000) 119:1219-1227.
65. Wong IH. Qualitative and quantitative polymerase chain reaction-based methods for DNA methylation analyses. *Methods Mol Biol* (2006) 336:33-43.
66. Ebert MP et al. Hypermethylation of the TPEF/HPP1 gene in primary and metastatic colorectal cancers. *Neoplasia* (2005) 7:771-778.
- 50 67. Lofton-Day C et al. AACR Annual Meeting 2007 ; Los Angeles, U.S.A. ; Poster n° 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. (2007).
68. Métézseau P. La cytométrie en flux : pour l'étude de la cellule normale ou pathologique (Tome 1). (1988)
69. Mathieu J. et al. 2006. Fonctions cellulaires et métabolisme. In: (coordonnateurs : Ronot X. et al.). La cytométrie en flux. Tec & Doc, 255-298. ISBN 978-2-7430-0898-7
- 55 70. Cheynet V et al. Overexpression of HIV-1 proteins in *Escherichia coli* by a modified expression vector and their one-step purification. *Protein Expr Purif* (1993) 4:367-372.
71. Kohler G et al. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* (1975) 256:495-497.
- 60 72. Kohler G et al. Dérivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* (1976) 6:511-519.
73. Frank R et al. Simultaneous multiple peptide synthesis under continuous flow conditions on cellulose paper dises as segmental solid synthesis. *Tetrahedron* (1988) 44:6031-6040.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> bioMérieux
 Institut Curie
 5 Centre National de la Recherche Scientifique
 <120> Procedimiento de determinación de la Ezrina para el diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal
 <130> EZRINANDCO
 <150> FR07 05197
 <151> 2007-07-19
 10 <160> 23
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> artificial
 <220>
 <223> epitopo
 <400> 1
 Leu Ser Glu Gln Ile Gln Arg Ala Leu Gln Leu Glu
 1 5 10
 20 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 25 <223> epitopo
 <400> 2
 Leu Ala Ala Glu Leu Ala Glu Tyr Thr
 1 5
 <210> 3
 <211> 12
 30 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> epitopo
 <400> 3
 Gln Ile Gln Arg Ala Leu Gln Leu Glu Glu Glu Arg
 1 5 10
 35 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial
 40 <220>
 <223> epitopo
 <400> 4
 Asp Tyr Glu Glu Lys Thr Lys Lys
 1 5
 <210> 5
 <211> 6
 45 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> epitopo
 50 <400> 5
 Gln Ala Lys Phe Gly Asp
 1 5
 <210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 55 <213> artificial
 <220>
 <223> epitopo
 <400> 6
 Leu Glu Ala Asp Arg Met Ala Ala Leu
 1 5

ES 2 570 627 T3

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> epitopo
 <400> 7
 Leu Glu Glu Ala Arg Arg Arg Lys Glu Asp
 1 5 10
 <210> 8
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> epitopo
 15 <400> 8
 Leu Glu Ala Asp Arg Met Ala Ala Leu Arg Ala Lys
 1 5 10
 <210> 9
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 9
 atggagcagc tgagctcagc aaac 24
 25
 <210> 10
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Cebador
 <400> 10
 ctaaggggaa gaaaatctcc ccaa 24
 35
 <210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Cebador
 <400> 11
 cggagcgtct cccatgagtt tctccggcaa gta 33
 <210> 12
 <211> 49
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 12
 50 gaaatgcaga ctgtctaga tgcgcttct gatgcgcttg aagacaatg 49

 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 13
 atggcagaca attttcgct cc 22
 60
 <210> 14
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 570 627 T3

<220>
 <223> Cebador
 <400> 14
 ttatatcatg gtatatgaag cactgg 26
 5
 <210> 15
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Cebador
 <400> 15
 gcgaattcctt taagaaggag atatacatat gacgagcaaa ggtccggaag aggagcaccc 60
 atcg 64
 15 <210> 16
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador
 <400> 16
 gcaagctca gctgtcactg ggcagggc 28
 <210> 17
 25 <211> 424
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> I-FABP
 30 <400> 17
 ggtaccgaat tccgcgtttg acagcacttg gaaggtagac cggagtgaaa actatgacaa 60
 gttcatggaa aaaatgggtg ttaatatagt gaaaaggaag cttgcagctc atgacaattt 120
 gaagctgaca attacacaag aaggaaataa attcacagtc aaagaatcaa gcgcttttcg 180
 aacattgaa gttgtttttg aacttggtgt cacctttaat tacaacctag cagacggaac 240
 tgaactcagg gggacctgga gccttgaggg aaataaactt attggaaaat tcaaacggac 300
 agacaatgga aacgaactga atactgtccg agaaattata ggtgatgaac tagtccagac 360
 ttatgtgtat gaaggagtag aagccaaaag gatctttaa aaggattcta gagtcgacga 420
 gctc 424
 <210> 18
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 18
 40 atgggaattc aggagcagct gagctcagca a 31
 <210> 19
 <211> 30
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 19
 cgataagctt aagggaaga aaatctcccc 30
 50 <210> 20

