

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 354**

51 Int. Cl.:

C07K 16/44 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.04.2010 PCT/FR2010/050620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10112777**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 10723176 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2443152**

54 Título: **Procedimiento de análisis de la prodefensina-A6 para el diagnóstico in vitro del cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

03.04.2009 FR 0952192

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

03.12.2018

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'etoile, FR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 692 354 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de análisis de la prodefensina-A6 para el diagnóstico *in vitro* 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 determinación de la presencia de la prodefensina-A6 en una muestra biológica procedente de este paciente, pudiendo dicho procedimiento utilizarse tanto en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico y el pronóstico, como en el diagnóstico de las 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 a 875000 nuevos casos en 1996¹. En ambos sexos, es el cáncer que aparece con más frecuencia en los países occidentales, en los que se clasifica generalmente 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 de diagnóstico específico que sea precoz.

20 La detección del cáncer colorrectal se realiza actualmente en Europa con dos enfoques distintos: en primer lugar, con la ayuda de un ensayo paraclínico que consiste en buscar la presencia de sangre en las heces (Ensayo de Sangre Oculta en Heces, FOBT, comercializado por ejemplo bajo el nombre de Hémocult[®]). 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 ensayo positivo, seguida eventualmente de un tratamiento adecuado.

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

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

35 * el ensayo es también poco específico. La aparición de sangre en las heces puede estar relacionada con una afección no tumoral: hemorragias recto-cólicas, hemorroides, fistulas, etc.

En este caso, se debe realizar una investigación por colonoscopia con los inconvenientes descritos a continuación.

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

También se ha descrito unos ensayos inmunológicos específicos de la hemoglobina humana (Feca EIA[®], Heme Select[®], etc.). Constituyen, probablemente, un progreso con respecto a Hémocult[®] pero presentan, en esencia, los mismos problemas. Es así que InSure[™], comercializado por Enterix Inc., permite detectar un 87% de los pacientes que padecen CCR y un 47% de los que tienen pólipos precancerosos. Se trata de un ensayo de detección de la hemoglobina humana en las heces, y más particularmente de la porción de globina de esta molécula.

50 Una segunda estrategia de detección es la realización sistémica de una colonoscopia después de la edad de 50 años, que permite, 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 una conformidad de alrededor del 2% para la colonoscopia en los países de Europa que han establecido esta estrategia de detección). Existe un riesgo no insignificante (1‰) de perforación y hemorragia de colon y de fallecimiento (1/10000), así como un coste elevado para la salud pública. Además, la colonoscopia necesita una preparación cólica previa muy restrictiva, que explica en gran parte el mal cumplimiento.

55 Los marcadores tumorales determinables por inmunoensayos se han descrito desde hace mucho tiempo en el ámbito del cáncer colorrectal. Se trata, en particular, del antígeno carcinoembrionario (ACE) y del CA19-9.

60 El ACE se utiliza para el seguimiento. No se puede utilizar para la detección ni 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, es posible ganar en sensibilidad sin perder en especificidad asociando al ACE otro marcador tumoral tal como el CA19-9 o el CA72-4.

65 Las causas de las variaciones fisiológicas del CA19-9 son raras, pero otras afecciones benignas (hepatobiliares, pancreáticas) o malignas pueden inducir a un aumento del CA19-9. Este marcador, tomado aisladamente, no presenta ya, por lo tanto, ningún interés para el diagnóstico. Sin embargo, estando su concentración sérica

correlacionada con el tamaño del tumor y con la presencia de la metástasis, puede permitir también un seguimiento terapéutico o la puesta en evidencia precoz de recidivas.

Por otro lado, se han propuesto unos ensayos comerciales tales como:

➤ Colopath®/ColorectAlert^{MD}, comercializado por Ambrilia, es un ensayo 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. El ensayo Colopath®/ColorectAlert^{MD} implica la aplicación de mucosa rectal en una tira de ensayo 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 de fase precoz y el 49% en cualquier fase.

➤ COLARIS, comercializado por Myriad Genetics, es un ensayo de detección en la sangre de mutaciones en los genes MLH1 y MSH2 para la detección de cánceres hereditarios de 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 del ensayo es elevado.

➤ DR-70[®], comercializado por AMDL, es un ensayo 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 (análisis del antígeno DR-70). La revelación se realiza por reacción enzimática (anticuerpos acoplados con la biotina y la estreptavidina). Una reacción coloreada indica la presencia de cáncer.

La solicitante ha puesto ahora en evidencia, de manera sorprendente, un nuevo marcador de adenocarcinoma, el cual se libera por los tumores cólicos malignos fuera de los tejidos cancerosos y es característico de estos tumores, de manera que puede detectarse tanto en las muestras biológicas distantes de los tumores malignos, como en los tumores en sí mismos.

Así, la presente invención tiene por primer objeto un 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 proteico prodefensina-A6 en unas muestras biológicas procedentes de pacientes sospechosos de estar afectados de cáncer colorrectal, y preferentemente distantes de los tumores que utilizan un anticuerpo monoclonal específico de la prodefensina-A6 que reconoce el epítipo 1 de SEQ ID nº 6.

Se refiere también 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 un ensayo simple que consiste en buscar la presencia de la prodefensina-A6 en una muestra biológica extraída en un paciente, preferentemente distante del potencial tumor. En efecto, la solicitante ha mostrado, de manera inesperada, que los tumores cólicos no sólo segregaban específicamente la prodefensina-A6, sino sobre todo que la liberaba fuera del tejido canceroso, como se pondrá en evidencia de manera más detallada a continuación, y 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.

La determinación de la presencia de la prodefensina-A6 en una muestra biológica distante o no del tumor permite entonces concluir en la patología buscada. Una de las ventajas del procedimiento de la invención reside, por lo tanto, en la posibilidad de utilizar una muestra distante del tumor potencial a título de muestra de diagnóstico, lo que permite un diagnóstico simple y no invasivo, mientras que un diagnóstico tisular necesita una biopsia extraída de manera invasiva. En efecto, el estudio de marcadores tisulares, por ejemplo sobre un corte de tejido (inmunohistoquímica), puede presentar un interés de pronóstico, pero no tiene ningún interés para la detección o el diagnóstico del cáncer colorrectal.

Las defensinas son una familia de péptidos antimicrobianos implicados en la defensa del huésped contra los ataques microbianos. Están constituidas de 30 a 40 aminoácidos y tienen la propiedad de disgregar selectivamente las membranas. Como otras proteínas eucariotas, las defensinas pueden estar presentes en forma de proteína madura o en forma de precursor.

Un precursor, también denominado proteína precursora, está constituido de un propéptido y de una parte madura. Así, la prodefensina A6 es la proteína precursora de la proteína madura defensiva A6, y está constituida de 100 aminoácidos y comprende un péptido señal (aminoácidos 1-19), el propéptido (aminoácidos 20-65) y la proteína madura defensiva A6 (aminoácidos 66-100).

De manera general, las proteínas precursoras se han considerado durante mucho tiempo como siendo únicamente unas moléculas metabólicas. Sin embargo, un cierto número de ejemplos recientes, en particular en el campo de los

neuropéptidos, indican que, en algunas situaciones, las proteínas precursoras tienen una actividad biológica propia y disociada de la del péptido maduro que pueden generar. Claramente, la secuencia de las proteínas precursoras incluye la de las proteínas maduras, por ejemplo la secuencia de las prodefensina incluye la de las defensinas, pero sus puntos isoeléctricos y pesos moleculares son diferentes. Las defensinas y prodefensinas se tienen que considerar, por lo tanto, como dos proteínas diferentes.

Las defensinas alfa 5³ y alfa 6⁴ se producen esencialmente por las células de Paneth del intestino delgado. Los ARNm de las defensinas alfa 5 y 6 se sobreexpresan en el tejido cólico en caso de enfermedad de Crohn⁵. La defensina alfa 6 se ha identificado como marcador potencial del cáncer de colon por Nam *et al.*⁶. Nam *et al.* han desarrollado un ensayo ELISA por competición que analiza específicamente la defensina alfa 6. Han definido un umbral (30 ng/ml) más allá del cual los pacientes se diagnosticaban por padecer un cáncer colorrectal. Durante un análisis de 18 sueros de donantes sanos y de 49 sueros de cáncer, han obtenido una sensibilidad de diagnóstico del 69,4% para una especificidad de diagnóstico del 83,3%. No se ha hecho ninguna mención en este documento sobre el precursor de la defensina alfa 6, la prodefensina alfa 6.

Así, el precursor de la defensina alfa 6, la prodefensina-A6 (nº Swiss Prot Q01524), no se ha descrito jamás por ser útil como marcador en el ámbito de cáncer y, en particular, del cáncer colorrectal y como pudiendo analizarse en una muestra biológica distante o no del tumor maligno.

Por determinación de la presencia de la proteína precursora, se entiende la determinación del precursor más allá de los valores de referencia determinados para los pacientes sanos. El precursor buscado puede ser el precursor intacto de 100 aminoácidos, la proteína precursora sin el péptido señal (aminoácidos 20 a 100), o el propéptido solo (aminoácidos 20 a 65). Puede también ser unos fragmentos de estos últimos, tales como unos fragmentos del propéptido, con la exclusión de la proteína madura (aminoácidos 66-100) y de los fragmentos de esta.

Según un modo de realización particular de la invención, se determina la presencia del precursor de la prodefensina-A6, sin el péptido señal. La secuencia descrita para este precursor en la base de datos Swiss-Prot es la SEQ ID nº 1 (EPLQAEDDPLQAKAYEADAQEQRGANDQDFAVSFAEDASSLRALGSTRAFTCHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINH RFCCL; que corresponde a los aminoácidos 20-100). Preferentemente, se determina la presencia del propéptido que tiene el mismo al menos la secuencia SEQ ID nº 2 (EPLQAEDDPLQAKAYEADAQEQRG ANDQDFAVSFAEDASSLRALG) y como máximo la secuencia SEQ ID nº 1.

Como es bien conocido por el experto en la materia, existen unos polimorfismos proteicos, y las secuencias dadas anteriormente son sólo indicativas. Son las secuencias de consenso indicadas en la base de datos Swiss-Prot, pero pueden existir unas sustituciones de aminoácidos en porcentaje que se analizará por el experto en la materia para considerar que se trata de la misma proteína. Asimismo, el sitio de escisión del propéptido al aminoácido 65 es teórico y se da sólo a título indicativo.

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

Por muestra biológica en la que se realiza 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, de biopsias de este tumor, de ganglios linfáticos, de 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 total o sus derivados, por ejemplo suero o plasma, las orinas, la saliva, y los derrames, 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, los derrames y las células purificadas a partir de estas muestras líquidas.

El procedimiento de la invención se puede mejorar detectando además la prodefensina-A6, al menos otro marcador tumoral, llegado el caso también liberado por los tumores cólicos fuera de los tejidos cancerosos. Así, la combinación de al menos dos marcadores permite mejorar la especificidad y la sensibilidad del ensayo de diagnóstico del cáncer colorrectal.

Así, otro objeto de la invención consiste también en determinar la presencia de al menos otro marcador tumoral seleccionado del grupo de marcadores siguientes: Inhibidor de Elastasa Leucocitaria, Ezrina, Aminoacilasa 1, Proteína de Unión a Ácidos Grasos del Hígado, Proteína de Unión a Ácidos Grasos del Intestino, Apolipoproteína AI, Apolipoproteína AII, Plastina-I, Microglobulina Beta 2, Protosoma 20S, Galectina-3, Cadena B de la L-Lactato Deshidrogenasa, Calreticulina, Proteína 3 alfa Derivada de los Islotes Regeneradores, Transductor 1 de la Señal de Calcio Asociado a Tumores, Queratina tipo II Citoesquelética 8, Queratina tipo I Citoesquelética 18, Queratina tipo I Citoesquelética 19, Cadherina Epitelial, ACE, Villina, CA19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, Testosterona, TIMP-1, Cripto-1, Proteína Disulfuro Isomerasa, Intelectina-1, Citoqueratina 20, Proteína Tumoral Controlada Traslacionalmente, (Pro)defensina-A5, MIF, Piruvato Cinasa M2-PK, Calgranulina C, CD24, CCSA-3 (antígeno específico del cáncer de colon) y CCSA-4, la detección de fragmentos de ADN en la sangre que tiene unas

alteraciones específicas de su perfil de metilación, como por ejemplo el ADN metilado del gen AXL4 (Metilación del Gen de Homeobox-4 similar a Aristaless) o del 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 alteraciones específicas del perfil de metilación del ADN en las heces, la detección de hemoglobina humana en las heces.

Por marcador tumoral diferente de la prodefensina-A6, se entiende la proteína, el ARN mensajero o modificaciones específicas del gen correspondiente, como mutaciones o metilaciones. En otras palabras, sólo la prodefensina-A6 se busca únicamente en forma proteica, completa o en forma de fragmento.

El marcador tumoral del Inhibidor de la elastasa (nº Swiss Prot P30740, también denominado LEI, Serpin B1, Inhibidor de la Elastasa de Monocitos/Neutrófilos, 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 elastasa, 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, 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 mostrado, por su parte, de manera sorprendente, en la solicitud de patente WO2009/024691, que la concentración de esta proteína se aumentaba con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece un cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador Ezrina (Nº Swiss Prot P15311, también denominado p81, Citovilina o Vilina-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 intestinales⁹. W.G. Jiang y S. Hiscox¹⁰ 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 autores¹¹ 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.*¹² han utilizado un ensayo ELISA para cuantificar la ezrina plasmática de pacientes que padecen cáncer de pulmón. Sin embargo, no han observado diferencias con respecto a sujetos de control. La solicitante ha mostrado, por su parte, de manera sorprendente, en la solicitud de patente WO2009/019365, que la concentración de esta proteína aumentaba con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece un cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador aminoacilasa 1 (nº 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 aminoácidos¹³. Un análisis inmunoquímico de la actividad enzimática aminoacilasa se ha desarrollado a partir de 1975 por K. Lorentz *et al.*¹⁴ y se ha utilizado para determinar diferentes tejidos y sueros¹⁵. El estudio ha mostrado un aumento de la actividad aminoacilasa en caso de patologías hepáticas, pero no en caso de cáncer de colon. Por otro lado, el gen de la aminoacilasa 1 se ha modificado en el cromosoma 3p21.1¹⁶. La región 3p21.1 se reduce a la homocigota durante un cáncer de pulmón de pequeña célula, y en este caso, la expresión de la aminoacilasa se reprime o es indetectable¹⁷. Asimismo, S. Balabanov *et al.*¹⁸ han mostrado que la expresión de la aminoacilasa se reprimía en caso de cáncer de riñón. La solicitante ha mostrado, por su parte, de manera sorprendente, en la solicitud de patente WO2009/019366, que la concentración de esta proteína aumentaba con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador de la Proteína de Unión a ácidos grasos de hígado (nº Swiss Prot P07148, también denominado L-FABP, FABP1, FABPL, proteína Z o proteína transportadora de esteroles) pertenece a la familia de 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 1985¹⁹. 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 próstata, el nivel de expresión de los ARNm del L-FABP en las biopsias de tejido tumoral era 10 veces más elevado que en el tejido normal²⁰. 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 cólica normal, utilizando unas técnicas de electroforesis en 2 dimensiones²¹. 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 hígado²². En la solicitud de patente

WO00/33083, se ha sugerido que este marcador podía detectarse en fluidos biológicos de pacientes que padecen cáncer de colon. La solicitante ha confirmado, por su parte, en la solicitud de patente WO2009/019368, que la concentración de esta proteína disminuía con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes del tumor.

El marcador Proteína de unión a ácidos grasos de intestino (nº Swiss Prot P12104, también denominado I-FABP, FABP-2 o FABPI) se secuenció en 1987²³. 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 se expresa 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)²⁴. 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 sujetos²⁴. Para el cáncer de próstata, se ha mostrado que el nivel de expresión de los ARNm del I-FABP en las biopsias de tejido tumoral era 7 veces más elevado que en el tejido normal²⁰. En el modelo de inducción de tumor colorrectal por el azoximetano en la rata, el nivel de expresión de los ARNm de la 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)²⁵. La solicitante ha confirmado, por ejemplo en la solicitud de patente WO2009/019366, que la concentración de esta proteína aumentaba con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes del tumor.

Las apolipoproteínas son una familia de proteínas constituidas de aminoácidos polares que permiten el transporte de los 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 asociarse a algunas patologías²⁶. La concentración plasmática de las apolipoproteínas no es insignificante, del orden del mg/ml²⁷.

El marcador apolipoproteína AI (nº NCBI 490098, también denominado Apo A-I, Apo AI y Apo A1) es una proteína de 243 aminoácidos y de 28 kDa. Se sintetiza esencialmente por el hígado y el intestino. Esta proteína se ha mostrado sub-abundante en los sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal con respecto a los sujetos sanos, por SELDI-TOF²⁸. 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 Apo AI con otros marcadores proteicos. Por otro lado, este artículo precisa que el análisis 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 CCR²⁹. Hachem *et al.*³⁰, por su parte, han propuesto analizar la Apo AI en unos sueros de pacientes que han tenido cáncer de hígado tras metástasis de cáncer colorrectal. La solicitante ha mostrado, de manera sorprendente, que un análisis por inmunoensayo permite poner en evidencia la disminución de la concentración de esta proteína en los pacientes que padecen cáncer colorrectal, contrariamente a lo que avanzaba Engwegen *et al.*²⁸, que han podido poner en evidencia esta disminución únicamente utilizando la técnica SELDI-TOF. El análisis por inmunoensayo de Apo AI en las muestras biológicas es un buen procedimiento de diagnóstico del cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes del tumor en la medida en la que el análisis por inmunoensayo utilizado no es la turbidimetría como se utiliza por el equipo de Zhang *et al.*²⁹.

El marcador apolipoproteína AII, (nº 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 unida por un puente disulfuro. Como la apolipoproteína AI, la apolipoproteína AII se sintetiza esencialmente por el hígado y el intestino. Hachem *et al.*³⁰ también han determinado, además de Apo AI, Apo AII en sueros de pacientes que han tenido 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, en la solicitud de patente WO2009/019370, que la concentración de esta proteína disminuía con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que la disminución de la concentración de esta proteína en los pacientes que padecen cáncer colorrectal lo hace un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes del tumor.

El marcador I-plastina (nº Swiss Prot Q14651, también denominado I-plastin, Plastina Específica del Intestino o Plastin 1) pertenece a la familia de las plastinas humanas de las cuales se conocen tres representantes: la I-plastina, la L-plastina y la T-plastina. Algunos autores denominan 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 normales³¹. La utilización de 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 análisis de la L-plastina y de la T-plastina a nivel celular, y más particularmente el análisis de su ARNm. Sin embargo, a pesar de estas propiedades, no se ha realizado ningún trabajo anterior se ha realizado el interés de

las plaquetas en el ámbito del diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de una extracción de suero o de heces. Además, la I-plaquetina no se ha considerado nunca como un marcador potencial del cáncer³². La solicitante ha mostrado, de manera sorprendente, en la solicitud de patente WO2009/019369, que la concentración de esta proteína aumentaba con respecto a los valores de referencia determinados para los pacientes sanos, de manera que esta proteína es un buen marcador en las muestras biológicas procedentes de un paciente que padece un cáncer colorrectal, estando dichas muestras distantes o no del tumor.

El marcador beta 2 microglobulina (n° Swiss Prot P61769, también denominado $\beta 2$ Microglobulina, $\beta 2M$) es una proteína de baja masa molecular (de 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. Se observa también un aumento significativo durante otras enfermedades tales como el lupus eritematoso, la artritis reumatoide, el síndrome de Sjögren, las enfermedades malignas del sistema linfático (mieloma múltiple, linfoma de células B), algunas enfermedades virales (hepatitis o SIDA) y en los pacientes hemofílicos. Al filtrarse la $\beta 2$ microglobulina por los glomérulos renales y reabsorberse por los tubos contorneados proximales, su concentración sanguínea puede modificarse en caso de patologías renales. Es así que el análisis de la $\beta 2$ microglobulina se reserva generalmente para el diagnóstico de patologías renales, o para el 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 ubiquitiniladas³³. La proteasoma es un complejo molecular de 700 kDa constituido de 28 subunidades asociadas en 4 anillos de 7 subunidades. En el hombre, 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, la proteasoma tiene 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 de 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. Lavabre-Bertrand *et al.*³⁴ 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 P1 7931, también denominado Gal-3, Lectina 3 Específica de Galactosa, antígeno MAC-2, proteína de unión a IgE, lectina de 35 kDa, proteína 35 de unión a hidratos de carbono, 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 unas estructuras beta-galactosídicas de tipo N-acetil-lactosamina. Es una proteína con funciones múltiples implicada en diversas funciones biológicas, que incluye la adhesión de las células tumorales, la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis, la apoptosis, la progresión cancerosa metastásica³⁵. Diferentes trabajos han mostrado que Gal-3 podía complejarse con numerosas moléculas: ACE, IgE, laminina, mucina, Mac-2BP, LAMP1, LAMP2, fibronectina, etc. Irucci *et al.*³⁶ han descrito un análisis sérico de Gal-3. Gal-3 se capturaba sobre unas microplacas recubiertas de proteína de unión a Mac-2 (una proteína que se une 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 gastro-intestinales, de mama, de pulmón, de ovarios, de melanomas y de linfomas no-Hodgkinianos.

El marcador L-lactato deshidrogenasa cadena B (n° Swiss Prot P07195, también denominado LDH-B, Unidad Cardíaca de la LDH 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 denominada LDH-A, LDH Muscle Unit o LDH-M) en forma de heterotetrámeros. El análisis sérico 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 se recomienda 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 colon³⁷.

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 McCool *et al.*³⁸ han mostrado que la Calreticulina estaba implicada en la maduración de la mucina cólica MUC2. Un método de diagnóstico de CCR que utiliza un análisis de la Calreticulina en un tejido, las heces o un fluido corporal se describe en la solicitud de patente WO03/065003.

El marcador Proteína 3 alfa Derivada de Islotes Regeneradores (n° Swiss Prot Q06141, también denominado Reg III-alfa, Proteína 1 asociada a pancreatitis o Proteína 1 Asociada a Pancreatitis (PAP 1)) es una proteína poco expresada en el páncreas sano. Se sobreexpresa durante las fases agudas de pancreatitis y en algunos pacientes que sufren pancreatitis crónica. Aparece entonces en el líquido pancreático y en la circulación sanguínea³⁹. Motoo *et al.*⁴⁰ han mostrado por ensayo ELISA que el porcentaje de PAP1 sanguíneo aumentaba en algunos pacientes que padecen cáncer de colon, de estómago, de hígado o de páncreas, así como en caso de insuficiencia renal. Para ello,

han utilizado el ensayo ELISA (PANCEPAP) comercializado por la compañía Dynabio (La Gaude, Francia).

El marcador Transductor 1 de la Señal de Calcio Asociado a Tumores (N° Swiss Prot P16422, également appelé Proteína principal GA733-2 asociada a tumor gastrointestinal, antígeno de la superficie de células epiteliales, EpCAM, glicoproteína epitelial, EGP, antígeno asociado a adenocarcinoma, KSA, antígeno KS 1/4, glicoproteína Trop-1 de la superficie celular o antígeno CD326) se ha caracterizado en 1979 por su capacidad para ser reconocido por un anticuerpo dirigido contra unas células de cáncer colorrectal⁴¹. Esta proteína es conocida bajo diferentes nombres, como se indica anteriormente, pero el uso más frecuente es la denominación EpCAM. Es una proteína transmembranaria expresada en la superficie basolateral de las células, en algunos epitelios y numerosos cánceres⁴². A partir de 1982, Herlyn *et al.*⁴³ 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 llevado 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, Abe *et al.*⁴⁴ han mostrado, mediante ensayo ELISA, que una forma soluble de EpCAM, bautizada MK-1, aumentaba en la circulación sanguínea en un 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 (n° Swiss Prot P05787, también denominadas Citoqueratin-8, CK-8, queratin-8 o K8), 18 (n° Swiss Prot P05783, también denominada citoqueratin-18, CK-18, Queratin-18 o K18), y 19 (n° Swiss Prot P08727, también denominado citoqueratin-19, CK-19, Queratin-19 o K19) son las más abundantes en las células epiteliales y son unas herramientas útiles para el diagnóstico de patologías cancerosas⁴⁵. 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 análisis de citoqueratinas más utilizados son el análisis del antígeno polipeptídico tisular (TPA), del antígeno polipeptídico tisular específico (TPS), y el CYFRA 21-1. TPA es un ensayo de espectro amplio que mide las citoqueratinas 8, 18 y 19. Los análisis 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 análisis 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 ovarios, de páncreas, de próstata y de algunos cánceres ORL. El análisis sanguíneo de los fragmentos solubles de citoqueratinas tiene, en efecto, un valor clínico para detectar las recidivas o evaluar la respuesta a la terapia en curso (radioterapia, quimioterapia, tratamiento hormonal). Un análisis regular permite en particular evaluar la progresión de la masa tumoral. El análisis de citoqueratinas sanguíneas solubles tiene también un aspecto de pronóstico frente a la fase tumoral y a la formación de metástasis. Actualmente, el análisis sanguíneo de citoqueratina más utilizado es el CYFRA 21-1. Se recomienda altamente para el seguimiento de pacientes que padecen cáncer de pulmón de células no pequeñas. Existen varios análisis 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, Kim *et al.*⁴⁶ han mostrado que el análisis de las heces de citoqueratina 19 (DiNonA Inc.) podía ser útil para la detección de enfermedades digestivas en asociación con un análisis de la sangre oculta en las heces.

El marcador cadherina epitelial (n° 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. Se expresa 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, por su parte, unida a las redes de filamentos de actina del citoesqueleto. Esta unión E-cadherina/ β -catenina tiene 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 del sistema digestivo. Es así que Roca *et al.*⁴⁷ han mostrado que los pacientes que padecen 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.*⁴⁸ han mostrado que una forma soluble de E-cadherina podía liberarse 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, Katayama *et al.*⁴⁹ han mostrado que la forma soluble de E-cadherina podía liberarse en la circulación sanguínea en caso de cáncer, y Willmanns *et al.*⁵⁰ han mostrado que el aumento de la dosis de E-cadherina sanguínea estaba correlacionada con la fase tumoral para los cánceres colorrectales. Se propone, por otro lado, un kit comercial por la compañía Takara BioChemicals (Tokio, Japón).

El análisis de ACE (antígeno carcino-embriionario) para el diagnóstico del cáncer colorrectal se ha propuesto desde 1965 por Gold y Freedman⁵¹, pero un análisis sanguíneo de este marcador tiene una sensibilidad mediocre para el diagnóstico de cánceres colorrectales en una fase poco avanzada. Es por eso que se recomienda el análisis de ACE sérico, sobre todo, para evaluar el riesgo de metástasis hepáticas⁵² y para el seguimiento terapéutico. Además, es un marcador poco específico del cáncer colorrectal; en efecto, puede aumentar en numerosos otros cánceres

(pulmón, mama, etc.). Sin embargo, el análisis de ACE en las heces parece más sensible y más específico que el análisis de ACE sérico o que el análisis de sangre en las heces⁵³. No obstante, este análisis no se propone todavía de forma rutinaria.

5 Los determinantes antigénicos 1116-NS-19-9 reactivos, más comúnmente bautizados CA19-9 (Antígeno 19.9 de Hidratos de Carbono) se llevan por unas proteínas de guisante moleculares elevadas⁵⁴. El análisis sanguíneo de CA 19-9 es más específico que el del 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.). Se recomienda su uso en asociación con ACE tanto en el momento del diagnóstico de un cáncer como para el seguimiento de la patología.

J. Holmgren *et al.*⁵⁵ han mostrado que la dosis sérica de antígeno CA 50 aumentada en caso de cáncer colorrectal. El antígeno CA 50 se define por su facultad para ser reconocido por un anticuerpo monoclonal específico.

15 Tratándose del marcador CA 72, T.L. Klug *et al.*⁵⁶ han mostrado que la dosis sérica de antígeno CA 72 aumentaba en caso de cáncer colorrectal. El antígeno CA 72 se define por su facultad para ser reconocido por un anticuerpo monoclonal específico.

20 Asimismo, P. Kuusela *et al.*⁵⁷ han mostrado que la dosis sérica de antígeno CA 242 aumentaba en caso de cáncer colorrectal. El antígeno CA 242 se define por su facultad para ser reconocido por un anticuerpo monoclonal específico.

25 El análisis de la testosterona para el diagnóstico del cáncer colorrectal se ha propuesto en el hombre por M. Holland *et al.*⁵⁸. Estos autores han mostrado una caída del porcentaje de testosterona sanguínea en caso de cáncer colorrectal.

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

F. Model *et al.*⁵⁹ 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.

35 M.P. Ebert *et al.*⁶⁰ han mostrado que el gen ALX4, o homeobox-4 similar a aristaless, se metilaba más a menudo en los sueros de pacientes que padecen cáncer colorrectal que en los sueros control ($P < 0,0001$). Utilizando un valor umbral de 41,4 pg/ml, han obtenido una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 70%.

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

C. Bianco *et al.*⁶¹ han mostrado que la dosis sérica de Cripto-1 aumentaba en caso de cáncer colorrectal.

45 La inducción de la tumorigénesis intestinal por el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) se describe por Wilson *et al.*⁶². Más recientemente, se ha también mostrado por Lee *et al.*⁶³ que el MIF era un marcador sanguíneo potencial para el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal.

50 El marcador proteína disulfuro isomerasa (nº Swiss Prot P07237, también denominado EC 5.3.4.1, PDI, subunidad beta de la prolil 4-hidroxilasa, proteína de unión a la hormona tiroidea celular o p55) es una proteína multifuncional que cataliza la formación, la ruptura y la reorganización de los puentes disulfuros intramoleculares. En la superficie de las células, actúa como reductasa y escinde los puentes disulfuro de las proteínas enlazadas a las células. En el interior de las células, es una molécula soluble localizada en la luz del retículo endoplásmico, en la que forma y reorganiza los puentes disulfuros de las proteínas neosintetizadas. Comprende 2 dominios catalíticos de tipo tioredoxina que tienen una unidad CXXC característica. A alta concentración, la PDI funciona como una proteína chaperona que inhibe la agregación de las proteínas mal replegadas. A baja concentración, tiene un papel antagonista y facilita la agregación. La PDI forma también la sub-unidad estructural de diferentes enzimas como la propil-hidroxilasa que cataliza la hidroxilación de los restos de prolina de las cadenas pro-alfa del procolágeno. En la solicitud de patente EP1724586, la PDI se ha descrito como marcador de diagnóstico para algunos cánceres, como el cáncer de colon.

60 El análisis de la intelectina-1 (nº Swiss Prot Q8WWA0, también denominado receptor de lactoferrina intestinal, lectina de unión a galactofuranosa, lectina endotelial HL-1 u Omentina) para el diagnóstico del cáncer colorrectal se ha descrito en la solicitud de patente US2003/0082533.

65 La utilización de la Proteína Tumoral Controlada Traslacionalmente (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 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.

5 M2-PK es una isoenzima de piruvatoquinasa que se encuentra en forma dimérica o tetramérica. La forma dimérica es predominante en las células tumorales y por eso se denomina M2-PK tumoral. Numerosos estudios han utilizado el ensayo ELISA de M2-PK en las heces como marcador de cáncer colorrectal, como por ejemplo Hardt *et al.*⁶⁴.

10 La utilización de la Calgranulina C o proteína S100 A12 como marcador del cáncer colorrectal se describe en la solicitud de patente WO2007/134779.

Sagiv *et al.*⁶⁵ han mostrado un aumento de la expresión de CD24 en caso de cáncer colorrectal.

15 Las proteínas del antígeno específico de cáncer de colon (CCSA)-3 y -4 son unos marcadores séricos que se asociaron al cáncer colorrectal por Leman *et al.*⁶⁶.

Finalmente, se conoce el análisis de hemoglobina humana en las heces y puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente.

20 La concentración del marcador tumoral diferente de la prodefensina-A6 aumentará o disminuirá, según el marcador considerado, 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.

25 Preferiblemente, el o los marcadores diferentes de la prodefensina-A6 se seleccionan entre: Inhibidor de Elastasa Leucocitaria, Ezrina, Aminoacilasa 1, Proteína de Unión a Ácidos Grasos del Hígado, Proteína de Unión a Ácidos Grasos del Intestino, Apolipoproteína AI, Apolipoproteína AII, Plastina-I, Proteína Disulfuro Isomerasa, Intelectina-1, Citoqueratina 20, Proteína Tumoral Controlada Traslacionalmente, (Pro)defensina-A5, Galectina-3, Microglobulina Beta 2, ACE, CA19-9, TIMP-1, M2-PK y MIF.

30 Más preferentemente, el o los marcadores tumorales diferentes de la prodefensina-A6 se seleccionan entre los marcadores: L-FABP, Beta 2 Microglobulina, Galectina-3, ACE, CA19-9, MIF y I-plastina.

35 Según un modo de realización particular, el procedimiento de la invención comprende o consiste en la detección de los marcadores siguientes:

- Prodefensina-A6 y L-FABP,

40 - Prodefensina-A6, CA19-9 y ACE,

- Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina y ACE

- Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9 y ACE,

45 - Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, L-FABP y ACE,

- Prodefensina-A6, L-FABP, CA19-9 y ACE,

50 - Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9 y ACE,

- Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, L-FABP y ACE,

- Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Galectina-3, L-FABP, MIF y ACE,

55 - Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Galectina-3, L-FABP, MIF, Plastina I y ACE.

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.

60 Como se ha indicado anteriormente, se detecta el o los marcadores tumorales de interés 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), entendiéndose que la prodefensina-A6 se detecta sólo en forma proteica, completa o en forma de fragmento de proteína.

65 La determinación de la presencia, en la muestra biológica, del marcador tumoral de interés "proteína" puede llevarse a cabo 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 un ensayo bioquímico, incluyendo un análisis inmunológico, o por espectrometría de masa.

5 El ensayo bioquímico puede ser cualquier ensayo ampliamente conocido por el experto en la materia, que implica unas interacciones moleculares, a saber unas reacciones entre dicho marcador tumoral y uno o más parejas de unión específicas o no de dicho marcador tumoral.

10 Preferentemente, el ensayo bioquímico es un análisis inmunológico conocido por el experto en la materia que implica unas reacciones inmunológicas entre el marcador tumoral que es el antígeno y una o más parejas de unión específicas que son los anticuerpos dirigidos contra este antígeno.

15 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 específicos cuando son capaces de unirse a estos marcadores con una especificidad elevada, incluso una especificidad del 100%. Se denominan no específicos cuando su especificidad de unión a estos marcadores es débil 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.

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

La pareja de unión específica de la prodefensina-A6 es un anticuerpo monoclonal que reconoce cualquier epítipo, lineal o conformacional, comprendido en la secuencia SEQ ID nº 2.

25 Según la invención, el procedimiento utiliza un anticuerpo monoclonal específico de la prodefensina-A6 que reconoce el epítipo 1 de SEQ ID nº 6 (epítipo 1).

30 Los anticuerpos monoclonales anti-prodefensina-A6 que reconocen específicamente el epítipo 1 de secuencia SEQ ID nº 6 son nuevos y constituyen otro objeto de la invención.

Otros anticuerpos monoclonales anti-prodefensina-A6 reconocen específicamente un epítipo conformacional seleccionado entre los epítipos siguientes:

35 - un epítipo de al menos la secuencia SEQ ID nº7, en la que X₁ es V o L, X₂ es T o L, X₃ es P, S o C, X₄ es P o S, X₅ es W o T, X₆ es A, Q, M, C o E, X₇ es I, E o D y X₈ es F, Y, S o L, y de como mucho la secuencia SEQ ID nº8, SEQ ID nº9, SEQ ID nº10, SEQ ID nº11, SEQ ID nº12, tales como se indican en la figura 4 (epítipo 2),

40 - un epítipo de al menos la secuencia SEQ ID nº13, en la que X₁est S o T, X₂ es C o ausente, X₃ es T, L o E, X₄ es H o R, X₅est I, F o E, X₆ es G o V y X₇ es C o N, y de como mucho la secuencia SEQ ID nº14, SEQ ID nº15 o SEQ ID nº16, tales como se indican en la figura 4 (epítipo 3),

45 - un epítipo de al menos la secuencia SEQ ID nº17, en la que X₁est P o W, X₂ es W o E, X₃ es S, A, Q o W, X₄ es M, L, R o P, X₅ es H, F, W o G, X₆ es V o A y X₇ es I o V, y de como mucho la secuencia SEQ ID nº18, SEQ ID nº19, SEQ ID nº20 o SEQ ID nº21, tales como se indican en la figura 4 (epítipo 4),

- un epítipo de al menos la secuencia SEQ ID nº22, en la que X₁est Y o N, X₂ es E, D o Q, X₃ es T, N, R, M o K, X₄ es W, H o F y X₅ es P o G, y de como mucho la secuencia SEQ ID nº23, SEQ ID nº24, SEQ ID nº25, SEQ ID nº26, SEQ ID nº27, SEQ ID nº28 o SEQ ID nº29, tales como se indican en la figura 4 (epítipo 5).

50 Según un modo de realización, el procedimiento de la invención utiliza un anticuerpo monoclonal específico de un epítipo 1 de secuencia SEQ ID nº 6 y un anticuerpo monoclonal específico de un epítipo 2, 3, 4 o 5. Preferentemente, el procedimiento de la invención utiliza un anticuerpo monoclonal específico de un epítipo 1 y un anticuerpo monoclonal específico de un epítipo 2 o 4. Más preferentemente, el procedimiento de la invención utiliza un anticuerpo monoclonal específico de un epítipo 1 y un anticuerpo monoclonal específico de un epítipo 2.

55 Por epítipo, se entiende un péptido que tiene al menos las secuencias tales como se han definido mediante las secuencias SEQ ID nº 1 a 29, y como máximo 10, 8, 6 o 4 aminoácidos suplementarios repartidos a ambos lados de la secuencia considerada, de manera homogénea o no, o bien de un solo lado, así como sus análogos, homólogos y equivalentes estructurales.

60 De manera general, el término "análogo" se refiere a unos péptidos que tienen una secuencia y una estructura polipeptídica nativa que presentan una o varias adiciones, sustituciones (generalmente conservadora 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.

65 Los análogos particularmente preferidos incluyen las sustituciones conservadoras naturalmente, es decir las

5 sustituciones que tienen lugar en una familia de aminoácidos. Específicamente, los aminoácidos se dividen generalmente en 4 familias, a saber (1) los aminoácidos 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
 10 tales como la glicina, la asparagina, la glutamina, la cisteína, la serina, la treonina y la tirosina. La fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican a veces en aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir de manera razonable que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o 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
 15 fácilmente las regiones de la molécula peptídica de interés que pueden tolerar un cambio por referencia a las gráficas de Hopp/Woods y Kyte-Doolite, bien conocidos en la técnica.

15 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 un 60%, preferentemente al menos un 75%, más preferentemente al menos un 80-85%, más preferentemente al menos un 90% y más preferentemente al menos un 95-98% o más de identidad de secuencia sobre una longitud definida de las moléculas peptídicas.

20 Por "equivalente estructural" se entiende cualquier secuencia peptídica, lineal o no, incluida en la proteína de interés, que presenta la misma estructura tridimensional que el epítipo conformacional de interés, tales como los epítipos de secuencias SEQ ID nº 7 a 29, conservando al mismo tiempo la reactividad antigénica. Tal "equivalente estructural" se puede obtener fácilmente por el experto en la materia a partir del epítipo conformacional de interés utilizando un sistema bioinformático que permite encontrar similitudes de estructuras o subestructuras 3D de
 25 proteínas, tales como los sistemas SuMo⁶⁷ o Superimposé⁶⁸.