ES 2 570 627 T3

<211> 62
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Cebador
<400> 20
gctggccatg ggcagcagcc atcatcatca tcatcacatg agtttctccg gcaagtacca 60

ac 62

<210> 21
10 <211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
15 <400> 21
gcacggatcc tagatgcgct tgctgatgcg ctggaagac 39

<210> 22
<211> 31
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 22
25 atgggaattc aggcagacaa ttttcgctc c 31

<210> 23
<211> 34
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 23
35 cgataagctt atatcatggt atatgaagca ctgg 34

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal por determinación del aumento de la concentración, con respecto a los valores de referencia determinados para los sujetos sanos, del marcador Ezrina en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de padecer cáncer colorrectal utilizando al menos un anticuerpo monoclonal anti-ezrina dirigido contra un epítipo de la ezrina seleccionado entre los epítipos de secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5, SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7 y SEQ ID nº 8.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la muestra biológica es una muestra distante del tumor.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que utiliza al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de secuencia SEC ID nº 1 y al menos otro anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo de la Ezrina seleccionado entre los epítipos de secuencia SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5 y SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por que utiliza al menos un anticuerpo monoclonal anti-Ezrina dirigido contra un epítipo de secuencia SEQ ID nº 1 y al menos otro anticuerpo dirigido contra un epítipo de secuencia SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que utiliza al menos un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo de la Ezrina de secuencia SEQ ID nº 2.
- 30 6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que consiste también en detectar al menos otro marcador tumoral seleccionado entre los marcadores siguientes: Inhibidor de la elastasa de los leucocitos, Aminoacilasa 1, proteína de unión a ácidos grasos de hígado, proteína de unión a los ácidos grasos intestinales, Apolipoproteína AI, Apolipoproteína AII y Plastina-I.
- 35 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que consiste también en detectar 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.
- 40 8. Utilización del procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de recaídas en el ámbito del cáncer colorrectal.
- 45 9. Epítipo de secuencia SEQ ID nº 1, SEQ ID nº 2, SEQ ID nº 3, SEQ ID nº 4 + SEQ ID nº 5, SEQ ID nº 6 + SEQ ID nº 7 o SEQ ID nº 8.