30 Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse por inmunización de un animal con el marcador tumoral en cuestión, seguido 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 sobre la cual se fija un antígeno específicamente reconocido por los anticuerpos, en particular dicho marcador.

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

35 En un primer tiempo, 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 se fusionan después con unas células mielomatosas "inmortales" (murinos 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
 40 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 ensayarse por ejemplo en ELISA, por inmunotransferencia (transferencia Western) en una o dos dimensiones, en inmunofluorescencia, o con la ayuda de un biosensor. Los anticuerpos monoclonales así seleccionados se purifican después, en particular según la técnica de cromatografía de afinidad descrita anteriormente.

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

50 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-defensina-A6 y están disponibles en particular en el catálogo Aloha Diagnostic International Inc., anticuerpo policlonal de conejo anti-defensina-A6, Cat. Nº HDEFA61-A. Ningún anticuerpo monoclonal dirigido contra la prodefensina-A6 está disponible en la actualidad.

55 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-inhibidor de la elastasa leucocitos y están disponibles, en particular en el catálogo Abcam, anticuerpo policlonal de conejo anti-LEI, Cat. Nº Ab47731. Se ha descrito un anticuerpo monoclonal anti-LEI Clon ELA-1 en el artículo de Yasumatsu *et al.*⁶⁸.

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

Se conocen unos ejemplos de anticuerpos 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-Aminoacilasa 1, Cat. nº Ab26173.

Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-proteína de unión a ácidos grasos 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 unos ejemplos de anticuerpos anti-proteína de unión a ácidos grasos del intestino 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 unos ejemplos de anticuerpos anti-Apolipoproteína AI y están disponibles en particular en el catálogo Biodesign Meridian Life Sciences, anticuerpo monoclonal anti-Apo AI clon 4A90, Cat. nº H45402M y anticuerpo policlonal de cabra anti-Apo AI, Cat. nº K45252P.

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

20 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos policlonales anti-I-plastina 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 I-plastina.

Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-Beta2 Microglobulina, anti-ACE, anti-CA19-9 y anti-Testosterona y se utilizan en particular en los kits de ensayo de la Solicitante, respectivamente Vidas® Beta2 Microglobulin, Vidas® ACE, Vidas® CA19-9™ y Vidas® Testosterona.

25 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-Proteasoma 20S y están disponibles en particular en el catálogo de Affinity Research Products.

30 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-Galectina-3, anti-L-Lactato deshidrogenasa cadena B, anti-Calreticulina, anti-transductor 1 de la señal de calcio asociada a los tumores, anti-queratina de tipo II Citoesqueleto 8, anti-queratina de tipo I Citoesqueleto 18, anti-queratina de tipo I Citoesqueleto 19, anti-Epitelial-Cadherina, anti-Villina y anti-TIMP-1 y están disponibles en particular en el catálogo Abcam.

35 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos anti-Proteína 3 alfa Derivada de los Islotes Regeneradores y se utilizan en particular en los kits de ensayo de Dynabio (La Gaude, Francia).

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

40 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos 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.

45 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos 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.

50 Se conocen unos ejemplos de anticuerpos 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 unos ejemplos de anticuerpos 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.

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

60 Según un modo de realización, la pareja de unión específica de la prodefensina-A6 se utiliza para la captura de la prodefensina-A6, lo que permite mejorar la especificidad del procedimiento de diagnóstico de la invención.

Preferentemente, el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un epítipo 1 se utiliza en captura y/o el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente un epítipo 2, 3, 4 o 5, preferentemente 2, se utiliza en detección.

65 La visualización de las reacciones inmunológicas, es decir la unión marcador tumoral/pareja de unión, se puede

efectuar mediante cualquier medio de detección, tales como unos medios directos o indirectos.

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

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

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

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

* los cromóforos como los compuestos fluorescentes, luminescentes, 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.

Se pueden utilizar también 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, lo 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 que lleva la pareja de unión. El anti-ligando puede ser detectable directamente por los reactivos marcadores descritos en el párrafo anterior o ser el mismo detectable por un ligando/anti-ligando.

Estos sistemas indirectos de detección pueden llevar, 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 hacer referencia a las solicitudes de patente anteriores FR98/10084 o WO-A-95/08000 de la solicitante o al artículo de Chevalier *et al.*⁷⁰.

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

A título de ejemplo de ensayos inmunológicos tales como se han definido 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 de punto.

Cuando la pareja de unión específica de la prodefensina-A6 se utiliza en captura en un ensayo "sándwich", por ejemplo el anticuerpo específico del epítipo 1, se utilizará en detección o bien una pareja de unión específica de la parte madura de la prodefensina-A6 (aminoácidos 66 a 100), o bien una pareja de unión que reconoce un epítipo de la parte propéptido de la prodefensina-A6 (aminoácidos 20-65) diferente de aquel reconocido por la pareja de unión utilizada para la captura.

La espectrometría de masa puede también utilizarse 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 se conoce ampliamente por el experto en la materia y se describe, por ejemplo, en Patterson⁷¹.

Para hacer esto, la muestra biológica previamente tratada o no se analiza en un espectrómetro de masa y se compara el espectro obtenido con aquel 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 parejas de unión del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención, por ejemplo un anticuerpo dirigido contra el o los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención. Otro ejemplo de tratamiento previo de la muestra puede ser el pre-fraccionamiento de la muestra biológica, a fin de separar entre sí las proteínas de la muestra. En unas técnicas bien conocidas por el experto en la materia, se puede, por ejemplo, depletar en primer lugar las proteínas mayoritarias de la muestra.

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, 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 en la muestra biológica.

La detección directa del ARNm en la muestra biológica se puede llevar a cabo 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 de PCR o NASBA.

5 Por hibridación, se entiende el proceso durante el cual, en condiciones apropiadas, dos fragmentos nucleotídicos se unen con unas uniones de hidrógenos estables y específicos para formar un complejo bicatenario. Estas uniones de hidrógeno se forman entre las bases complementarias adenina (A) y timina (T) (o uracila (U)) (se habla de unión A-T) o entre las bases complementarias guanina (G) y citosina (C) (se habla entonces de unión G-C). La hibridación de 10 dos fragmentos nucleotídicos puede ser total (se habla entonces de fragmentos nucleotídicos o de secuencias complementarias), es decir que el complejo bicatenario obtenido durante esta hibridación comprende únicamente unas uniones A-T y unas uniones C-G. Esta hibridación puede ser parcial (se habla entonces de fragmentos nucleotídicos o de secuencias suficientemente complementarias), es decir que el complejo bicatenario obtenido 15 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 la estringencia. La estringencia se define en particular en función de la composición en bases de los dos fragmentos nucleotídicos, así como por el grado de desapareamiento entre dos fragmentos nucleotídicos. La estringencia puede también depender 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 20 concentración de agentes desnaturizantes 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 desea 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 1 M. Las parejas de unión específicas o no del ARNm son cualquier pareja susceptible de 25 unirse a este ARNm. A título de ejemplo, se pueden citar las sondas nucleicas, los cebadores de amplificación, y cualquier otra molécula capaz de unirse a este ARNm.

Por sonda de hibridación, se entiende un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleicas, en particular de 10 a 35 unidades nucleicas, que poseen una especificidad de hibridación en condiciones determinadas 30 para formar un complejo de hibridación con el material específico del gen diana de interés. La sonda de hibridación puede comprender un marcador que permite su detección.

En el sentido de la presente invención, se entiende por cebador de amplificación, un fragmento nucleotídico que comprende de 5 a 100 unidades nucleicas, preferiblemente de 15 a 30 unidades nucleicas que permiten el inicio de 35 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:

- 40 - PCR (reacción en cadena de polimerasa), tal como se describe en las patentes US 4,683,195, US 4,683,202 y US 4,800,159,
- NASBA (Amplificación basada en la Secuencia de Ácido Nucleico) con la solicitud de patente WO 91/02818, y
- 45 - TMA (Amplificación Mediada por la Transcripción) con la patente US 5,399,491.

Por detección, se entiende 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. 50 Numerosos métodos de detección existen para la detección de los ácidos nucleicos⁷². Los marcadores apropiados son tales como se han definido anteriormente.

En el sentido de la presente invención, la sonda de hibridación puede ser una sonda denominada de detección. En este caso, la sonda denominada de detección está marcada mediante un marcador tal como se ha definido 55 anteriormente. Gracias a la presencia de este marcador, se puede detectar la presencia de una reacción de hibridación entre una sonda de detección dada y el transcrito a detectar.

La sonda de detección puede ser, en particular, una sonda de detección "balizas moleculares"⁷³. Estas "balizas moleculares" se vuelven fluorescentes durante la hibridación. Poseen una estructura de tipo tallo-bucle y contienen un fluoróforo y un grupo "extintor". La fijación de la secuencia de bucle específica con su secuencia complementaria 60 de ácido nucleico diana provoca un desarrollo del tallo y la emisión de una señal fluorescente durante la excitación a la longitud de onda que conviene.

La sonda de hibridación puede ser también una sonda denominada de captura. En este caso, la sonda denominada de captura se inmoviliza o es inmovilizable sobre un soporte sólido por cualquier medio apropiado, es decir directa o 65 indirectamente, por ejemplo por covalencia o adsorción. Los soportes sólidos apropiados son conocidos por el experto en la materia y se pueden citar a título de ejemplos los materiales de síntesis o los materiales naturales, los

látex, las partículas magnéticas, los derivados metálicos, los geles, etc. El soporte sólido puede estar en forma de una placa de microtitración, de una membrana como se ha descrito en la solicitud WO-A-94/12670, de una partícula. Se puede también inmovilizar sobre el soporte varias sondas de captura diferentes, estando cada una específica de un transcrito diana. En particular, se puede utilizar como soporte un biochip sobre el cual pueden ser inmovilizadas un gran número de sondas.

La inmovilización de las sondas sobre el soporte es también conocida por el experto en la materia y se puede citar un depósito de sondas por transferencia directa, la micro-deposición, la síntesis *in situ* y la fotolitografía.

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

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

Las estrategias de puesta en evidencia de las mutaciones se apoyan en las técnicas de la biología molecular y comprenden unas etapas de extracción de ADN, de amplificación por PCR u otra técnica de amplificación, de hibridación y/o de secuenciación. En el caso del cáncer colorrectal, se ha utilizado el procedimiento siguiente con éxito para realizar la detección de mutación en el ADN de las heces: concentración del ADN por precipitación, enriquecimiento en diana utilizando unos oligonucleótidos de captura sobre bolas magnética, amplificación PCR de los genes de interés, secuenciación en fase sólida para identificar las mutaciones puntuales⁷⁴. Las deleciones se identificaron con respecto a la diferencia de tamaño entre el fragmento de referencia esperado y el fragmento mutado. Imperiale *et al.*⁷⁴ han descrito un panel de 21 mutaciones situadas en los genes *K-ras*, *APC* y *p53* que permite detectar 16/31 de los cánceres invasivos.

Otros marcadores ADN utilizados son la detección BAT-26, que es un marcador de inestabilidad de los microsatélites y el ADN altamente amplificable denominado ADN (L-ADN), que no es un marcador específico pero que parece reflejar la apoptosis desordenada de las células tumorales exfoliadas en el lumen cólico⁷⁵. Estos marcadores no son satisfactorios no con respecto a su sensibilidad, no con respecto a su especificidad.

Como se ha indicado anteriormente, las alteraciones del ADN pueden también corresponder a una modificación del perfil de metilación del gen que corresponde al marcador tumoral de interés. La modificación del perfil de metilación puede corresponder a una hipometilación (disminución del número de metilaciones) o a una hipermetilación (aumento del número de metilaciones). Las unidades alteradas pueden situarse en la parte codificante del gen del marcador tumoral de interés, o en las partes 5' y 3' no codificante como la región promotora o la región terminadora de transcripción.

El análisis de la metilación del ADN se puede efectuar utilizando unas técnicas basadas en la PCR cualitativa y/o cuantitativa como la MSP (PCR específica de metilación), la secuenciación bisulfito, la digestión por una enzima de restricción sensible a las metilaciones acoplada con la PCR, COBRA (análisis de restricción combinado con bisulfito) et Ms-SNuPE (extensión de los cebadores del nucleótido simple sensible a la metilación). El conjunto de estas técnicas se repasó en detalle y de manera comparada en un artículo de metodología⁷⁶.

En la bibliografía, se han detallado varios genes hipermetilados en caso de cáncer colorrectal. A título de ejemplo, se puede citar el gen *ALX4* (homeobox-4 similar a *Aristaless*)⁶⁰, la región promotora del gen *TPEF/HHP1* (proteína transmembránica que contiene el factor de crecimiento epidérmico y el dominio de follistatina)⁷⁷ o también el gen *Septina-9*⁷⁸.

Cuando, en el procedimiento de la invención, se detecta al menos dos marcadores, éstos pueden ponerse en evidencia de manera separada, por ejemplo con la ayuda de análisis de inmunoensayos diferentes, o bien de manera simultánea, en análisis multiplex.

Cuando, en el procedimiento de la invención, se detectan dos marcadores de naturaleza diferente, por ejemplo un marcador proteico y un marcador ARNm, se pueden utilizar dos procedimientos de detección diferentes seleccionados entre los descritos anteriormente. Se pueden 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 consisten en detectar simultáneamente unas reacciones de hibridación e inmunológicas en una muestra susceptible de contener unos analitos dianas 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, sobre una superficie de captura previamente revestida de las parejas de captura de dichos analitos dianas, consistiendo dichas parejas de captura en al menos una sonda nucleica y al menos un anti-ligando,

5 (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.

10 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.

15 Así, según un modo de realización de la invención, la muestra biológica se trata previamente 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.

20 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.

25 En el caso de la sangre a título de muestra biológica, las células tumorales circulantes pueden aislarse gracias a una técnica de separación celular sobre Ficoll asociada a una depleción de las células sanguíneas utilizando unos anticuerpos anti-CD45 acoplados a bolas magnéticas (Dynal Biotech ASA, Noruega).

30 La detección del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención puede entonces efectuarse directamente a partir de células tumorales circulantes aisladas de la muestra biológica, por ejemplo por marcado inmunocitoquímico de las células con un anticuerpo anti-marcador(es) tumoral(es) buscado(s) en el procedimiento de la invención, después de depositar las células tumorales circulantes sobre una lámina por citospina. La detección del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención puede también efectuarse directamente en las células tumorales circulantes utilizando el método de citometría de flujo tal como se describe en Métézau *et al.*⁷⁹.

35 En estas condiciones, dichas células circulantes pueden tratarse 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 se describe por ejemplo en Mathieu *et al.*⁸⁰.

40 La detección del o de los marcadores tumorales buscados en el procedimiento de la invención se realiza entonces después de haber hecho permeable la membrana de las células para hacer entrar las parejas de unión específica del o de los marcadores buscados en el procedimiento de la invención.

45 La detección directa del o de los marcadores tumorales utilizados en el procedimiento de la invención a partir de las células circulantes puede también efectuarse 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 comprenden las etapas que consisten en:

50 (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,

55 (ii) cultivar dichas células en condiciones tales que liberen o segreguen dichos marcadores tumorales que se inmunocapturan en el fondo de la superficie de cultivo,

(iii) eliminar las células por lavado,

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

(v) visualizar el marcado así obtenido.

65 La detección directa del o de los marcadores tumorales utilizados en el procedimiento de la invención en las células tumorales se puede efectuar también en el medio de cultivo de dichas células después de haberlas cultivado en condiciones tales que segregan uno o más 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 a 5% de CO₂.

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

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

15 Por acoplamiento de las parejas de unión a un trazador de procesamiento de imágenes, se entiende la fijación de un trazador capaz de detectarse mediante cualquier método de procesamiento de 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.

20 En otro procedimiento de la invención, el trazador puede comprender un cuerpo radioactivo que emite unos positrones (flúor 18). Las imágenes se adquirirán por un sistema de tomografía por emisión de positrones.

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

30 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.

35 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 prodefensina-A6 y que esta producción depende del grado del cáncer, lo que constituye otro objeto de la invención.

40 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 6 anexas, en las que:

45 - la figura 1 representa la comparación mediante la técnica de transferencia western de los 9 anticuerpos monoclonales anti-prodefensina-A6. Los gráficos muestran las señales que corresponden al volumen de la banda (en intensidad*mm²) para el péptido prodefensina-A6 (SEQ ID nº 1, 7 ng/pocillo) (figura 1A) y para la proteína prodefensina-A6 segregada en los sobrenadantes de cultivo 293T transfectados (figura 1B). Los valores exactos de los volúmenes de banda se indican en la tabla (figura 1C);

50 - la figura 2 representa la comparación mediante la técnica de transferencia de punto de los 9 anticuerpos monoclonales anti-prodefensina-A6. Los gráficos muestran las señales que corresponden al volumen medio de 2 puntos (en intensidad*mm²) para el péptido prodefensina-A6 (SEQ ID nº 1) (figura 2A) y para el propéptido prodefensina-A6 (SEQ ID nº 3) (figura 2B). Los valores exactos de los volúmenes de banda se indican en la tabla (figura 2C). La relación*100 dada en esta tabla se calcula según la fórmula: señal propéptido prodefensina A6/señal péptido prodefensina-A6*100;

55 - la figura 3 es un gráfico relativo al análisis del reconocimiento del propéptido prodefensina-A6 mediante la técnica de ELISA indirecta. Los valores exactos de la señal ELISA en unidad de absorbencia se indican en la tabla al lado del gráfico;

60 - la figura 4 recapitula las secuencias reconocidas para cada uno de los anticuerpos anti-prodefensina-A6 1H8C9, 11B2D2, 11E8C9, 13E7F3. La secuencia en aminoácidos de cada unidad llevada por banco de fago y que se fija sobre el anticuerpo estudiado se da en la casilla "unidades inmunorreactivas". Para cada anticuerpo, estas unidades inmunorreactivas se alinean a fin de determinar la secuencia de consenso que se indica en negrita;

65 - la figura 5 representa el análisis de la reactividad por ELISA sándwich de los 5 anticuerpos monoclonales anti-prodefensina-A6 dirigidos contra el epítipo 1 con el anticuerpo de detección 1H8C9. El antígeno utilizado es el sobrenadante de cultivo 293T transfectado que contiene la prodefensina-A6 segregada. Este sobrenadante se ha diluido al 1/100 o 1/200. Los valores exactos de la señal ELISA en RFV se indican en la tabla al lado del gráfico;

- la figura 6 es un gráfico relativo al ensayo por ELISA de la prodefensina-A6, en pg/ml, en el suero de pacientes que presentan un adenocarcinoma colorrectal (CCR+), de sujetos sanos (CCR-), de pacientes que tienen una enfermedad digestiva inflamatoria (MDI) y de pacientes que presentan un adenoma colorrectal;

- la figura 7 representa la optimización del fraccionamiento SPE sobre cartuchos MCX para el péptido EPLQAEDDPLQAK (SEQ ID nº30) de la Prodefensina A6. Los gráficos representan el área del pico que corresponde a la transición 727/556 del péptido en función del pH del tampón utilizado para efectuar el fraccionamiento sobre cartucho MCX. Figura 7A: prodefensina-A6 puesta en solución en agua; Figura 7B: prodefensina-A6 puesta en solución en un suero humano de sujetos sanos.

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

Para los marcadores tumorales Aminoacilasa-1, LEI, L-FABP, Ezrina, I-plastina, Gal-3, Villina, I-FABP y Calreticulina, la amplificación de ADNc y clonación, la construcción de los vectores de expresión, así como la expresión y la purificación de las proteínas recombinantes se han descrito en detalle en la solicitud de patente WO2009/024691.