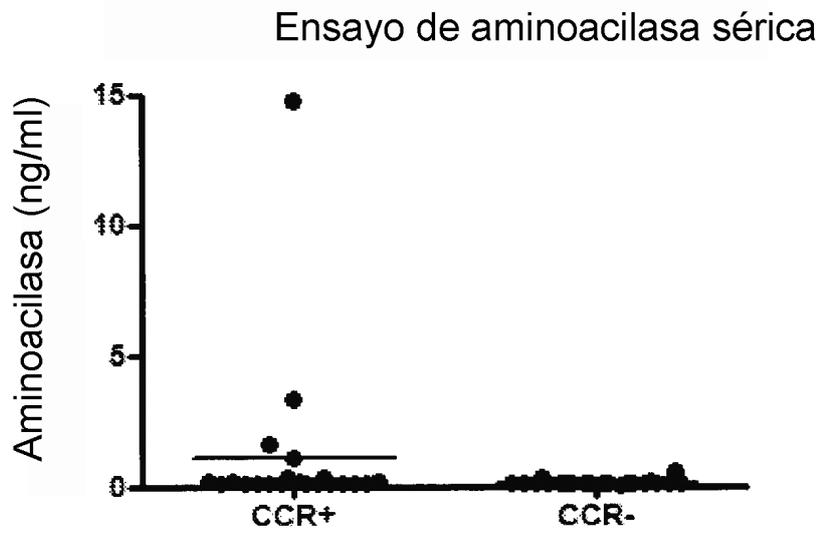


Figura 3

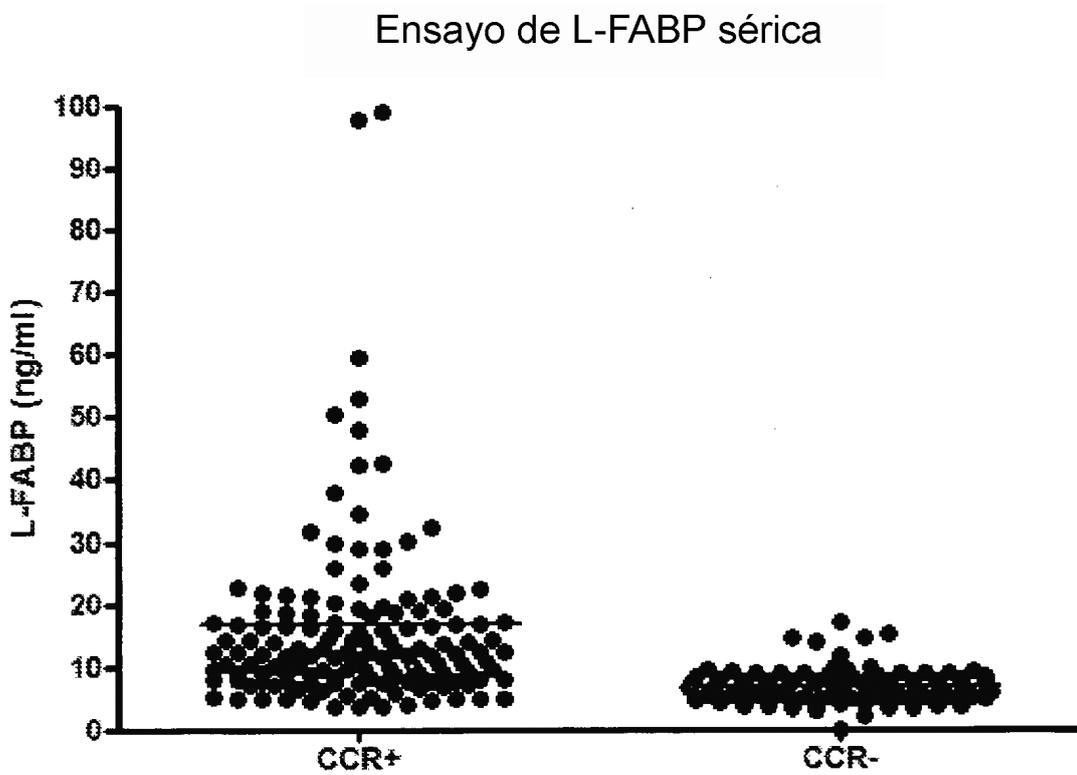
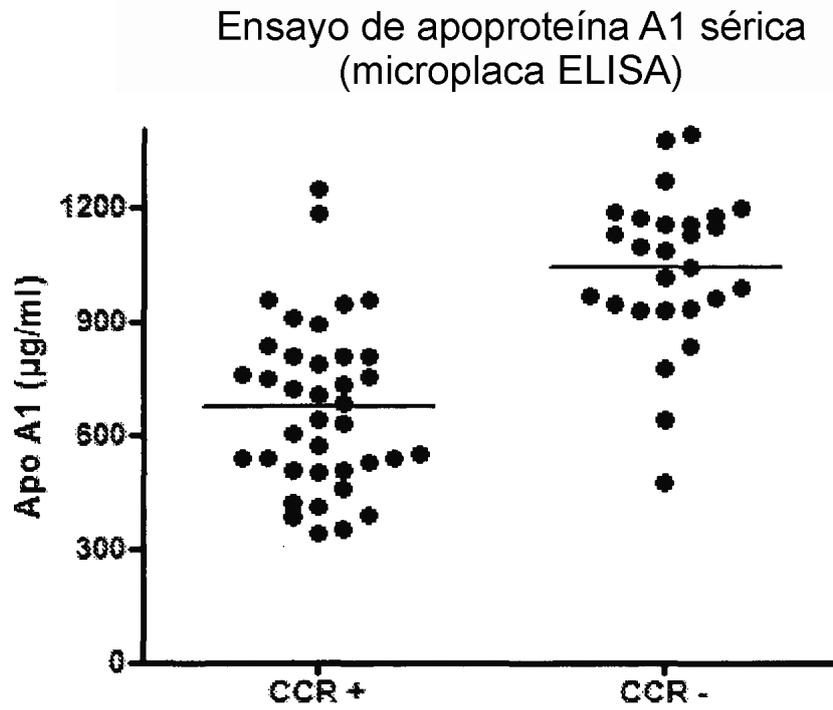