1. Expresión de la proteína Prodefensina-A6 en células humanas por transfección

Se ha comprado un vector de expresión que contiene elADNc del gen Prodefensina A6 (pCMV6-XL5 DEFA6) de la compañía Origene (Cat. No SC303095). Este vector permite expresar la proteína Prodefensina-A6 bajo el control del promotor CMV después de la introducción en unas células de mamíferos.

Las células humanas de riñón embrionario HEK 293T se mantuvieron en cultivo en un medio DMEM que contiene un 10% SVF, a 37°C con un 5% de CO₂. Las alfombras celulares entre el 50% y el 70% de confluencia se transfectaron con el plásmido de expresión pCMV6-XL5 DEFA6 utilizando uno de los dos reactivos de transfección siguientes: la Lipofectamina LTX comercializada por Invitrogen (Cat nº 15338-100) o TransIT LT-1 (Cat nº MIR2300) comercializada por Euromedex. En los 2 casos, las transfecciones se realizaron según el modo de realización proporcionado por los fabricantes del reactivo. Después de la transfección, los cultivos se incubaron durante 48h para permitir la producción de la proteína Prodefensina-A6. Después, el sobrenadante de cultivo se recoge, se centrifuga y después se filtra para quitar los restos celulares. La proteína Prodefensina segregada en el sobrenadante de cultivo ha sufrido todas las modificaciones post-traduccionales necesarias para su repliegue, es nativa. Es este sobrenadante que se ha utilizado como fuente de proteína Prodefensina-A6 durante el cribado de los anticuerpos monoclonales anti-Prodefensina-A6 y durante la caracterización de estos anticuerpos.

2. Síntesis química de péptidos

Tres péptidos que corresponden a diferentes partes de la proteína Prodefensina-A6 se obtuvieron por síntesis química según los procedimientos bien conocidos por el experto en la materia (NeoMPS). El péptido cuya secuencia se indica en la SEQ ID 1 corresponde a la totalidad de la secuencia de la Prodefensina-A6 sin el péptido señal que se escinde durante la translocación de la cadena polipeptídica hacia el retículo endoplásmico. Este péptido se denomina péptido Prodefensina-A6 o precursor Prodefensina-A6. El péptido cuya secuencia se indica en la SEQ ID 2 corresponde a la totalidad de la parte propéptida del precursor Prodefensina-A6. Este péptido se denomina propéptido Prodefensina-A6 o parte propéptido de la Prodefensina-A6. El péptido cuya secuencia se indica en la SEQ ID 3 corresponde a la casi totalidad de la parte propéptido del precursor Prodefensina-A6. Cuatro aminoácidos del extremo N-terminal no se incluyen en la secuencia. Este péptido es más fácil de producir en gran cantidad que el péptido de secuencia SED ID°2 y se ha utilizado en sustitución cuando la presencia de los cuatro aminoácidos no es crítica.

SEQ ID 1 : EPLQAEDDPLQAKAYEADAQEQRGANDQDFAVSFAEDASSSLRALGSTRAFT
CHCRRSCYSTEYSYGTCTVMGINHRFCCL

SEQ ID 2: EPLQAEDDPLQAKAYEADAQEQRGANDQDFAVSFAEDASSSLRALGS

SEQ ID 3: AEDDPLQAKAYEADAQEQRGANDQDFAVSFAEDASSSLRALGS

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

1. Modelo animal

Los experimentos de inmunización se realizaron en 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

A fin de aumentar las respuestas inmunes obtenidas en los ratones y poder generar unos anticuerpos monoclonales, los marcadores tumorales se han producido en forma de proteínas recombinantes o de péptidos de síntesis producidos según los modos de realización descritos en el ejemplo 1. La proteína LDH se ha obtenido de la compañía SciPac (Cat. nº 103-133). Cuando los péptidos de síntesis se han utilizado como inmunógeno, están acoplados sobre unas proteínas portadoras como la albumina sérica bovina (BSA) o la KLH (Hemocianina de lapa californiana). 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 conoce 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 realizaron por vía subcutánea. La primera inyección se realiza en mezcla con el adyuvante de Freund completo, las dos siguientes se realizan en mezcla con el adyuvante de Freund incompleto. Entre D50 y D70 después de la primera inyección, las respuestas humorales se reestimularon con una inyección intravenosa de 100 µg de la proteína recombinante. Para la Prodefensina-A6, se han realizado dos diferentes series de inmunización. Un primer grupo de ratón ha recibido el péptido Prodefensina A6 (SEQ ID 1) acoplado a la BSA y a la KLH (en alternancia según las inyecciones). Un segundo grupo de ratón ha recibido el propéptido Prodefensina-A6 (SEQ ID 2) acoplado con la BSA y la KLH (en alternancia según las inyecciones). Unos anticuerpos anti-Prodefensina-A6 se obtuvieron a partir de los animales que pertenecen a cada uno de los dos grupos.

3. Seguimiento de la aparición de la respuesta humoral

Con el fin de seguir la aparición de los anticuerpos, se efectúa regularmente sobre los ratones unas extracciones de sangre. La presencia de 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 hace 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 por 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, uno de los ratones inmunizado se sacrifica; la sangre y el bazo se extraen. Los esplenocitos obtenidos a partir del bazo se ponen en cultivo con las células de mieloma Sp2/0-Ag14 para que fusionen y se immortalicen, según el protocolo descrito por Köhler y Milstein^{81,82}. Después de un periodo de incubación de 12-14 días, los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos se han cribado para determinar la presencia de anticuerpos anti-marcador tumoral utilizando el ensayo ELISA descrito en el punto 3 de este ejemplo. Cuando unos péptidos de síntesis acoplados sobre la BSA o la KLH se han utilizado como inmunógeno, los clones dirigidos contra la BSA y la KLH se eliminan efectuando un cribado ELISA con, en captura, la BSA o la KLH 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

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra los marcadores tumorales Aminoacilasa-1, LEI, Ezrina, I-plastina, Gal-3, Calreticulina y LDH se describen en la solicitud de patente WO2009/024691.

Los anticuerpos monoclonales 1H8C9, 11B2D2, 13E7F3, 11E8C9, 6E1B4, 10C2G3, 12F3F2, 12F8E4, 12H4E1 se dirigen contra la Prodefensina-A6 y se obtuvieron realizando las técnicas descritas en los puntos 1 a 4 de este ejemplo.

5.1. Metodología

Los extractos de cultivo celulares de líneas 293T transfectados se preparan lisando directamente el residuo celular por 600 µl de PBS que contiene Triton X-100 0,5% y unos inhibidores de proteasas, después tratados según el protocolo de preparación de muestra de los geles NuPAGE Novex (Invitrogen). Para obtener los extractos de tejido, las biopsia tumor y mucosa del paciente CLSP105 se disociaron con escalpelo, después sufrieron 10 ciclos de extracción en el sistema Medimachine (Becton Dickinson) utilizando unos Medicons 50 µm con 1 ml de tampón PBS, 2,5 mM EDTA, inhibidores de las proteasas (pastillas Roche complete™). Se agrupan estos 10 ml de suspensión celular, complementados al 25 ml y después centrifugados 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, sobre un gel NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12%, tampón de migración MES. 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 Amidoblack.

Las membranas están saturadas por 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, la revelación se realiza con el kit Substrat Supersignal West Dura Extended (Cat nº 34076, Pierce) según los datos de utilización recomendados. El tiempo de exposición ha sido de 2 minutos para el experimento presentado en la figura 1 y de 100 segundos para el experimento presentado en la tabla 1.

La señal de quimioluminiscencia sobre las membranas se ha medido con el sistema de procesamiento de imágenes VersaDoc 5000 de BioRad. A partir de la imagen de la transferencia Western, los volúmenes de las bandas que corresponden a los diferentes marcadores tumorales se evaluaron con el programa QuantityOne (Bio-Rad). El volumen corresponde a la intensidad de la señal de quimioluminiscencia multiplicada por la superficie de la banda.

5.2. Resultados

Los resultados de Transferencia Western recopilados en la Figura 1 y la tabla 1 dan 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. El sobrenadante de cultivo 293T transfectadas por el plásmido pCMX-XL5-Prodefensina-A6 que contiene Prodefensina-A6 segregada y el péptido Prodefensina-A6 (7 ng por pocillo) se han utilizado para evaluar la reactividad en Transferencia Western de los nueve anticuerpos anti-Prodefensina A6 (Figura 1). Todos los anticuerpos reconocen el péptido Prodefensina A6. Todos los anticuerpos, salvo el monoclonal 11E8C9, reconocen la Prodefensina-A6 segregada en el sobrenadante de cultivo en las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, la intensidad de las señales obtenidas es muy dispar, mostrando que todos los anticuerpos no tienen la misma reactividad. Los resultados presentados en la tabla 1 muestran que los marcadores tumorales ensayados se expresan bien en el tejido tumoral obtenido a partir de los pacientes. La Prodefensina-A6 no se expresa por las líneas celulares de colon Caco-2 o HT-29, por esta razón estos lisados no se han incluido en los análisis.

La intensidad de la señal obtenida con un anticuerpo sobre una muestra se puede comparar con las señales obtenidas con las otras muestras e incluso 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 llevado a cabo en este ejemplo en las muestras distantes ya que no permitiría concluir a la presencia o no del marcador tumoral en las muestras distantes, ni determinar si su concentración aumentaría o disminuiría en estas. Además, el esquema experimental utilizado no permite comparar la reactividad de un anticuerpo a otro.

Tabla 1

Anticuerpo anti-ProDEFA6	Sobrenadante de cultivo 293T/ProDEFA6	Tejido mucosa CLSP105	Tejido tumor CLSP105
1H8C9	2475	Negativo	457
11B2D2	556	Negativo	140
13E7F3	134	Negativo	Negativo
11E8C9	Negativo	Negativo	Negativo

6. Análisis del reconocimiento del propéptido Prodefensina A6 por los anticuerpos monoclonales por dot-blot

6.1. Metodología

El análisis por dot-blot se ha realizado utilizando el péptido Prodefensina-A6 (SEQ ID^o1, concentración 0,1 mg/ml) y el propéptido Prodefensina A6 (SEQ ID^o3, concentración 2,38 mg/ml). Se ha depositado una gota de cada muestra por duplicado sobre unas membranas de nitrocelulosa (medio de transferencia Transblot, Bio-rad) después se han dejado secar al aire libre.

El protocolo de revelación inmunológico es idéntico a aquel descrito en el párrafo 5.1 de este ejemplo. El tiempo de exposición utilizado para este experimento fue de 1 minuto.

6.2. Resultados

Todos los anticuerpos ensayados reconocen el péptido Prodefensina-A6 (SEQ ID^o1) en dot-blot (Figura 2). El anticuerpo más reactivo en esta técnica es el clon 10C2G3. Los anticuerpos 6E1B4, 12F3F2, 12F8E4, 12H4E1 forman un grupo homogéneo, menos reactivo que el 10C2G3 pero más que el grupo 1H8C9, 11B2D2, 13E7F3, 11E8C9 que es el más heterogéneo. De hecho, las reactividades en transferencia Western y en dot-blot no correlacionan siempre: los anticuerpos 6E1B4, 12F3F2, 12F8E4, 12H4E1 tienen una reactividad similar en dot-blot mientras que las intensidades de las señales obtenidas en transferencia Western son diferentes (Figuras 1 y 2). Le

Transferencia Western se ha realizado en condiciones desnaturalizantes, mientras que los péptidos se ven directamente sin desnaturalización para la transferencia de punto.

5 Sólo los anticuerpos 6E1B4, 10C2G3, 12F3F2, 12F8E4, 12H4E1 reconocen el propéptido Prodefensina-A6 (SEQ ID°3) en dot-blot. Los anticuerpos 1H8C9, 11B2D2, 13E7F3, 11E8C9 no muestran reactividad significativa con el propéptido Prodefensina-A6 (SEQ ID°3), indica que su epítipo se sitúa en la parte Defensina-A6 madura del precursor Prodefensina-A6. Entre los 5 anticuerpos que reaccionan con el propéptido Prodefensina-A6 (SEQ ID°3), cuyo epítipo mínimo está contenido en esta secuencia, los clones 6E1B4, 10C2G3, 12F3F2 y 12F8E4 presentan todos el mismo perfil de reactividad: la relación de las señales obtenidas (propéptido Prodefensina-A6/ péptido Prodefensina-A6* 100, Figura 2) está entre 29 y 31 para todos estos anticuerpos. El clon 12H4E1 se distingue de estos otros anticuerpos anti-propéptido Prodefensina-A6 por que esta relación es de 6. Reconoce el propéptido menos bien que los 4 otros anticuerpos.

15 **7. Análisis del reconocimiento del propéptido Prodefensina-A6 por los anticuerpos monoclonales por ELISA indirecta**

7.1. Metodología

20 Se han recubierto unas placas de 96 pocillos (del tipo Nunc, Maxisorp) con el propéptido Prodefensina-A6 (SEQ ID°3) diluido en PBS a 2 µg por pocillo, durante una noche a temperatura ambiente. Las placas se saturan por 10% de leche en PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) durante 1h a 37°C. Se efectúan 3 lavados en PBS-T, se deposita sobre las placas 0,2 µg/pocillo del anticuerpo biotinilado a ensayar diluido en PBS-T 1% BSA y se incuba 1h a 37°C. Después de 3 lavados por PBS-T, se añade estreptavidina acoplada con la peroxidasa de rábano picante (Jackson Immunoresearch Cat. nº 016-030-084, dilución 1/20000 en PBS-T 1% BSA, 100 µl/pocillo). Después de 1h de incubación a 37°C y 3 lavados con PBS-T, se añade el sustrato OPT EIA (BD), 100 µl/pocillo. Al final de 20 min, cuando el desarrollo de la coloración tiene lugar, se detiene la reacción mediante ácido sulfúrico 5N y se mide la absorbancia a 450 nm. Los resultados presentados son la media de 2 mediciones, el ruido de fondo medio (0,02 unidades de densidad óptica) no se ha sustraído.

30 **7.2. Resultados**

Los resultados del ensayo ELISA indirecto se presentan en la Figura 3. En las condiciones experimentales utilizadas, sólo 4 anticuerpos 6E1B4, 10C2G3, 12F3F2 y 12F8E4 se fijan sobre el propéptido prodefensina-A6 absorbido en la fase sólida. Los otros 5 anticuerpos, incluyendo el 12H4E1, no se fijan sobre el propéptido en este formato. Este experimento confirma los resultados de dot-blot (Figura 2) y establece definitivamente que incluso si el monoclonal 12H4E1 reconoce el propéptido prodefensina-A6, su reactividad es mucho menor en comparación con los 4 otros monoclonales 6E1B4, 10C2G3, 12F3F2 y 12F8E4.

40 **8. Caracterización de los epítipos reconocidos por los anticuerpos monoclonales utilizando las técnicas del Spotscan y cribado de banco de péptidos portados por unos fagos**

8.1. Metodología

45 La técnica del Spotscan, adaptada de Frank y Döring⁷⁸, permite sintetizar de manera simultánea un gran número de péptidos fijados sobre 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 Blot, y la identificación de los péptidos inmunoreactivos permite deducir la secuencia mínima del epítipo del anticuerpo y localizarlo más precisamente sobre el antígeno.

50 La síntesis se efectúa sobre una membrana de celulosa que lleva uniformemente unos brazos de polietilenglicol (PEG) de una longitud de 8 a 10 unidades, que presenta una función NH₂ libre en final de cadena. Se desarrolla del 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, se protegen también por unos grupos tritilo, t-butilo o t-butiléter. Las soluciones madres 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.

60 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 diisopropil-carbodiimida 1,1 M diluido en NMP para 3 volúmenes solución-madre de aminoácido) sobre las membranas. Este depósito se repite una segunda vez, después se aclaran las membranas en DMF (N,N-dimetilformamido). Los grupos NH₂ que no han reaccionado se acetilan después por 4 a 6 incubaciones de 10 minutos en una solución de anhídrido acético 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 se escinden por una incubación de 5 minutos en una solución de piperidina 20% en DMF. Después de 4 lavados en DMF, los puntos se colorean con la ayuda de una solución de azul de bromofenol 1% en DMF, después la membrana se aclara 3 veces al aire libre antes del ciclo de acoplamiento siguiente.

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 se desprotegen mediante la incubación de membranas en un baño de ácido trifluoroacético / diclorometano / triisobutilsilano (5: 5: 0,3) durante 1 hora. Las membranas se aclaran después 4 veces en diclorometano, 3 veces en DMF y 3 veces en metanol antes de secarse al aire libre y conservadas a -20°C hasta la inmunorrevelación.

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 se lavan después 3 veces en TBS-T, después se incuban con el conjugado anti-ratón acoplado a la fosfatasa alcalina (Jacksin Immunoresearch), diluida al 1/2000^a 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 azul de tiazolil tetrazolio 720 µM, y MgCl₂ 5 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.

La regeneración permite eliminar los anticuerpos y conjugarlos fijados sobre los péptidos, lo que permite así realizar un nuevo ensayo de inmunoreactividad frente a otro anticuerpo. Las membranas sufren una serie de lavados de 10 minutos cada una: 1 lavado en agua destilada, 6 lavados en DMF, 3 lavados en tampón de regeneración A (urea 8 M, SDS (dodecilsulfato de sodio) 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 se secan después al aire libre antes de almacenarse a -20°C.

La caracterización de los epítomos por cribado de bancos de péptidos portados por unos fagos se ha realizado utilizando el kit comercial PhD12 Phage Display Peptide Library Kit (Cat. n° E#8110S) de New England Biolabs, siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit, versión 2.7 del protocolo que data de noviembre de 2007.

8.2. Resultados

La tabla 2 recapitula los epítomos reconocidos por cinco anticuerpos anti-propéptido Prodefensina-A6 cuyo epítomo se ha analizado por la técnica del Spotscan. Todos estos anticuerpos reconocen la misma región del precursor Prodefensina-A6, situada entre los aminoácidos 25 y 30 según la numeración que empieza en la metionina inicial (epítomo 1). Por el contrario, la secuencia exacta reconocida por los diferentes monoclonales no es idéntica. Así, el clon 10C2G3 reconoce una secuencia mínima de 2 aminoácidos (DP) mientras que los clones 12H4E1 y 6E1B4 necesitan una secuencia mínima de 6 aminoácidos (EDDPLQ) para fijarse. Los resultados presentados en las Figuras 2 y 3 han mostrado que es el clon 10C2G3 que permite obtener la señal más elevada en transferencia de punto y ELISA indirecta para el reconocimiento de los péptidos Prodefensina-A6. De manera sorprendente, el clon 12H4E1 se distingue de los otros anticuerpos dirigidos contra el epítomo 1 de la Pro-Defensina-A6 (Figuras 2 y 3) incluso si la secuencia mínima reconocida es idéntica con el anticuerpo 6E1B4. El clon 12H4E1 reconoce mejor la secuencia EDDPLQ (SEQ ID n°6) en el contexto de la proteína precursora total (SEQ ID n°1) que en el contexto del propéptido prodefensina-A6 (SEQ ID n°3).

Tabla 2

Anticuerpo	N° epítomo	Secuencia del epítomo ^a (SEQ ID n°)
10C2G3	1	DP (27-28) (SEQ ID n°4)
12F3F2	1	DPL (27-29) (SEQ ID n°5)
12F8E4	1	DPL (27-29) (SEQ ID n°5)
12H4E1	1	EDDPLQ (25-30) (SEQ ID n°6)
6E1B4	1	EDDPLQ (25-30) (SEQ ID n°6)

^aSecuencia en aminoácido de la región de fijación de la Prodefensina-A6 al anticuerpo ensayado. Los números entre paréntesis corresponden a la posición del epítomo sobre la secuencia en aminoácidos de la Prodefensina A6, empezando la numeración en la metionina inicial.