Figura 4

A



B

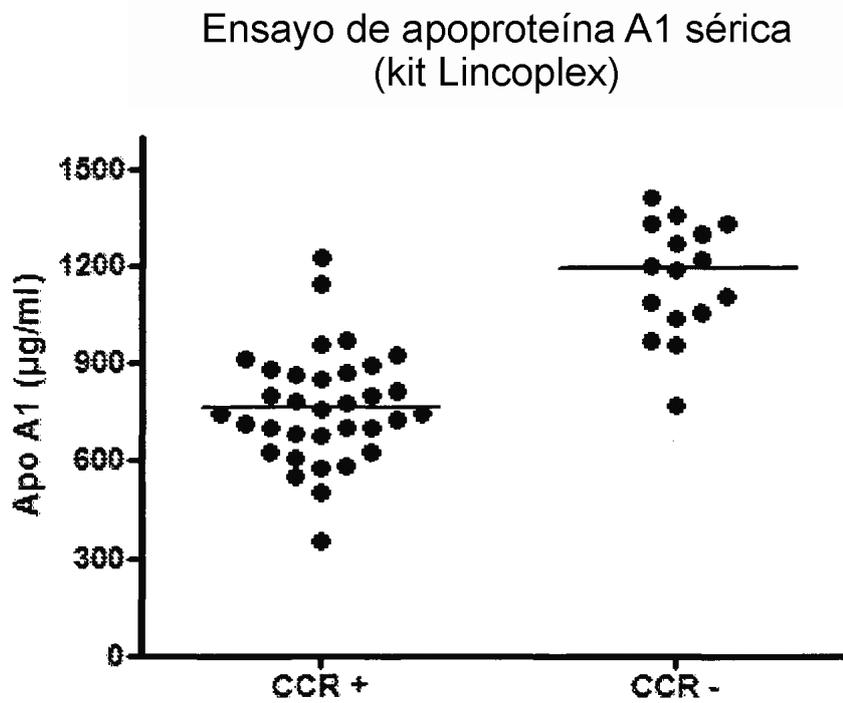


Figura 6

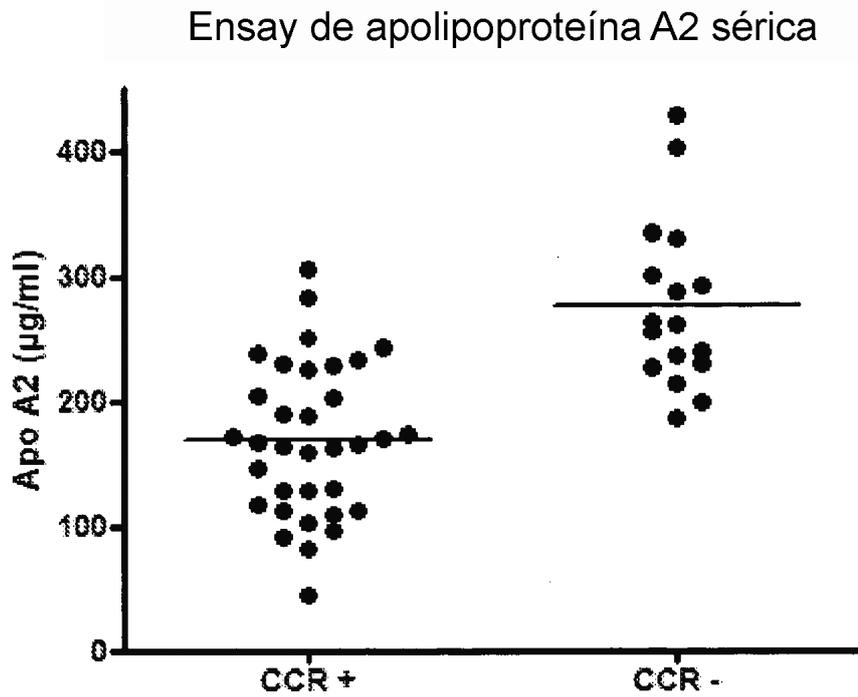


Figura 7