Los epítomos reconocidos por los anticuerpos 1H8C9, 11B2C2, 13E7F3 y 11E8C9 no se han podido determinar mediante la técnica del Spotscan, lo que indica que no son lineales. El cribado de los bancos de péptidos portados por unos fagos ha permitido seleccionar 5, 3, 7 y 4 mimótopos (secuencia lineal que mimetiza un epítopo) que reaccionan respectivamente con los anticuerpos 1H8C9, 11B2C2, 11E8C9 y 13E7F3. Las secuencias de estos mimótopos se presentan en la Figura 4. Para cada anticuerpo las secuencias de los mimótopos reconocidos o inmunorreactivos se alinearon a fin de determinar una secuencia de consenso que se indica en negrita en la Figura 4, que representa la secuencia mínima reconocida por el anticuerpo. No ha sido posible encontrar una sola de estas secuencias de consenso en la estructura primaria (o secuencia peptídica) de la Prodefensina-A6. Así, estas secuencias de consenso corresponden a unos restos dispersos en la estructura primaria de la proteína pero que comparten una proximidad en su estructura tridimensional a fin de formar un epítopo conformacional.

9. Detección de la Prodefensina-A6 por ELISA sándwich

9.1. Metodología

La Prodefensina-A6 se ha detectado en inmunoensayo de tipo sándwich utilizando par ejemplo el autómata de ELISA Vidas® (bioMérieux). Este tipo de ensayo puede también realizarse en microplaca, de manera automatizada o manual. Para ello, el ensayo ELISA se ha construido utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Los reactivos se han utilizado tales como se describen en el prospecto correspondiente (ref. 11728 D - FR - 2005/05), modificada así:

1. Se han sensibilizado unos conos con los 9 anticuerpos de captura a ensayar a una concentración de 10 µg/ml.
2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido por 300 µl de anticuerpo de revelación a ensayar (1H8C9 y 11E8C9) acoplados con biotina, diluidos a 1 µg/ml en el tampón (sin suero de cabra) del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra.
3. El sobrenadante de cultivo 293T transfectadas por el plásmido pCMX-XL5-Prodefensina A6 que contiene la Prodefensina-A6 segregada se añade puro o diluido en PBS directamente en el segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra (50 µl).
4. La reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómata Vidas® y del protocolo HBsAg ULTRA cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación se había llevado a 100 ciclos.
5. Los resultados se han obtenido en forma de valores brutos. La señal está en RFV, valor de fluorescencia relativa.

9.2. Resultados

La tabla 3 recapitula la reactividad de las diferentes combinaciones de anticuerpo sobre una dilución al ½ del sobrenadante de cultivo 293T transfectadas por el plásmido pCMX-XL5-Prodefensina-A6 y que contiene la proteína Prodefensina-A6 nativa.

Tabla 3^a

Anticuerpo de captura	Anticuerpo de detección biotinilado	
	1H8C9	11E8C9
1H8C9 (epítopo 2)	-	43
11B2D2 (epítopo 3)	955*	11
13E7F3 (epítopo 5)	1088*	2881
11E8C9 (epítopo 4)	4015*	-
6E1B4 (epítopo 1)	11646	3407
10C2G3 (epítopo 1)	11583	7420
12F3F2 (epítopo 1)	11481	6440
12F8E4 (epítopo 1)	11436	3064
12H4E1 (epítopo 1)	11868	11037

^aSeñal en inmunoensayo sándwich VIDAS, en RFV (unidad relativa de fluorescencia). *: señal para sobrenadante determinado puro. Los otros sobrenadantes se diluyeron a la mitad.

Los resultados presentados en la tabla 3 muestran que es posible detectar la Prodefensina-A6 utilizando unas ELISA sándwich basadas en diferentes combinaciones de epítomos: par ejemplo epítomos nº 5 y 4, epítomos nº 1 y 4, o también de manera preferida una combinación del epítopo 2, con cualquiera de los otros epítomos identificados (1, 3, 4, 5). De manera aún más preferida, el epítopo 2 se utiliza en detección. Por el contrario, las combinaciones de los epítomos nº 2 y 4 o también nº 3 y 4 no permiten detectar la Prodefensina-A6.

Un análisis más fino de la reactividad de los anticuerpos dirigidos contra el epítopo 1, utilizados en captura, y combinados con el clon 1H8C9 se presenta en la figura 5. El clon 12H4E1 es el mejor anticuerpo de captura, en segunda posición están los clones 10C2G3 y 12F3F2. Las señales menos elevadas se obtienen con los anticuerpos

6E1B4 y 12F8E4. Este resultado es muy sorprendente, ya que los clones 6E1B4 y 12H4E1 reconocen la misma secuencia mínima.

Ejemplo 3: Evaluaciones 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 la ley de Huriet.

Para la obtención de suero, la extracción sanguínea se realiza sobre tubo seco. Para la obtención del plasma, la extracción sanguínea se realiza sobre tubo EDTA. Después de la coagulación, el tubo se centrifuga 10 min a 1000 g, se extrae el suero, se alícuota y se conserva a -80°C. El tubo de plasma se centrifuga directamente 10 min a 1000 g, se extrae el plasma, se alícuota y se conserva a -80°C. Las muestras se documentan perfectamente para el historial clínico de los pacientes.

2. Análisis sérico del marcador tumoral ProDefensine-A6

La proteína precursora ProDefensine-A6 se ha evaluado con la ayuda de unos anticuerpos descritos en detalle en el ejemplo 2 y de un ensayo ELISA que utiliza el autómatas Vidas® (bioMérieux). Para ello, el ensayo ELISA se ha construido utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. nº 30315). Se utilizaron los reactivos tales como se describen en el prospecto correspondiente (ref. 11728 D - FR - 2005/05), con las modificaciones siguientes:

1. Los conos se sensibilizaron con el anticuerpo de captura 12H4E1 a una concentración de 15 µg/ml.
2. El contenido del segundo pocillo del cartucho HBs Ag Ultra se ha sustituido por 300 µl de anticuerpo de revelación 1H8C9, acoplado a la biotina, diluido al 1 µg/ml en el tampón (sin suero de cabra) del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra.
3. Las muestras de suero o de plasma (50µl) se diluyeron 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 había llevado a 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). Se ha establecido una curva patrón analizando una gama de concentraciones del péptido sintético Prodefensina A6 (SEQ ID^o1). La curva patrón se ha trazado 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 del marcador tumoral presente en el fluido corporal a analizar (sangre, suero, plasma) se ha calculado detallando la concentración que corresponde a la señal RFV leída por Vidas®.

Los resultados del análisis de Prodefensina-A6 sérica en los pacientes por ELISA sobre el autómatas Vidas se dan en la tabla 4. Las concentraciones séricas de Prodefensina-A6 se sitúan entre 0 y 10 pg/ml en los pacientes que tienen un adenocarcinoma colorrectal (CCR+) y entre 0 y 2 pg/ml en los sujetos sanos (CCR-), lo que necesita un ensayo ELISA extremadamente sensible para poder realizar la invención en un fluido biológico o muestra distante. Los únicos ensayos ELISA de la Prodefensina-A6 que permiten alcanzar un límite de detección tan baja se basan en la combinación de los anticuerpos que reconocen los epítomos 1 y 4. Es preferible capturar la Prodefensina-A6 por el epítomo 1. La combinación que da el análisis más sensible es la que se ha utilizado aquí con el anticuerpo 12H4E1 en captura y el anticuerpo 1H8C9 en detección.

Tabla 4

Patología ^a	Identificador del paciente	Fase	TNM ^b	Edad	Sexo	Prodefensina A6 (pg/ml)
MDI	CLSP046			43	Varón	0,40
MDI	CLSP049			30	Mujer	1,11
MDI	CLSP051			47	Mujer	0,61
MDI	CLSP056			23	Mujer	2,16
MDI	CLSP065			41	Mujer	1,60
MDI	CLSP084			34	Mujer	0,10
MDI	CLSP134			59	Varón	0,77
MDI	CLSP135			47	Mujer	0,44
MDI	CLSP137			35	Mujer	0,23

ES 2 692 354 T3

MDI	CLSP151			55	Varón	0,44
MDI	CLSP152			36	Varón	4,06
CCR +	CBSE011	0	TisN0M0	76	Varón	1,91
CCR +	CLSP059	0	TisN0M0	72	Varón	0,49
CCR +	CLSP104	0	TisN0M0	48	Varón	0,41
CCR +	CBSE001	I	T1N0M0	69	Mujer	1,44
CCR +	CBSE016	I	T1N0M0	74	Varón	2,19
CCR +	CBSE022	I	T1N0M0	78	Varón	0,29
CCR +	CBSE025	I	T2N0M0	81	Mujer	1,45
CCR +	CLSP047	I	T1N0M0	76	Mujer	0,59
CCR +	CLSP062	I	T2N0M0	83	Varón	0,56
CCR +	CLSP067	I	T2N0M0	61	Varón	0,45
CCR +	CLSP080	I	T2N0M0	74	Mujer	1,29
CCR +	CLSP085	I	T2N0M0	74	Mujer	3,26
CCR +	CLSP086	I	T2N0M0	61	Varón	0,23
CCR +	CLSP093	I	T2N0M0	71	Varón	0,39
CCR +	CLSP100	I	T3N0M0	53	Varón	0,41
CCR +	CLSP118	I	T2N0M0	60	Mujer	0,76
CCR +	CLSP145	I	T1N0M0	71	Varón	1,38
CCR +	CLSP146	I	T2N0M0	55	Mujer	0,24
CCR +	CLSP150	I	T2N0M0	61	Varón	0,24
CCR +	CBSE004	II	T3N0M0	85	Varón	0,07
CCR +	CBSE017	II	T3N0M0	74	Varón	1,00
CCR +	CBSE018	II	T4N0M0	82	Varón	0,26
CCR +	CLSP043	II	T3N0M0	75	Varón	1,25
CCR +	CLSP060	II	T4N0M0	84	Varón	1,26
CCR +	CLSP069	II	T3N0M0	46	Varón	1,07
CCR +	CLSP075	II	T3N0M0	65	Varón	1,20
CCR +	CLSP087	II	T3N0M0	75	Varón	1,52
CCR +	CLSP088	II	T3N0M0	88	Mujer	0,72
CCR +	CLSP096	II	T3N0M0	79	Mujer	0,40
CCR +	CLSP105	II	T3N0M0	73	Varón	1,61
CCR +	CLSP107	II	T3N0M0	79	Varón	0,38
CCR +	CLSP110	II	T3N0M0	67	Mujer	0,39
CCR +	CLSP113	II	T3N0M0	50	Varón	0,69
CCR +	CLSP115	II	T3N0M0	65	Mujer	3,62
CCR +	CLSP117	II	T3N0M0	78	Mujer	1,62
CCR +	CLSP119	II	T3N0M0	78	Varón	0,80
CCR +	CLSP122	II	T3N0MX	54	Varón	0,81
CCR +	CLSP133	II	T3N0M0	78	Mujer	0,83
CCR +	CLSP136	II	T3N0M0	67	Mujer	0,22
CCR +	CLSP143	II	T3N0M0	76	Mujer	1,25
CCR +	CLSP147	II	T3N0M0	83	Varón	0,77
CCR +	CLSP154	II	T3N0M0	76	Mujer	0,86
CCR +	CLSP157	II	T3N0	45	Mujer	0,42
CCR +	GHBD020	II	T3N0M0	75	Varón	1,01
CCR +	GHBD023	II	T3N0M0	57	Varón	0,23
CCR +	GHBD025	II	T3N0M0	73	Varón	0,73
CCR +	GHBD029	II	T3N0M0	75	Mujer	2,22
CCR +	CBSE005	III	T3N1 M0	73	Varón	4,27
CCR +	CBSE006	III	T3N1 M0	84	Varón	9,24
CCR +	CBSE007	III	T3N1 M0	77	Mujer	2,02
CCR +	CBSE010	III	T4N2M0	67	Varón	9,17
CCR +	CBSE013	III	T3N1 M0	82	Varón	4,50
CCR +	CBSE023	III	T4N2M0	76	Varón	2,04
CCR +	CLSP044	III	T3N1M0	80	Varón	0,47
CCR +	CLSP050	III	T2N1M0	88	Mujer	2,18
CCR +	CLSP072	III	T3N1M0	79	Varón	2,17
CCR +	CLSP073	III	T2N1M0	77	Varón	1,59
CCR +	CLSP074	III	T3N2M0	79	Mujer	0,64
CCR +	CLSP089	III	T4N2M0	84	Mujer	0,81
CCR +	CLSP090	III	T1N1M0	65	Mujer	1,47
CCR +	CLSP091	III	T3N1M0	55	Varón	0,29

ES 2 692 354 T3

CCR +	CLSP094	III	T3N1M0	72	Varón	0,47
CCR +	CLSP097	III	T3N1M0	71	Mujer	0,74
CCR +	CLSP098	III	T3N2M0	61	Varón	0,69
CCR +	CLSP103	III	T2N1 MX	60	Varón	0,40
CCR +	CLSP106	III	T4N2M0	85	Mujer	1,90
CCR +	CLSP121	III	T3N2M0	76	Varón	0,49
CCR +	CLSP123	III	T4N1 MX	68	Varón	1,81
CCR +	CLSP138	III	T3N1 MX	78	Varón	1,03
CCR +	CLSP141	III	T3N1M0	70	Varón	1,21
CCR +	CLSP144	III	T3N1M0	52	Mujer	0,93
CCR +	CLSP153	III	T3N2MX	85	Varón	5,09
CCR +	GHBD019	III	T3N1M0	74	Varón	0,92
CCR +	CBSE012	IV	T4N3M1	37	Mujer	0,50
CCR +	CBSE019	IV	T3N2M1	58	Varón	1,52
CCR +	CBSE026	IV	T4N1M1	72	Varón	0,61
CCR +	CBSE027	IV	T4N2M1	78	Mujer	1,04
CCR +	CLSP042	IV	T3N2M1	56	Varón	1,39
CCR +	CLSP057	IV	T3N2M1	61	Mujer	0,27
CCR +	CLSP068	IV	TXNXM1	60	Mujer	1,29
CCR +	CLSP079	IV	T3N0M1	81	Mujer	0,81
CCR +	CLSP083	IV	T3N1 M1	67	Mujer	0,79
CCR +	CLSP095	IV	T3N1 M1	64	Varón	0,65
CCR +	CLSP109	IV	T3N1 M1	60	Varón	0,88
CCR +	CLSP132	IV	T3N1 M1	62	Varón	2,80
CCR +	CLSP156	IV	T4N0M1	59	Varón	1,25
CCR +	CLSP159	IV	T3N0M1	68	Mujer	0,89
CCR +	CLSP160	IV	TXNXM1	70	Varón	2,77
CCR +	CLSP161	IV	T3N2M1	78	Mujer	0,64
Adenoma	CLSP055			73	Varón	0,55
Adenoma	CLSP058			55	Mujer	0,58
Adenoma	CLSP061			61	Mujer	0,62
Adenoma	CLSP099		T0N0M0	62	Varón	0,13
Adenoma	CLSP116			63	Varón	0,66
Adenoma	CLSP120			56	Mujer	0,30
Adenoma	CLSP142		T0	21	Varón	1,77
Adenoma	CLSP148		TisN0M0	50	Mujer	1,07
Adenoma	CLSP149		T1N0M0	50	Mujer	1,69
CCR -	N00656			47	Mujer	0,22
CCR -	N006615			43	Mujer	0,45
CCR -	N00664-			44	Varón	0,13
CCR -	N006658			48	Varón	0,46
CCR -	N009901			52	Varón	0,65
CCR -	N011147			50	Varón	0,87
CCR -	N011155			51	Varón	0,61
CCR -	N011243			52	Varón	0,33
CCR -	N017218			44	Mujer	0,49
CCR -	N017234			37	Varón	0,47
CCR -	N017250			48	Mujer	0,48
CCR -	N017269			40	Varón	0,82
CCR -	N017365			44	Mujer	0,54
CCR -	N017402			25	Varón	0,65
CCR -	N017410			37	Varón	0,53
CCR -	N018552			42	Varón	0,33
CCR -	N041082			58	Varón	1,16
CCR -	N041138			58	Varón	0,97
CCR -	N044703			54	Varón	0,37
CCR -	N045730			50	Varón	0,57
CCR -	N14397-			58	Varón	0,71
CCR -	N143988			62	Varón	0,49
CCR -	N144358			61	Mujer	0,67
CCR -	N146601			57	Varón	0,81
CCR -	N14661-			61	Mujer	1,14
CCR -	N146695			52	Varón	0,91

ES 2 692 354 T3

CCR -	N14813-			57	Varón	0,72
CCR -	N148279			55	Varón	1,04
CCR -	N148340			51	Varón	1,05
CCR -	N314164			48	Varón	1,00
CCR -	N318050			56	Varón	0,64
CCR -	N318077			56	Varón	1,02
CCR -	N318368			60	Varón	0,50
CCR -	N318384			58	Mujer	0,69
CCR -	N318421			60	Mujer	0,64
CCR -	N325015			42	Varón	0,44
CCR -	N329630			59	Mujer	0,39
CCR -	N370529			57	Varón	0,40
CCR -	N376461			58	Varón	0,26
CCR -	N376488			63	Mujer	0,22
CCR -	N37663-			62	Varón	0,40
CCR -	N376760			58	Mujer	0,57
CCR -	N376912			64	Mujer	0,57
CCR -	N418599			56	Mujer	0,23
CCR -	N418687			28	Mujer	0,19
CCR -	N418716			53	Mujer	0,65
CCR -	N418740			54	Varón	0,75
CCR -	N418759			49	Mujer	0,84
CCR -	N418804			54	Mujer	0,24
CCR -	N440216			60	Mujer	0,40
CCR -	N440478			60	Mujer	0,49
CCR -	N440507			64	Varón	1,02
CCR -	N469775			36	Varón	0,47
CCR -	N491028			50	Varón	0,59
CCR -	N491191			52	Mujer	1,16
CCR -	N491247			58	Varón	0,35
CCR -	N491386			58	Varón	0,71
CCR -	N491685			56	Varón	0,52
CCR -	N511463			52	Mujer	0,46
CCR -	N511471			59	Mujer	0,68
CCR -	N511498			55	Mujer	0,58
CCR -	N518059			0	Varón	0,69
CCR -	N518518			58	Mujer	0,78
CCR -	N518542			60	Varón	0,81
CCR -	N519086			59	Varón	0,80
CCR -	N527135			56	Mujer	0,39
CCR -	N527450			56	Mujer	0,38
CCR -	N557699			55	Varón	1,40
CCR -	N557701			57	Varón	1,66
CCR -	N557736			56	Varón	0,41
CCR -	N557760			60	Varón	1,68
CCR -	N593116			52	Mujer	0,29
CCR -	N593167			53	Varón	1,12
CCR -	N593183			52	Mujer	0,25
CCR -	N593255			51	Varón	1,88
CCR -	N593351			57	Varón	1,34
CCR -	N744056			51	Varón	0,61
CCR -	N748022			50	Mujer	0,33
CCR -	N835966			45	Varón	0,62
CCR -	N836299			52	Mujer	1,13
CCR -	N857704			52	Mujer	0,29
CCR -	N858037			63	Mujer	1,15
CCR -	N858248			62	Varón	1,72
CCR -	N862239			53	Varón	0,24
CCR -	N862298			63	Varón	0,42
CCR -	N862300			51	Varón	1,81

a: MDI = Enfermedades digestivas inflamatorias (Crohn y Rectocolito hemorrágico) CCR+ = pacientes que padecen cáncer colorrectal (Adenocarcinoma), CCR- = sujetos sanos.

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

los análisis obtenidos para los pacientes analizados se detallan en la Figura 6. Cabe señalar en esta figura y en la tabla 4 que 2, 2, 10 y 2 pacientes que padecen cáncer colorrectal respectivamente de fase I, II, III o IV muestran un claro aumento de su dosis de Prodefensina-A6 sérica, estrictamente superior al valor más elevado observado en el grupo de los sujetos sanos (1,88 pg/ml). En el grupo Adenoma, ninguna dosis observada supera este valor, mientras que en el grupo MDI, hay 2.