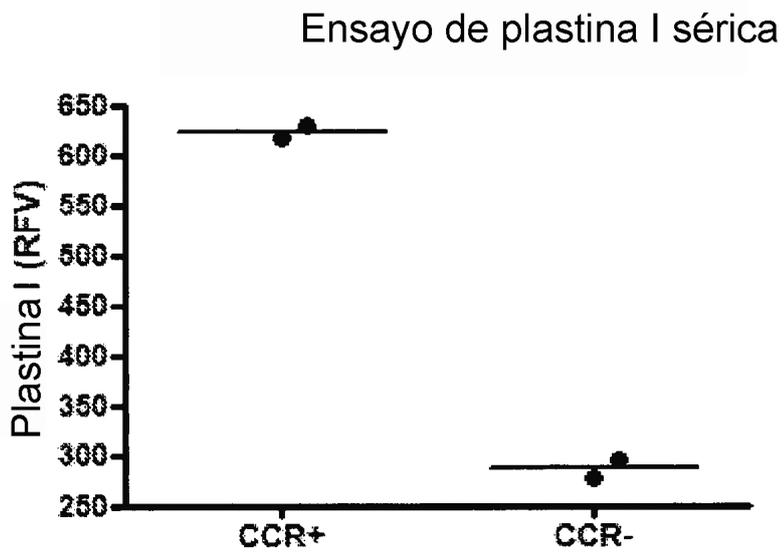


Figura 8

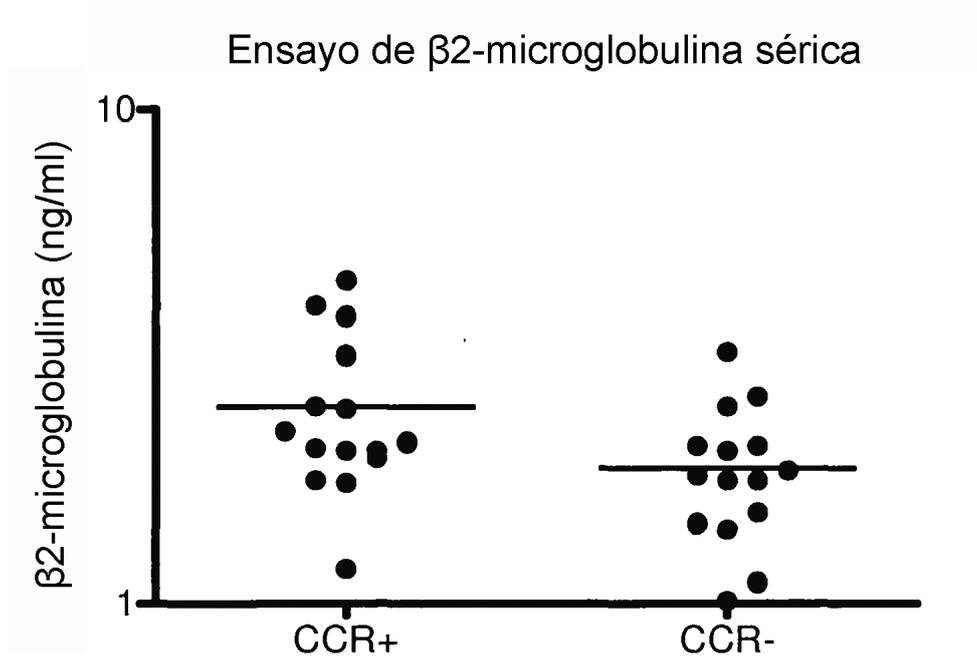


Figura 9

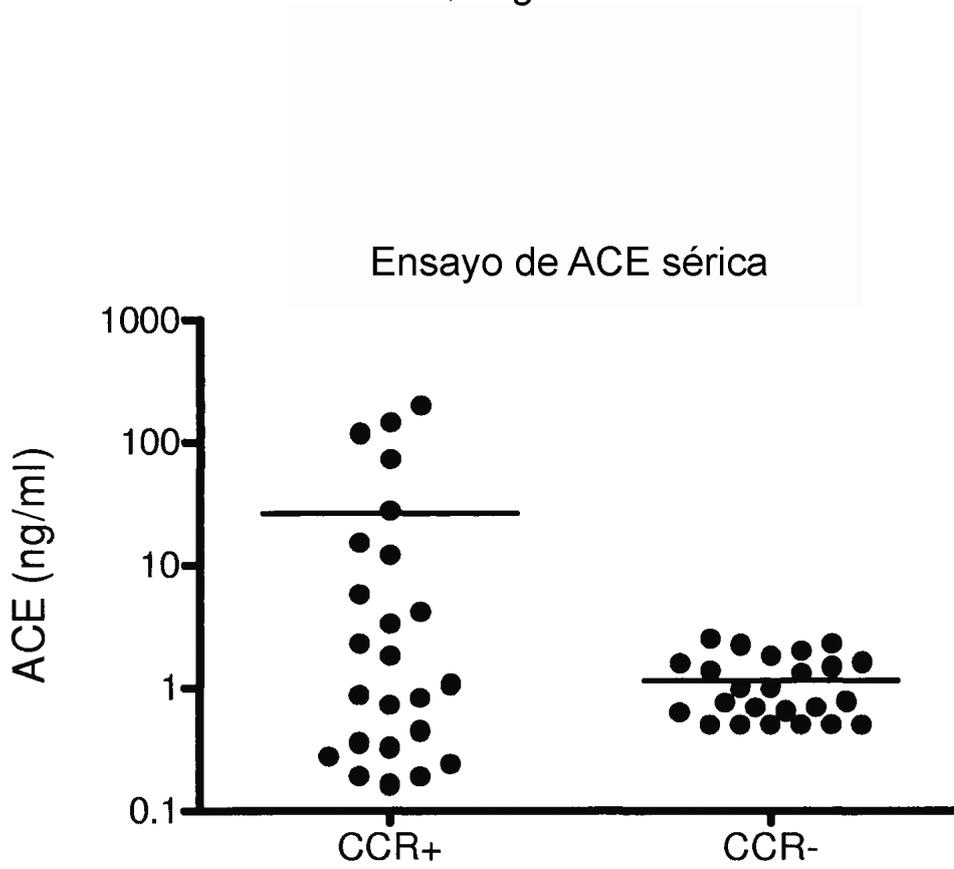


Figura 10

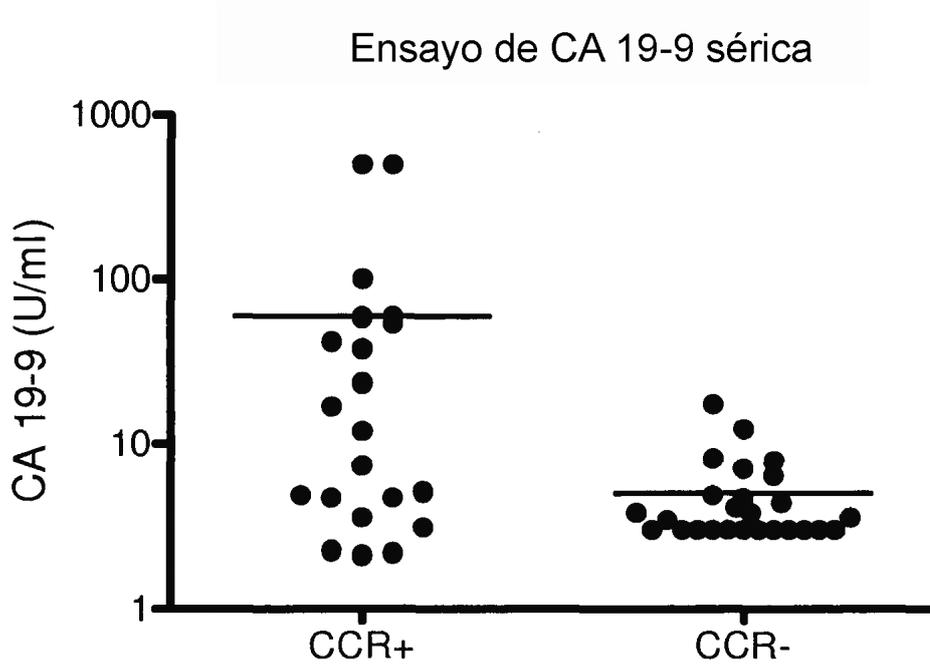


Figura 11

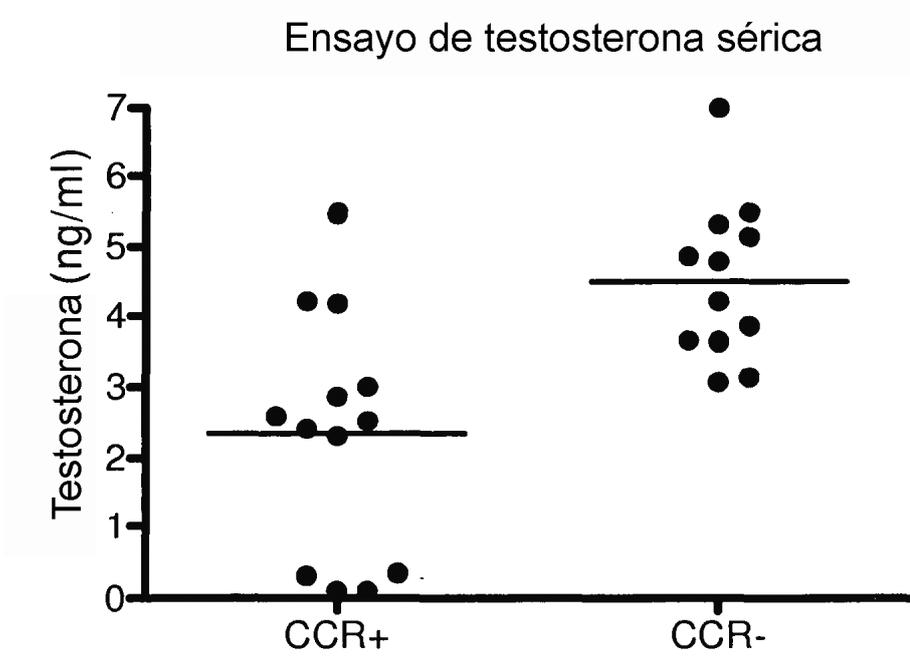


Figura 12

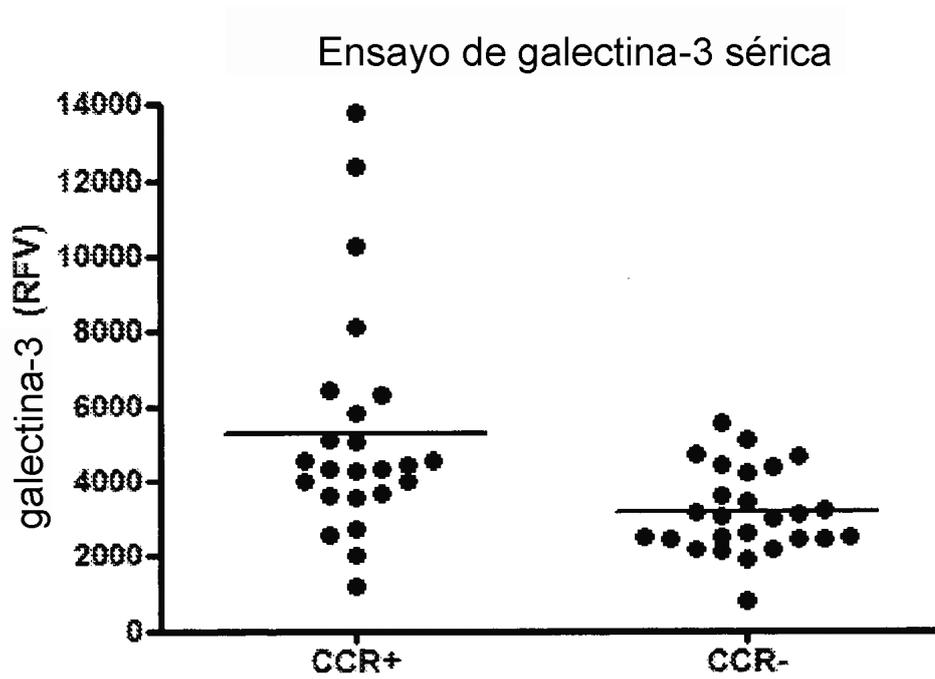