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

La Solicitante ha mostrado en el ejemplo 3 que unas dosis anormalmente elevadas de proteína precursora Prodefensina-A6 podían observarse en la circulación sanguínea de algunos pacientes que padecen cáncer colorrectal. Por otro lado, la Solicitante ha mostrado en las solicitudes de patente WO2009/024691, WO2009019365, WO2009019368, WO2009019369, WO2009019366, WO2009019370, WO2009019367 que unas dosis anormalmente elevadas o anormalmente disminuidas de otros marcadores tumorales como LEI, Ezrina, Aminoacilasa-1, L-FABP, Apo A1, Apo A2, Plastina I, Beta2 Microglobulina, ACE, CA19-9, Testosterona, Galectina-3, LDH-B, Proteasoma 20S, E-Caderina, Proteína 3 alfa Derivada de Islotes Regeneradores, denominado de otra manera Proteína Asociada a Pancreatitis (PAP1) podían observarse en la circulación sanguínea de algunos pacientes que padecen cáncer colorrectal. Los procedimientos de análisis de estos marcadores tumorales se han descrito en las solicitudes de patentes antes citadas. El procedimiento de análisis de MIF se realizó con el kit ELISA human MIF Quantikine de R&D Systems (Cat nº DMF00) según las instrucciones del fabricante.

De manera sorprendente, el aumento o la disminución de la dosis sanguínea de dos marcadores dados no se observa sistemáticamente en los mismos pacientes. De este modo, la combinación de varios marcadores tumorales permite aumentar el número de pacientes identificados como que tienen cáncer colorrectal. Es así que un paciente A puede presentar un aumento o una disminución de uno o varios marcadores tumorales (grupo X), pudiendo dichos marcadores del grupo X ser normales en un paciente B; en este mismo paciente B uno u otros varios marcadores tumorales (grupo Y) pueden elevarse o disminuirse, pudiendo dichos marcadores del grupo Y ser normales en el paciente A.

Los diferentes marcadores tumorales analizados por el Solicitante pueden combinarse así mediante diversos algoritmos matemáticos bien conocidos por el experto en la materia. A título ilustrativo, y sin que este ejemplo tenga un carácter exhaustivo, se ha realizado el procedimiento siguiente:

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

2. Cuando la dosis sanguínea del marcador tumoral aumentaba en caso de cáncer colorrectal, la dosis sanguínea obtenida para un paciente dado se dividió por su valor umbral. 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 umbral.

3. Cuando la relación dosis sanguínea dividida por el valor umbral 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 en ponderándolos de un factor propio de cada marcador. En el caso del ejemplo a continuación, todos los factores de ponderación se han fijado a 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 tiene cáncer colorrectal cuando su resultado total aumentaba con respecto a un resultado umbral.

Los resultados totales para una selección de 2, 3, 4, 5, 7 y 8 marcadores que comprenden la Prodefensina-A6 se dan en la tabla 5.

La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6 y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados "2^a" aumentados en 41 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6 y de ACE aumentaba respectivamente en 17 y 28 pacientes solamente.

La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6 y CA19-9 permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados "2^b" aumentados en 28 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6 y de ACE aumentaba respectivamente en 17 y 15 pacientes solamente.

- 5 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6 y Beta-2 Microglobulina permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “2^c” aumentados en 49 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6 y de Beta-2 Microglobulina aumentaba respectivamente en 17 y 43 pacientes solamente.
- 10 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6 y L-FABP permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “2^d” aumentados en 41 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6 y de L-FABP aumentaba respectivamente en 17 y 35 pacientes solamente.
- 15 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, CA19-9 y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “3^e” aumentados en 46 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de CA19-9 y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 15 y 28 pacientes solamente.
- 20 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “3^f” aumentados en 60 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de Beta-2 Microglobulina y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 43 y 28 pacientes solamente.
- 25 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9 y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “4^g” aumentados en 63 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de Beta-2 Microglobulina, de CA19-9 y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 43, 15 y 28 pacientes solamente.
- 30 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, L-FABP y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “4^h” aumentadas en 69 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de Beta-2 Microglobulina, de L-FABP y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 43, 35 y 28 pacientes solamente.
- 35 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, CA19-9, L-FABP y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “4ⁱ” aumentados en 59 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de CA19-9, de L-FABP y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 15, 35 y 28 pacientes solamente.
- 40 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, L-FABP, MIF y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “4^j” aumentados en 74 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de Beta-2 Microglobulina, de CA19-9, de L-FABP, de MIF y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 43, 15, 13, 35, 23 y 28 pacientes solamente.
- 45 La asociación de los marcadores tumorales Prodefensina-A6, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Galectine-3, L-FABP, MIF, Plastina I y ACE permite así obtener, para el mismo grupo de 78 pacientes unos resultados “8^k” aumentados en 75 pacientes que padecen adenocarcinoma colorrectal mientras que el único análisis de Prodefensina-A6, de Beta-2 Microglobulina, de CA19-9, de Galectine-3, de L-FABP, de MIF, de Plastina I y de ACE aumentaba respectivamente en 17, 43, 15, 13, 35, 23, 3 y 28 pacientes solamente.
- 50

Tabla 5

Patología	Identificación paciente	Resultado 2 ^a	Resultado 2 ^b	Resultado 2 ^c	Resultado 2 ^d	Resultado 3 ^e	Resultado 3 ^f	Resultado 4 ^g	Resultado 4 ^h	Resultado 4 ⁱ	Resultado 5 ^j	Resultado 7 ^k	Resultado 8 ^l
CCR -	N011155	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
CCR -	N011243	0,18	0,18	0,18	0,14	0,18	0,18	0,18	0,14	0,14	0,14	0,14	0,14
CCR -	N14661-	0,61	0,61	0,61	0,39	0,61	0,61	0,61	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
CCR -	N044703	0,20	0,20	0,20	0,21	0,20	0,20	0,20	0,21	0,21	0,21	0,21	0,21
CCR -	N318050	0,34	0,34	0,34	0,31	0,34	0,34	0,34	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31
CCR	N41859	0,12	0,12	0,12	0,23	0,12	0,12	0,12	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23

ES 2 692 354 T3

-	9												
CCR	N01741	0,28	0,28	0,28	0,27	0,28	0,28	0,28	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
-	0												
CCR	N32963	0,21	0,21	0,21	0,33	0,21	0,21	0,21	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
-	0												
CCR	N04573	0,30	0,30	0,30	0,32	0,30	0,30	0,30	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
-	0												
CCR	N59311	0,15	0,15	0,15	0,27	0,15	0,15	0,15	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
-	6												
CCR	N01855	0,18	0,18	0,18	0,27	0,18	0,18	0,18	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
-	2												
CCR	N01721	0,26	0,26	0,26	0,38	0,26	0,26	0,26	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
-	8												
CCR	N01114	0,46	0,46	0,46	0,43	0,46	0,46	0,46	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
-	7												
CCR	N01736	0,29	0,29	0,29	0,33	0,29	0,29	0,29	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
-	5												
CCR	N44021	0,21	0,21	0,21	0,33	0,21	0,21	0,21	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
-	6												
CCR	N37691	0,30	0,30	0,30	0,38	0,30	0,30	0,30	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
-	2												
CCR	N52745	0,20	0,20	0,20	0,34	0,20	0,20	0,20	0,34	0,34	0,34	0,34	0,34
-	0												
CCR	N74802	0,18	0,18	0,18	0,26	0,18	0,18	0,18	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
-	2												
CCR	N59318	0,13	0,13	0,13	0,32	0,13	0,13	0,13	0,32	0,32	0,32	0,32	0,32
-	3												
CCR	N00990	0,35	0,35	0,35	0,46	0,35	0,35	0,35	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46
-	1												
CCR	N01726	0,44	0,44	0,44	0,49	0,44	0,44	0,44	0,49	0,49	0,49	0,49	0,49
-	9												
CCR	N37646	0,14	0,14	0,14	0,37	0,14	0,14	0,14	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37
-	1												
CCR	N86230	0,96	0,96	0,96	0,77	0,96	0,96	0,96	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77
-	0												
CCR	N37648	0,12	0,12	0,12	0,42	0,12	0,12	0,12	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
-	8												
CCR	N01723	0,25	0,25	0,25	0,47	0,25	0,25	0,25	0,47	0,47	0,47	0,47	0,47
-	4												
CCR	N52713	0,21	0,21	0,21	0,44	0,21	0,21	0,21	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
-	5												
CCR	N44047	0,26	0,26	0,26	0,44	0,26	0,26	0,26	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
-	8												
CCR	N01740	0,35	0,35	0,35	0,56	0,35	0,35	0,35	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56
-	2												
CCR	N49119	0,62	0,62	0,60	0,62	0,62	0,60	0,60	0,60	0,62	0,60	0,55	0,55
-	1												
CCR	N83596	0,33	0,33	0,56	0,25	0,33	0,56	0,56	0,43	0,25	0,43	0,45	0,45
-	6												
CCR	N01725	0,21	0,22	0,26	0,29	0,20	0,21	0,20	0,25	0,23	0,23	0,23	0,23
-	0												
CCR	N14435	0,36	0,36	0,49	0,28	0,36	0,49	0,49	0,39	0,28	0,39	0,40	0,40
-	8												
CCR	N14398	0,26	0,26	0,51	0,33	0,26	0,51	0,51	0,47	0,33	0,47	0,48	0,48
-	8												
CCR	N51149	0,30	0,23	0,51	0,35	0,25	0,44	0,37	0,43	0,29	0,37	0,34	0,33
-	8												
CCR	N31838	0,44	0,19	0,49	0,31	0,30	0,50	0,38	0,44	0,29	0,35	0,37	0,33
-	4												
CCR	N14834	0,32	0,33	0,62	0,54	0,24	0,44	0,35	0,46	0,32	0,39	0,42	0,39
-	0												
CCR	N49138	0,20	0,20	0,48	0,44	0,14	0,32	0,25	0,37	0,23	0,30	0,33	0,29
-	6												
CCR	N51851	0,49	0,29	0,59	0,48	0,38	0,59	0,48	0,57	0,42	0,49	0,44	0,39
-	8												
CCR	N51854	0,32	0,22	0,57	0,22	0,22	0,45	0,34	0,34	0,16	0,27	0,28	0,29
-	2												
CCR	N85824	0,61	0,63	0,87	0,72	0,52	0,68	0,60	0,65	0,53	0,59	0,55	0,48
-	8												
CCR	N49124	0,35	0,19	0,42	0,35	0,30	0,46	0,39	0,47	0,36	0,42	0,43	0,39
-	7												
CCR	N14827	0,38	0,35	0,70	0,46	0,30	0,53	0,44	0,49	0,32	0,42	0,44	0,40

ES 2 692 354 T3

-	9												
CCR	N41868	0,26	0,06	0,45	0,23	0,18	0,44	0,33	0,42	0,22	0,34	0,41	0,36
-	7												
CCR	N85770	0,22	0,33	0,44	0,22	0,32	0,39	0,42	0,37	0,31	0,39	0,46	0,41
-	4												
CCR	N59325	0,65	0,54	0,97	0,72	0,46	0,74	0,58	0,67	0,45	0,55	0,50	0,43
-	5												
CCR	N86229	0,37	0,15	0,22	0,22	0,27	0,37	0,27	0,37	0,27	0,27	0,41	0,33
-	8												
CCR	N31842	0,58	0,21	0,67	0,47	0,41	0,72	0,56	0,69	0,46	0,57	0,56	0,49
-	1												
CCR	N51147	0,29	0,21	0,53	0,47	0,22	0,43	0,33	0,46	0,31	0,38	0,38	0,36
-	1												
CCR	N32501	0,40	0,48	0,50	0,33	0,51	0,52	0,58	0,50	0,49	0,55	0,54	0,47
-	5												
CCR	N14669	0,27	0,30	0,54	0,46	0,22	0,38	0,32	0,39	0,27	0,34	0,36	0,32
-	5												
CCR	N31807	0,47	0,32	0,64	0,59	0,35	0,56	0,44	0,58	0,42	0,48	0,51	0,46
-	7												
CCR	N85803	0,40	0,32	0,71	0,50	0,28	0,53	0,41	0,49	0,30	0,40	0,47	0,42
-	7												
CCR	N51146	0,16	0,20	0,46	0,29	0,16	0,33	0,29	0,34	0,20	0,30	0,43	0,40
-	3												
CCR	N59316	0,45	0,62	0,59	0,47	0,51	0,49	0,53	0,46	0,47	0,50	0,50	0,55
-	7												
CCR	N55773	0,57	0,14	0,41	0,23	0,40	0,58	0,45	0,50	0,36	0,41	0,41	0,39
-	6												
CCR	N31416	0,36	0,46	0,58	0,56	0,37	0,45	0,43	0,48	0,42	0,46	0,54	0,47
-	4												
CCR	N86223	0,31	0,29	0,44	0,24	0,36	0,46	0,46	0,43	0,36	0,44	0,46	0,40
-	9												
CCR	N49168	0,26	0,17	0,64	0,42	0,20	0,51	0,40	0,52	0,29	0,43	0,49	0,44
-	5												
CCR	N51805	0,27	0,22	0,55	0,58	0,20	0,42	0,34	0,52	0,35	0,43	0,47	0,48
-	9												
CCR	N51908	0,31	0,32	0,56	0,52	0,28	0,44	0,38	0,48	0,36	0,43	0,43	0,45
-	6												
CCR	N37663	0,33	0,61	0,55	0,35	0,55	0,52	0,64	0,51	0,54	0,61	0,62	0,55
-	-												
CCR	N44050	0,43	0,28	0,76	0,54	0,30	0,61	0,47	0,59	0,36	0,48	0,53	0,46
-	7												
CCR	N37676	0,65	0,52	0,53	0,43	0,68	0,69	0,70	0,65	0,65	0,67	0,64	0,59
-	0												
CCR	N46977	0,24	0,17	0,50	0,39	0,20	0,41	0,33	0,44	0,28	0,37	0,47	0,41
-	5												
CCR	N49102	0,26	0,20	0,54	0,35	0,20	0,43	0,34	0,42	0,25	0,35	0,44	0,39
-	8												
CCR	N14660	0,51	0,42	0,63	0,48	0,47	0,61	0,56	0,59	0,49	0,55	0,62	0,54
-	1												
CCR	N55770	0,55	0,68	0,83	0,75	0,52	0,63	0,59	0,63	0,55	0,59	0,57	0,50
-	1												
CCR	N55776	0,56	0,56	0,80	0,95	0,45	0,60	0,51	0,70	0,58	0,61	0,58	0,56
-	0												
CCR	N55769	0,60	0,72	0,82	0,56	0,63	0,70	0,70	0,62	0,57	0,63	0,63	0,61
-	9												
CCR	N59335	0,76	0,48	0,63	0,59	0,59	0,68	0,58	0,63	0,56	0,55	0,55	0,61
-	1												
CCR	N74405	0,30	0,48	0,47	0,28	0,42	0,41	0,47	0,36	0,37	0,42	0,49	0,42
-	6												
CCR	CBSE0	5,13	5,12	12,17	5,43	3,45	8,15	6,13	6,29	2,76	5,05	6,17	5,30
+	11												
CCR	CLSP0	0,35	0,18	0,44	5,71	0,27	0,44	0,35	3,12	2,99	2,51	3,45	3,04
+	59												
CCR	CLSP1	0,27	7,10	0,44	0,48	4,85	0,40	3,80	0,49	3,82	3,19	5,63	4,96
+	04												
CCR	CBSE0	0,77	0,77	0,77	10,28	0,77	0,77	0,77	10,28	10,28	10,28	10,28	10,28
+	01												
CCR	CBSE0	19,26	5,83	12,92	6,18	12,85	17,57	13,18	13,35	9,81	10,69	9,02	7,73
+	16												
CCR	CBSE0	0,20	0,08	8,62	0,38	0,14	5,83	4,38	4,53	0,26	3,62	6,91	5,93
+	22												
CCR	CBSE0	0,72	0,50	8,93	0,87	0,55	6,18	4,69	4,87	0,65	3,94	5,58	4,80

ES 2 692 354 T3

+	25												
CCR	CLSP0	0,29	0,17	5,46	0,37	0,20	3,73	2,80	2,90	0,26	2,33	1,84	1,66
+	47												
CCR	CLSP0	0,37	5,28	6,47	0,40	3,67	4,46	5,91	3,47	2,88	4,83	5,23	4,66
+	62												
CCR	CLSP0	0,21	0,14	0,54	7,28	0,16	0,42	0,33	3,90	3,70	3,13	2,40	2,16
+	67												
CCR	CLSP0	0,40	0,46	5,77	0,69	0,35	3,89	2,97	3,89	0,35	2,97	2,19	1,88
+	80												
CCR	CLSP0	8,75	8,75	9,14	9,00	5,89	6,15	4,65	4,78	4,58	3,86	2,95	2,61
+	85												
CCR	CLSP0	168,1	0,24	0,35	0,31	112,2	112,3	84,30	84,34	84,29	67,54	48,35	42,34
+	86												
CCR	CLSP0	0,24	0,26	0,42	8,93	0,26	0,37	0,36	4,69	4,61	3,81	2,85	2,52
+	93												
CCR	CLSP1	0,44	0,19	6,86	7,48	0,35	4,79	3,63	7,28	3,95	5,86	4,32	3,79
+	00												
CCR	CLSP1	0,21	0,22	0,63	0,44	0,15	0,42	0,33	0,44	0,23	0,36	0,40	2,32
+	18												
CCR	CLSP1	0,51	0,42	7,10	0,78	0,38	4,83	3,65	3,83	0,49	3,09	2,41	2,11
+	45												
CCR	CLSP1	0,17	0,23	0,36	7,47	0,22	0,31	0,32	3,94	3,87	3,22	3,99	3,50
+	46												
CCR	CBSE0	0,37	0,27	7,18	0,18	0,41	5,02	3,89	3,85	0,39	3,18	9,53	8,19
+	04												
CCR	CBSE0	17,51	0,36	7,89	0,74	11,73	16,76	12,61	12,80	9,03	10,28	8,72	7,47
+	17												
CCR	CBSE0	0,19	0,17	0,42	0,26	0,19	0,36	0,32	0,36	0,24	0,33	2,80	2,40
+	18												
CCR	CLSP0	0,54	0,56	5,38	0,66	0,51	3,72	2,90	3,72	0,51	2,90	4,01	3,45
+	43												
CCR	CLSP0	0,64	0,66	8,88	6,69	0,65	6,13	4,76	7,77	3,66	6,35	5,39	4,66
+	60												
CCR	CLSP0	0,59	0,45	7,11	0,66	0,43	4,87	3,67	3,78	0,45	3,04	2,32	2,03
+	87												
CCR	CLSP0	13,90	7,95	0,67	5,87	14,44	9,58	11,07	10,03	13,67	11,13	8,01	7,01
+	88												
CCR	CLSP0	19,94	0,29	8,65	0,44	13,42	18,99	14,34	14,41	10,23	11,60	8,42	7,37
+	96												
CCR	CLSP1	23,90	0,88	7,46	0,73	16,23	20,62	15,69	15,61	12,32	12,67	10,82	9,47
+	05												
CCR	CLSP1	0,44	0,47	0,36	5,91	0,54	0,47	0,54	3,26	3,31	2,75	2,07	1,83
+	07												
CCR	CLSP1	0,31	0,29	0,49	8,43	0,28	0,41	0,36	4,43	4,33	3,59	2,66	2,33
+	13												
CCR	CLSP1	9,90	9,72	18,17	26,81	6,66	12,29	9,27	17,81	13,59	14,29	11,93	10,44
+	15												
CCR	CLSP1	0,75	0,57	8,98	7,36	0,60	6,20	4,72	8,12	3,92	6,55	6,25	5,48
+	17												
CCR	CLSP1	0,22	0,26	7,33	5,92	0,18	4,89	3,69	6,52	2,99	5,24	3,94	3,47
+	19												
CCR	CLSP1	0,66	0,40	0,68	0,47	0,56	0,75	0,65	0,69	0,55	0,62	3,60	3,15
+	22												
CCR	CLSP1	0,26	0,25	0,47	0,48	0,31	0,45	0,43	0,55	0,44	0,52	0,62	0,56
+	36												
CCR	CLSP1	7,99	0,40	0,80	0,82	5,37	5,64	4,26	4,47	4,27	3,60	2,69	2,37
+	43												
CCR	CLSP1	0,39	0,22	8,75	0,48	0,27	5,96	4,48	4,60	0,34	3,69	4,34	3,81
+	47												
CCR	CLSP1	9,94	0,43	6,34	0,49	6,76	10,70	8,13	8,16	5,20	6,60	4,93	4,31
+	54												
CCR	GHBD0	0,32	0,38	5,61	0,76	0,29	3,78	2,89	3,08	0,46	2,51	1,93	1,72
+	20												
CCR	GHBD0	0,27	0,25	6,97	0,46	0,21	4,69	3,55	3,65	0,29	2,94	2,29	2,00
+	25												
CCR	GHBD0	5,94	6,09	6,28	6,27	4,08	4,21	3,25	3,34	3,24	2,74	2,09	1,82
+	29												
CCR	CBSE0	11,39	11,65	17,84	18,52	7,78	11,91	9,07	12,51	9,42	10,12	12,87	11,28
+	05												
CCR	CBSE0	24,67	24,68	49,15	24,98	16,52	24,67	16,52	16,71	12,59	12,59	12,59	10,10
+	06												
CCR	CBSE0	5,49	5,45	10,74	25,72	3,71	5,49	3,71	17,23	12,96	12,96	12,96	10,38