Figura 15

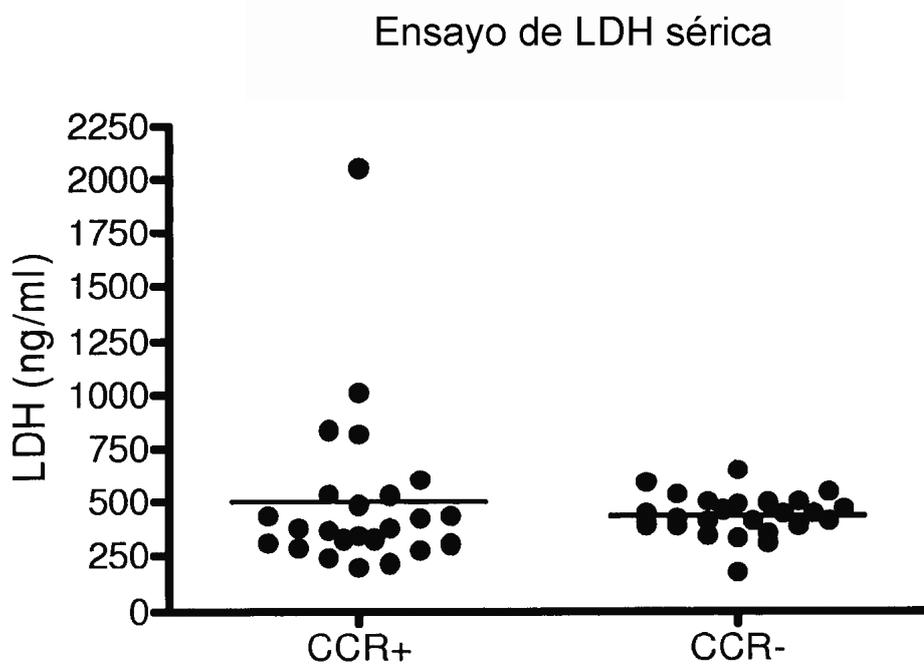
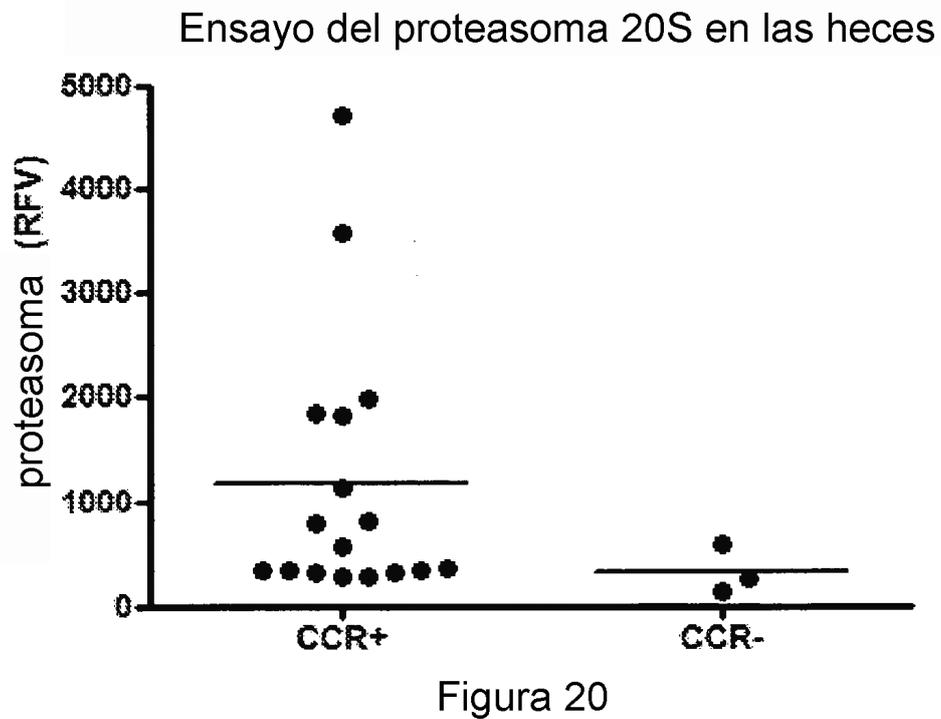
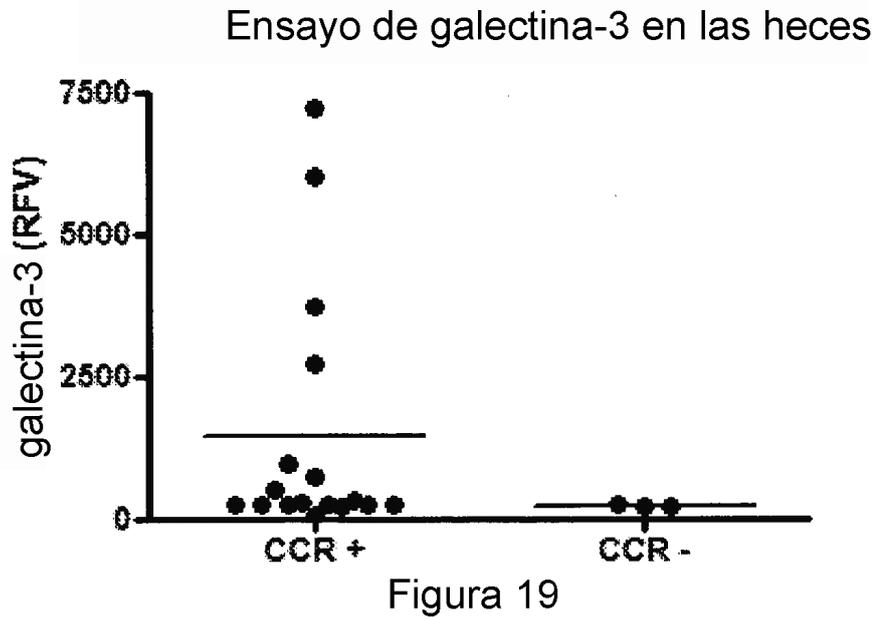