ES 2 692 354 T3

+	07												
CCR	CBSE010	30,57	73,65	30,99	32,35	53,22	24,78	43,22	22,56	43,90	37,76	34,94	29,99
+													
CCR	CBSE013	12,31	17,52	20,52	18,49	11,91	13,91	13,20	13,69	12,19	13,17	12,77	10,95
+													
CCR	CBSE023	5,78	5,68	5,84	5,83	4,02	4,13	3,22	3,30	3,22	2,74	2,42	2,11
+													
CCR	CLSP044	103,9	0,25	0,53	0,29	69,37	69,55	52,23	52,25	52,11	41,85	30,04	26,32
+													
CCR	CLSP050	5,97	5,86	13,93	11,14	4,03	9,40	7,09	9,73	5,70	7,81	7,77	6,84
+													
CCR	CLSP072	11,33	14,86	14,32	11,06	13,61	13,25	14,48	12,58	12,85	13,70	9,96	8,73
+													
CCR	CLSP073	0,67	14,22	7,20	6,00	9,65	4,96	10,62	6,51	10,02	10,73	7,76	6,81
+													
CCR	CLSP074	0,29	0,41	6,82	0,66	0,36	4,63	3,59	3,71	0,51	3,07	2,31	2,07
+													
CCR	CLSP089	25,65	0,62	9,83	0,41	17,37	23,51	17,84	17,73	13,13	14,35	10,39	9,11
+													
CCR	CLSP091	5,55	0,27	0,39	6,43	3,83	3,91	3,03	6,11	6,05	4,96	3,71	3,26
+													
CCR	CLSP094	6,67	0,36	0,25	0,31	4,61	6,67	4,61	4,57	3,54	3,54	2,89	2,44
+													
CCR	CLSP097	0,31	0,30	0,64	0,55	0,27	0,50	0,42	0,55	0,38	0,48	0,46	0,40
+													
CCR	CLSP106	5,05	5,13	12,36	11,50	3,42	8,24	6,22	9,40	5,78	7,55	5,53	4,84
+													
CCR	CLSP121	0,22	0,23	0,51	0,41	0,21	0,40	0,35	0,44	0,30	0,39	1,93	1,69
+													
CCR	CLSP123	0,63	0,62	9,03	14,97	0,51	6,12	4,66	11,83	7,63	9,52	11,26	9,85
+													
CCR	CLSP138	9,60	0,30	8,82	0,56	6,42	12,10	9,09	9,22	4,96	7,39	5,43	4,76
+													
CCR	CLSP141	0,43	0,38	0,63	10,19	0,32	0,49	0,40	5,30	5,18	4,27	3,31	2,90
+													
CCR	CLSP153	33,40	23,59	21,96	29,87	28,97	27,88	25,93	29,08	29,89	27,28	19,56	17,12
+													
CCR	GHBD019	7,06	0,24	0,68	0,60	4,71	5,00	3,75	3,93	3,71	3,14	2,34	2,08
+													
CCR	CBSE012	5,81	12,11	0,47	0,30	11,85	4,10	9,06	3,16	8,98	7,32	6,19	5,30
+													
CCR	CBSE019	6,40	0,63	0,88	7,05	4,42	4,58	3,55	6,76	6,64	5,50	4,71	4,04
+													
CCR	CBSE026	195,7	119,8	8,71	6,43	210,2	136,2	161,9	105,3	160,8	132,1	95,87	83,92
+													
CCR	CBSE027	175,0	0,55	5,36	5,79	175,0	120,0	120,0	92,78	120,3	92,78	68,71	61,25
+													
CCR	CLSP042	153,8	0,76	5,43	8,15	102,8	105,9	79,62	83,31	80,98	66,81	50,00	43,77
+													
CCR	CLSP057	15,32	0,19	0,40	10,84	10,30	10,44	7,89	13,21	13,11	10,62	12,94	12,80
+													
CCR	CLSP068	337,0	120,0	5,60	7,64	304,4	228,2	231,0	174,8	232,0	187,7	138,3	121,2
+													
CCR	CLSP079	0,43	25,92	0,59	0,60	25,92	0,59	17,53	0,65	17,54	13,34	9,16	7,91
+													
CCR	CLSP083	0,37	0,46	0,46	0,54	0,41	0,42	0,43	0,48	0,47	0,48	0,44	0,39
+													
CCR	CLSP095	150,8	0,59	0,59	5,56	100,8	100,8	75,81	78,29	78,29	62,80	46,47	40,69
+													
CCR	CLSP109	0,47	9,79	0,63	34,00	9,79	0,63	6,79	22,93	29,04	21,97	17,37	14,96
+													
CCR	CLSP132	7,74	7,84	15,99	17,61	5,42	10,86	8,34	13,23	9,15	10,74	9,52	8,36
+													
CCR	CLSP156	45,79	24,26	8,49	0,73	46,47	35,97	38,94	27,17	35,05	31,31	28,46	24,92
+													
CCR	CLSP159	67,36	33,80	6,71	0,66	67,28	49,22	53,70	37,13	50,67	43,13	32,70	28,61
+													
CCR	CLSP160	7,86	7,49	7,73	42,10	5,32	5,48	4,17	21,48	21,36	17,23	12,46	10,90
+													
CCR	CLSP161	18,00	0,52	8,72	0,61	12,23	17,70	13,45	13,49	9,40	10,94	7,99	6,99
+													
Umbral		0,96	0,96	0,97	0,95	0,96	0,96	0,96	0,77	0,77	0,77	0,77	0,77

Especificidad(%)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sensibilidad (%)	52,56	35,90	62,82	89,13	58,97	76,92	80,77	88,46	75,64	91,03	94,87	96,15
CCR + superior al umbral	41	28	49	41	46	60	63	69	59	71	74	75

Resultado 2^a: asociación ACE, Prodefensina-A6

Resultado 2^b: asociación CA19-9, Prodefensina-A6

Resultado 2^c: asociación Beta-2 Microglobulina, Prodefensina-A6

Resultado 2^d: asociación L-FABP, -Prodefensina A6

Resultado 3^e: asociación ACE, CA19-9, Prodefensina-A6

Resultado 3^f: asociación ACE, Beta-2 Microglobulina, Prodefensina-A6

Resultado 4^g: asociación ACE, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Prodefensina-A6

Resultado 4^h: asociación ACE, Beta-2 Microglobulina, L-FABP, Prodefensina-A6

Resultado 4ⁱ: asociación ACE, CA19-9, L-FABP, Prodefensina-A6

Resultado 5^j: asociación ACE, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, L-FABP, Prodefensina-A6

Resultado 7^k: asociación ACE, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Galectina 3, Prodefensina-A6, L-FABP, MIF

Resultado 8^l: asociación ACE, Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Prodefensina-A6, Galectina-3, L-FABP, MIF, Plastina I

CCR+ = pacientes que padecen cáncer colorrectal (Adenocarcinoma), CCR- = sujetos sanos.

Ejemplo 5: Detección de los marcadores tumorales mediante la técnica LC-MRM-MS

1. Metodología

5

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

10

El desarrollo se ha realizado sobre unas muestras sobrecargadas (spike) añadiendo el péptido sintético Prodefensina-A6 (SEQ ID^o1).

15

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

20

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

30

Fraccionamiento SPE. Las muestras secas se recogen en 1 ml de tampón acetato y se cargan sobre los cartuchos mixtos (hidrófobo e intercambio de catión) Oasis MCX (intercambio catiónico mixto) 60 mg (Waters) equilibrados previamente en tampón acetato y metanol. Los cartuchos se lavan mediante 1 ml de tampón acetato y 1 ml de metanol. Los péptidos de interés (tabla 6) se eluyen mediante 1 ml de una mezcla metanol/tampón acetato (50/50 v/v)). El pH del tampón acetato se selecciona en función del punto isoeléctrico del péptido de interés. Los eluatos se secan a vacío, se disuelven en 200 µl de una solución de acetonitrilo/agua (3/97 v/v) que contiene un 0,1% de ácido fórmico. Se ha inyectado un alícuota de 50 µl en la LC acoplada con un sistema MS-MS.

35

40

Cromatografía líquida y espectrometría de masa. Se ha efectuado el análisis LC-MS sobre un sistema cromatográfico de alta presión (HPLC) de tipo HP 1100 series con bomba binaria e inyector (Agilent Technologies) acoplado a un espectrómetro de masa, o bien un Sciex API 2000 triple cuadrípulo, o bien un Sciex API 4000 Qtrap (MS híbrido triple cuadrípulo – trampilla iónica) (MDS Sciex) para una mejor sensibilidad. La separación LC se ha efectuado sobre una columna C₁₈Symmetry (Waters), a un caudal de elución de 300 µl/min. (Eluent A = 0,1% ácido fórmico en agua, eluyente B = 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo, gradiente lineal de 5%B a 50%B en 25 min, después de 50%B a 100%B en 3 min). El análisis MS se realiza en modo de ionización positiva a una tensión de 5500 V aplicada en la aguja que permite la ionización en la fuente. El control del instrumento y la adquisición de los datos se realizan con el programa Analyst 1,4,1. Los caudales del gas de nebulización (aire) y del gas cortina (nitrógeno) son de 30 y 20 psi, respectivamente. La fuente iónica Turbo V™ se ajusta a 400°C, el flujo de nitrógeno auxiliar a 40 psi. Las transiciones MRM registradas para cada péptido se resumen en la tabla 6. La energía de colisión (CE), la tensión de orificio (DP, potencial de deagregación) y la tensión en la salida de la célula de colisión

45

(CXP, potencial de salida de la celda de colisión) se optimizan para cada una de las transiciones MRM seleccionadas.

2. Resultados

5 La lista de las transiciones MRM teóricas de la secuencia SEQ ID nº1 se ha generado utilizando el programa MIDAS (Detección y Secuenciación Iniciada por MRM). Esta lista comprende todos los iones parientes di- o tri- cargados de los péptidos trípticos teóricos en un intervalo de masa que va de 800 a 3000 Da y todos los iones fragmentos posible de tipo y o b. Para cada proteína, se ha ensayado cada transición posible a fin de determinar las transiciones más sensibles y más específicas. El resultado de esta selección se recapitula en la tabla 6. Un ejemplo de optimización de la etapa SPE para la transición 727/556 del péptido EPLQAEDDPLQAK (SEQ ID nº30) se presenta en la Figura 7. La separación cromatográfica MCX se ha realizado a diferentes pH, siendo el pH seleccionado para la continuación de los experimentos el pH que permite obtener el área del pico más elevado.

15 Además, utilizando un péptido pesado de tipo AQUA (Sigma) o también una proteína recombinante pesada que servirán de patrón de análisis, es posible cuantificar de manera absoluta el marcador tumoral de interés en un medio biológico complejo.

20 Tabla 6

<i>Prodefensina-A6</i>						
Secuencia (SEQ ID nº)	pl	Q1	Q3	DP	CE	CXP
EPLQAEDDPLQAK (SEQ ID nº30)	3,57	727,4	556,4	50	40	28
			218,2	50	35	8
			915,4	50	30	25
			986,4	50	35	27
AYEADAQEQR (SEQ ID nº31)	3,93	590,8	746,4	100	30	11
			817,4	100	30	18
			631,3	100	30	11
			560,3	100	30	11
			946,4	100	35	20

Referencias bibliográficas

- 1: J.D. Potter, 1999, J Natl Cancer Inst, 91, 916-32
 25 2: J. Faivre, 2001, Epidémiologie y dépistage du cancer colorrectal, Ed. Springer
 3: D.E. Jones y C.L. Bevins, 1992, J Biol Chem, 23216-23225
 4: C.L. Bevins *et al.*, 1996, Genomics, 95-106
 5: I. Lawrance *et al.*, 2001, Hum Mol Gen, 445-456
 6: M.J. Nam *et al.*, 2005, J Biol Chem, 8260-8265
 30 7: E. Remold-O'Donnell *et al.*, 1992, Proc Natl Acad Sci USA, 89, 563-5639
 8: J. Cooley *et al.*, 2001, Biochemistry, 15762-15770
 9: M. Algrain *et al.*, 1993, J Cell Biol, 120, 129-139
 10: W.G. Jiang y S. Hiscox, 1996, Anticancer Res, 16, 861-865
 11: S. Hiscox y W.G. Jiang, 1999, J Cell Sci, 112, 3081-3090
 35 12: T. Xiao y al, 2005, Mol Cell Proteomics, 4, 1480-1486
 13: M. Anders y W. Dekant, 1994, Advances in Pharmacology, 431-448
 14: K. Lorentz *et al.*, 1975, Clinica Chimica Acta, 263-269
 15: K. Lorentz y B. Flatter, 1975, Clinica Chimica Acta, 271-274
 16: R.M. Cook *et al.*, 1993, J Biol Chem, 17010-17017
 40 17: Y.E. Miller *et al.*, 1989, J Clin Invest, 2120-2124
 18: S. Balabanov *et al.*, 2001, Eur J Biochem, 5977-5980
 19: E. Chan *et al.*, 1985, J Biol Chem, 260, 2629-2632
 20: R. Das *et al.*, 2001, Clin Cancer Res, 7, 1706-1715
 21: J. Stulik *et al.*, 2001, Electrophoresis, 22, 3019-3025
 45 22: T. Yamazaki *et al.*, 1999, J Surg Oncol, 72, 83-87
 23: D.A. Sweetser *et al.*, 1987, J Biol Chem, 266, 16060-16071
 24: M. Pelsers *et al.*, 2003, Clin Biochem, 36, 529-535
 25: R. Xiao, *et al.*, 2005, Molecular Cancer, 4, 1-17
 26: E.E. Niederkofler *et al.*, 2003, J Lipid Res, 44, 630-639
 50 27: G.L. Hortin, 2006, Clinical Chemistry, 52(7), 1223-1237
 28: J.Y. Engewegen *et al.*, 2006, World J Gastroenterol, 12(10), 1536-1544
 29: Z. Zhang *et al.*, 2004, Cancer Research, 64, 5882-5890
 30: H. Hachem *et al.*, 1986, J Chem Clin Biochem, 24, 161-166
 31: C.S. Lin, *et al.*, 1993, J Biol Chem, 268, 2781-92

- 32: V. Delanote *et al.*, 2005, Acta Pharama Sinica, 769-779
 33: A.P. Arrigo *et al.*, 1988, Nature, 331, 192-194
 34: T. Lavabre-Bertrand *et al.*, 2001, Cancer, 92, 2493-2500
 5 35: S. Nakahara *et al.*, 2005, Apoptosis, 10, 267-275
 36: I. Iurisci *et al.*, 2000, Clin Can Res, 6, 1389-1393
 37: M.K. Schwartz, 2006, Clin Chim Acta, 1992, 77-82
 38: D.J. McCool *et al.*, 1999, Biochem J, 593-600
 39: J.L. Iovanna *et al.*, 1994, Gastroenterology, 106, 728-734
 40: Y. Motoo *et al.*, 1999, Dig Dis Sci, 44, 1142-1147
 10 41: M. Herlyn *et al.*, 1979, Proc Natl Acad Sci USA, 76, 1438-1442
 42: A. Armstrong y S. Eck, 2003, Cancer Biol Ther, 2, 320-325
 43: D. Herlyn *et al.*, 1982, Proc Natl Acad Sci USA, 79, 4761-4765
 44: H. Abe *et al.*, 2002, J Immunol Methods, 270, 227-233
 45: V. Barak *et al.*, 2004, Clin Biochem, 37, 529-540
 15 46: H. Kim *et al.*, 2006, Ann Clin Lab Sci, 36, 294-298
 47: F. Roca *et al.*, 2006, J Surg Oncol, 151-160
 48: C.H. Damsky *et al.*, 1983, Cell, 455-466
 49: M. Katayama *et al.*, 1994, Br J Cancer, 580-585
 50: C. Willmanns *et al.*, 2004, Clin Exp Metastasis, 75-78
 20 51: P. Gold y S. Freedman, 1965, J Exp Med, 467-481
 52: M. Duffy, 2001, Clin Chem, 624-630
 53: Y. Kim *et al.*, 2003, Ann Clin Lab Sci, 32-38
 54: J.L. Magnani *et al.*, 1983, Cancer Research, 43, 5489-5492
 55: J. Holmgren *et al.*, 1984, Br Med J (Clin. Re. Ed.), 288, 1479-1482
 25 56: T.L. Klug *et al.*, 1986, Int J Cancer, 38, 6661-669
 57: P. Kuusela *et al.*, 1991, Br J Cancer, 63, 636-640
 58: M. Holland *et al.*, 1993, Medicina (B. Aires), 53(2), 117-23
 59: F. Model *et al.*, juillet 2006, World Congress on Gastrointestinal Cancer, "Détection of Methylated DNA in Plasma
 from Colorrectal Cancer Patients and Controls by Real-Time PCR Analysis of Septin 9"
 30 60: M.P. Ebert *et al.*, 2006, Gastroentrology, 131(5), 1418-1430
 61: C. Bianco *et al.*, 2006, Clin Cancer Res, 12, 5158-5164
 62: Wilson *et al.*, 2005, Gastroenterology, 129: 1485-1503
 63: Lee *et al.*, 2008, Am. J. Clin. Pathol., 129: 772-779
 64: P.D. Hardt *et al.*, 2004, Br J Cancer, 91(5): 980-984
 35 65: E. Sagiv *et al.*, 2008, Cancer Res, 68(8): 2803-2812
 66: E.S Leman *et al.*, 2007, Cancer Res, 67(12): 5600-5605
 67: M. Jambon *et al.*, 2005, Structural bioinformatics, 21(20): 3929-3930
 68: RA. Bauer *et al.*, 2008, Nucleic Acids Research, 36: 47-54
 69: R. Yasumatsu *et al.*, 2006, Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 291, L619-L627
 40 70: J. Chevalier *et al.*, 1997, J Histochem Cytochem, 45, 481-491
 71: S. Patterson, 2000, Physiological Genomics 2, 59-65
 72: L.J. Kricka *et al.*, 1999, Clinical Chemistry, 45(4), 453-458
 73: S. Tyagi y F.R. Kramer, 1996, Nature Biotech, 14, 303-308
 74: T. F. Imperiale *et al.*, 2004, N Engl J Med, 351(26), 2704-2714
 45 75: D.A. Ahlquist *et al.*, 2000, Gastroenterology, 119, 1219-1227
 76: I. H. Wong, 2006, Methods Mol Biol, 336, 33-46
 77: M. P. Ebert *et al.*, 2005, Neoplasia, 7(8), 771-778
 78: C. Lofton-Day *et al.*, 2007, AACR Annual Meeting 2007, Los Angeles, U.S.A., Poster no LB-165, Clinical case-
 control study in plasma shows that the DNA methylation biomarker, Septin-9, detects 70% of stage I-III colorrectal
 50 cancer patients
 79: P. Métézseau *et al.*, La cytométrie en flux pour l'étude de la célula normale o pathologique (Tome I), Eds Medsi-
 MacGrawhill
 80: J. Mathieu y al, 2006, Fonctions cellulaires y métabolisme. In: (coordonnateurs: Ronot X.*et al.*). La cytométrie en
 flux. Tec & Doc, 255-298. ISBN 978-2-7430-0898-7
 55 81: G. Köhler y C. Milstein, 1975, Nature, 256, 495-497
 82: G. Köhler y C. Milstein, 1976, Eur J Immunol, 6, 511-519