Figura 16



Secreción de los marcadores tumorales por las células cancerígenas

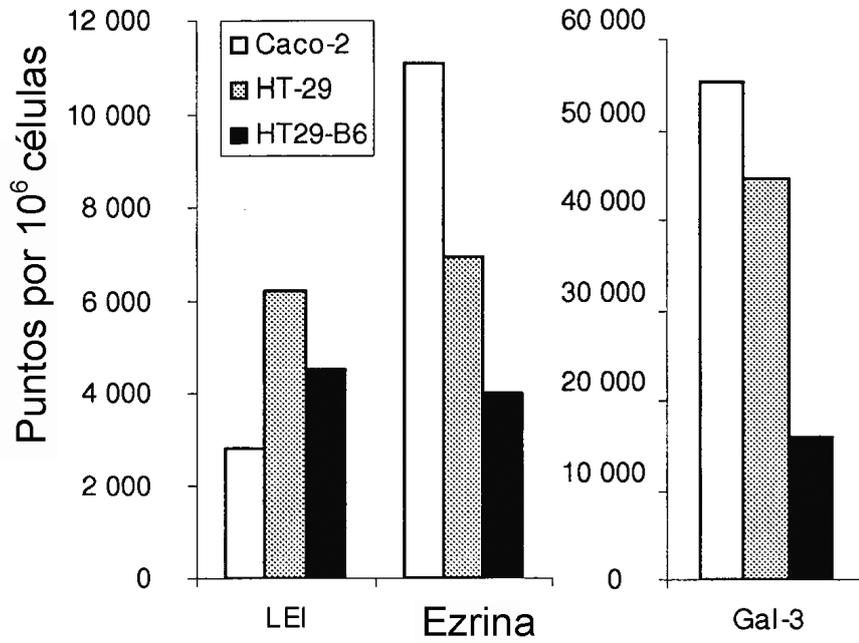


Figura 21