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de diagnóstico *in vitro* del cáncer colorrectal mediante la determinación del aumento de la concentración, con respecto a los valores de referencia determinados para los sujetos sanos, del marcador proteico Prodefensina-A6 en una muestra biológica procedente de un paciente sospechoso de estar afectado de cáncer colorrectal, que utiliza un anticuerpo monoclonal específico de la Prodefensina-A6 que reconoce el epítipo 1 de SEQ ID nº6.
- 10 2. Procedimiento de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se utiliza para la captura de la Prodefensina-A6.
3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la muestra biológica es una muestra distante del tumor.
- 15 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que consiste también en determinar la presencia en una o varias muestras biológicas procedentes de un paciente sospechoso de estar afectado de cáncer colorrectal, de al menos otro marcador tumoral seleccionado entre los marcadores siguientes: Inhibidor de Elastasa Leucocitaria, Ezrina, Aminoacilasa 1, Proteína de Unión a Ácidos Grasos del Hígado, Proteína de Unión a Ácidos Grasos del Intestino, Apolipoproteína AI, Apolipoproteína AII, Plastina-I, Microglobulina Beta 2, Protosoma 20S, Galectina-3, Cadena B de la L-Lactato Deshidrogenasa, Calreticulina, Proteína 3 alfa Derivada de los Islotes Regeneradores, Transductor 1 de la Señal de Calcio Asociado a Tumores, Queratina tipo II Citoesquelética 8, Queratina tipo I Citoesquelética 18, Queratina tipo I Citoesquelética 19, Cadherina Epitelial, ACE, Villina, CA19-9, CA 242, CA 50, CA 72-2, Testosterona, TIMP-1, Cripto-1, Proteína Disulfuro Isomerasa, Intelectina-1, Citoqueratina 20, Proteína Tumoral Controlada Traslacionalmente, (Pro)defensina-A5, MIF, Piruvato Cinasa M2-PK, Calgranulina C, CD24, CCSA-3 (antígeno específico del cáncer de colon) y CCSA-4, la detección de ADN metilado en la sangre, preferiblemente el ADN metilado del gen AXL4 o el ADN metilado del gen Septin-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.
- 20 25 30 35 40 45 50
5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado por que dicho al menos otro marcador es o son:
- L-FABP,
 - CA19-9 y ACE,
 - Beta-2 Microglobulina y ACE
 - Beta-2 Microglobulina, CA19-9 y ACE,
 - Beta-2 Microglobulina, L-FABP y ACE,
 - L-FABP, CA19-9 y ACE,
 - Beta-2 Microglobulina, CA19-9 y ACE,
 - Beta-2 Microglobulina, CA19-9, L-FABP y ACE,
 - Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Galectina-3, L-FABP, MIF y ACE, o
 - Beta-2 Microglobulina, CA19-9, Galectina-3, L-FABP, MIF, Plastina I y ACE.
- 55 6. Utilización del procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el diagnóstico precoz, la detección, el seguimiento terapéutico, el pronóstico y el diagnóstico de las recaídas en el ámbito del cáncer colorrectal.
7. Anticuerpo monoclonal anti-Prodefensina-A6 que reconoce específicamente el epítipo 1 de secuencia SEQ ID nº6.

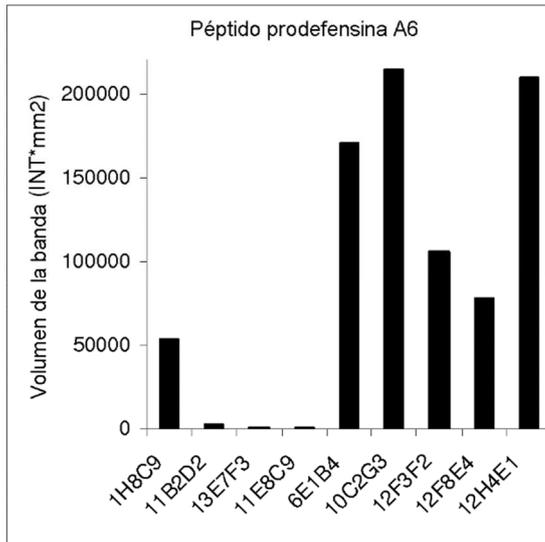


Figura 1A

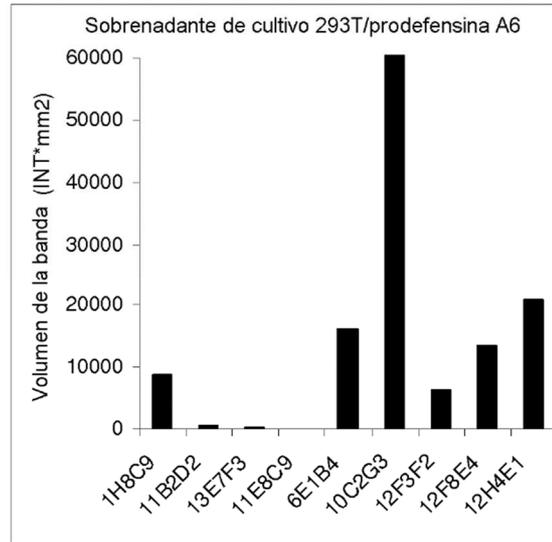


Figura 1B

	Sobrenadante de cultivo 293T/prodefensina A6	Péptido prodefensina A6
1H8C9	8604	53505
11B2D2	630	3255
13E7F3	140	805
11E8C9	0	489
6E1B4	16158	169906
10C2G3	61547	214543
12F3F2	6392	105809
12F8E4	13402	78225
12H4E1	20942	208927

Figura 1C

Figura 1

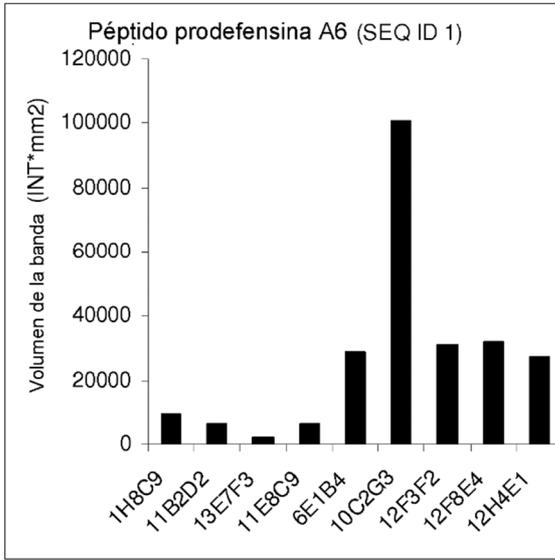


Figura 2A

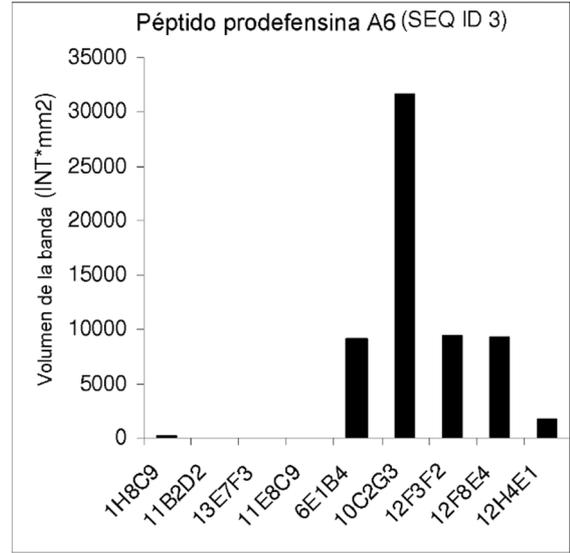
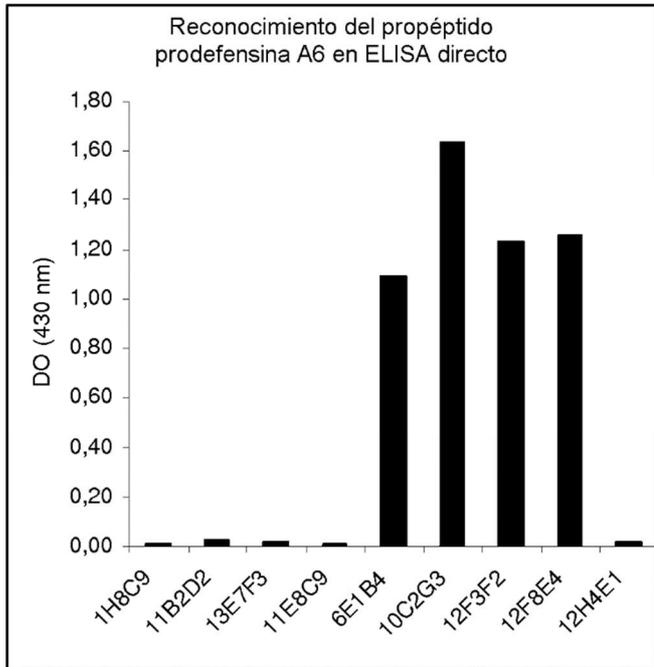


Figura 2B

	Péptido prodefensina A6 (SEQ ID 1)	Péptido prodefensina A6 (SEQ ID 3)	Relación *100
1H8C9	9554	100	1
11B2D2	6015		
13E7F3	2078		
11E8C9	6326		
6E1B4	28726	9027	31
10C2G3	100928	31641	31
12F3F2	31025	9361	30
12F8E4	31791	9308	29
12H4E1	27015	1729	6

Figura 2C

Figura 2

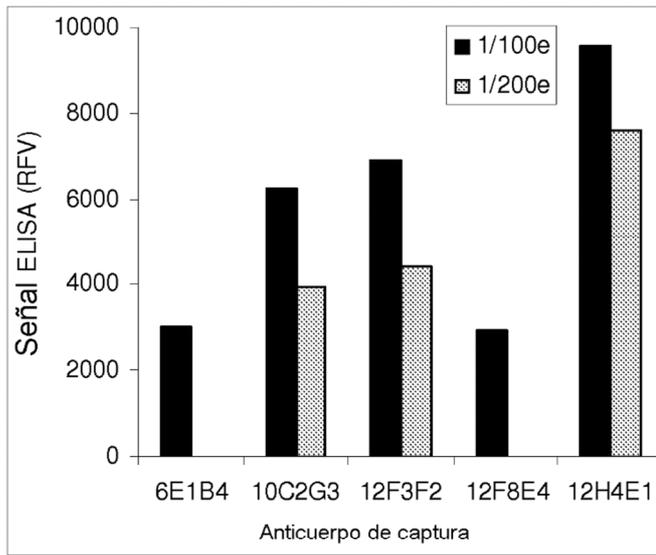


Anticuerpo	Valor DO
1H8C9	0,01
11B2D2	0,02
13E7F3	0,01
11E8C9	0,01
6E1B4	1,09
10C2G3	1,64
12F3F2	1,23
12F8E4	1,26
12H4E1	0,02

Figura 3

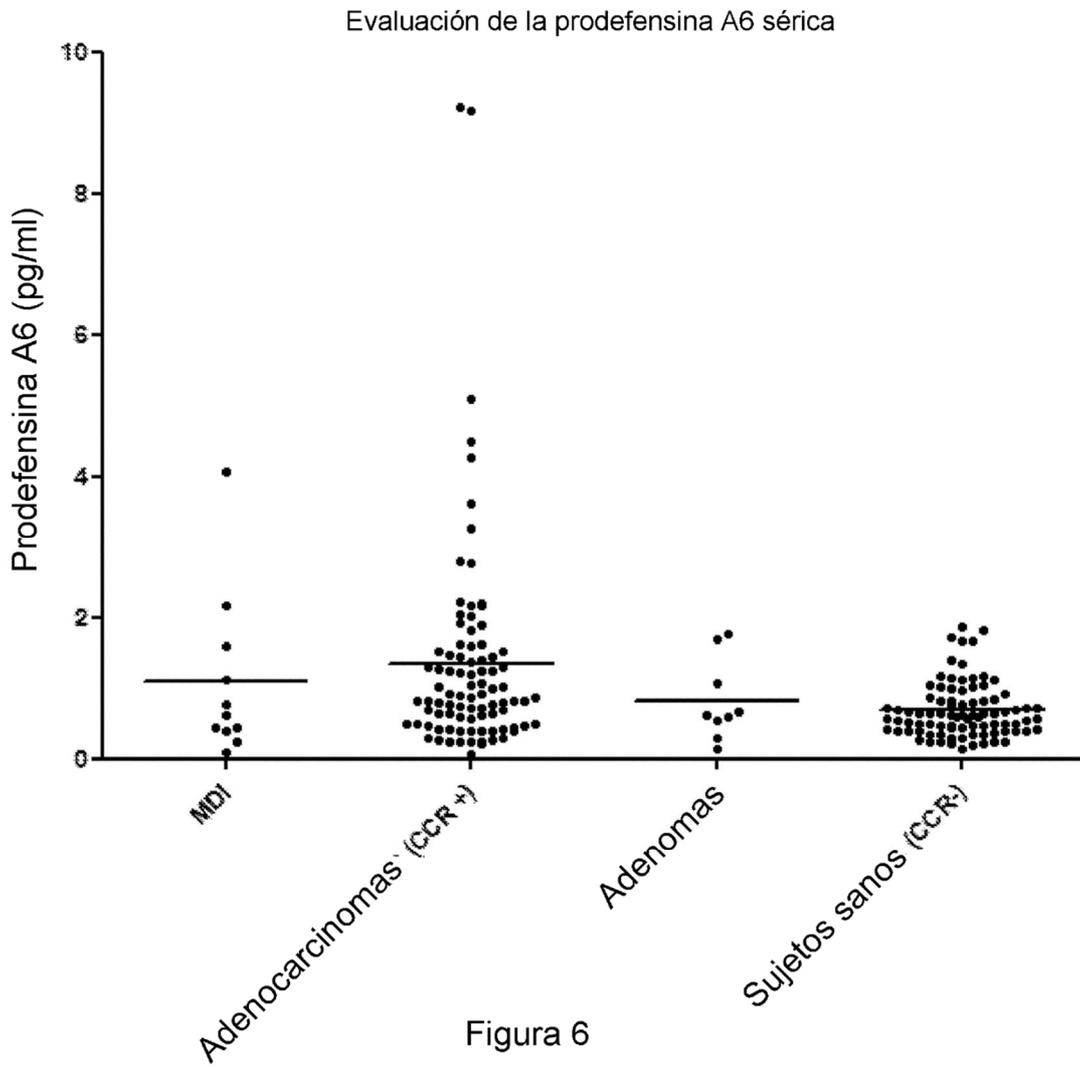
Anticuerpo y epitopo		Secuencias del mimótopo ^a	SEQ ID
1H8C9 Epitopo 2	Consenso	V/ L T/L X ₃ P/S T/W X ₆ X ₇ X ₈ R	SEQ ID 7
	Unidades inmunorreactivas	N Y V T P P W A I F R H	SEQ ID 8
		W T G V L S P T Q E Y R	SEQ ID 9
		S H L T P P W M D Y R V	SEQ ID 10
		V M A V T C S T C D S R	SEQ ID 11
	L T P P T E D L R P P D	SEQ ID 12	
11B2D2 Epitopo 3	Consenso	S/T C/- X ₃ H/R X ₅ G /V H C/N	SEQ ID 13
	Unidades inmunorreactivas	Y G N H S C T H I G H C	SEQ ID 14
		G P S Y T C L H F G H C	SEQ ID 15
		T - E R E V H N W F P F H	SEQ ID 16
11E8C9 Epitopo 4	Consenso	W/ P/W H P E X ₃ X ₄ X ₅ V/A V/I	SEQ ID 17
	Unidades inmunorreactivas	Y P H P W S M H V I R A	SEQ ID 18
		T T T P H P W A L F A V	SEQ ID 19
		T P H P W Q R W V V Y S	SEQ ID 20
		E D V L R W H P E W P G	SEQ ID 21
13E7F3 Epitopo 5	Consenso	Y/ N H X ₂ X ₃ X ₄ P/G	SEQ ID 22
	Unidades inmunorreactivas	Y H E T W P P K S A Q L	SEQ ID 23
		Y H D N W P Q P S R S W	SEQ ID 24
		Q H N H Q R H G A M G A	SEQ ID 25
		Y H D M W P M S G R M A	SEQ ID 26
		Y H D N W P P L N G A R	SEQ ID 27
		Y H D M W P A I Q L S P	SEQ ID 28
		Y H E K F P G P V V L P	SEQ ID 29

Figura 4



	1/100 ^e	1/200 ^e
6E1B4	3030	
10C2G3	6230	3920
12F3F2	6916	4412
12F8E4	2912	
12H4E1	9579	7612

Figura 5



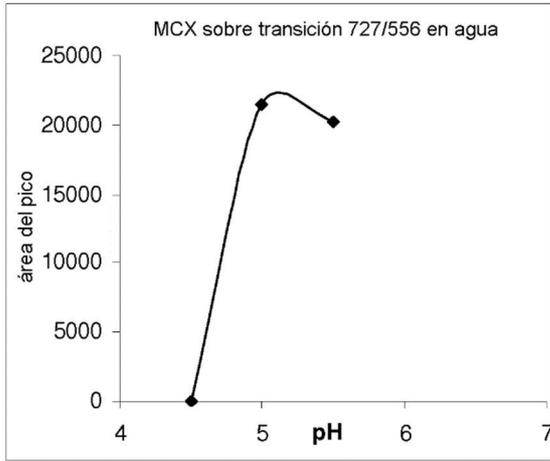


Figura 7A

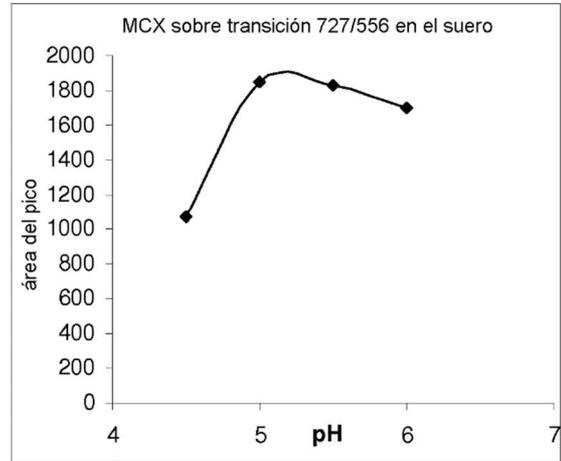


Figura 7B

Figura 7