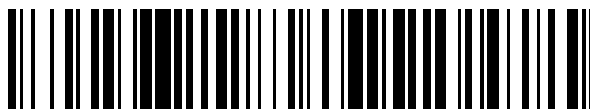


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 735 330**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2014** **PCT/FR2014/050177**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.08.2014** **WO14118475**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2014** **E 14708597 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 2951591**

54 Título: **Procedimiento de detección de una lesión colorrectal**

30 Prioridad:

01.02.2013 FR 1350908

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

18.12.2019

73 Titular/es:

BIOMÉRIEUX (50.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy L'Etoile, FR y
CHU DE DIJON (50.0%)

72 Inventor/es:

CHARRIER, JEAN-PHILIPPE;
CHOQUET-KASTYLEVSKY, GENEVIÈVE;
FORTIN, TANGUY;
HAIDOUS, HADER;
LEMOINE, JÉRÔME;
SALVADOR, ARNAUD y
FAIVRE, JEAN

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 735 330 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 detección de una lesión colorrectal.

- 5 La invención se refiere a la detección de lesiones colorrectales en una etapa no cancerosa pero susceptibles de evolucionar en cáncer de colon invasivo, y la detección de tumores *in situ* (Tis, también denominados carcinomas *in situ* o intramucoso, de fase T0), también susceptibles de degenerar en cánceres invasivos.

10 Debido a sus similitudes, los cánceres de colon y recto se agrupan generalmente bajo el término de cáncer colorrectal (CCR). Los tumores del cáncer colorrectal se desarrollan en detrimento de la mucosa del colon (o cólica), generalmente a nivel del sigmoide, que está situado en la última parte del colon, en lo que se refiere a los cánceres de colon, y por debajo de esta zona, en lo que se refiere a los cánceres de recto. La forma más común de estos cánceres se denomina adenocarcinoma.

15 La mucosa normal cólica está constituida por un epitelio glandular monoestratificado, polarizado, continuo, organizado en forma de criptas, limitado por una membrana basal, y rodeado por una lámina propia. Las criptas están dispuestas perpendicularmente a la muscularis mucosa. La lámina propia, denominada de otra manera corion, tiene un contenido celular (células mesenquimatosas e inflamatorias), estromal y vascular, variable en función de la localización en el colon. Su limitación en profundidad está constituida por la muscularis mucosa. En
20 la lámina propia, la vascularización se limita a unos capilares y a pequeñas venas endoteliales, y a unos canales linfáticos superficialmente a la muscularis mucosa.

Existen diferentes tipos de tumores benignos, es decir no cancerosos, colorrectales. El término macroscópico de pólipo designa cualquier masa sésil o pediculada que hace protrusión en el lumen cólico, sea cual sea su naturaleza
25 histológica. En el plano histológico, los adenomas son susceptibles de transformarse en cáncer. Los pólipos hiperplásicos no son unas lesiones precancerosas. Este es asimismo el caso de los pseudo-pólipos inflamatorios o de los pólipos juveniles. La carcinogénesis cólica es relativamente bien conocida. En occidente, el cáncer colorrectal se desarrolla, del 60 al 85% de los casos, a partir de un adenoma. Este puede ser pediculado, sésil o incluso estar apenas en relieve en el caso del adenoma plano. Un adenoma es un foco circunscrito de displasia
30 epitelial. Se admite en general que de 1000 adenomas, 100 alcanzarán el tamaño de 1 cm y 25 se convertirán en cánceres en un plazo de 10 a 20 años. Se ha calculado la probabilidad acumulativa de transformación cancerosa de un adenoma de diámetro superior o igual a 1 cm. Es de un 2,5% a los 5 años, un 8% a los 10 años y un 24% a los 20 años. El riesgo de transformación carcinomatosa crece con el número, el tamaño del adenoma (≥ 1 cm), la presencia de un contingente vellosa y la existencia de una displasia severa. Los adenomas, que presentan por lo
35 menos uno de estos criterios, constituyen los adenomas con riesgo elevado de transformación cólica.

La secuencia adenoma-carcinoma está ahora bien establecida:

- 40 - la prevalencia de los adenomas con riesgo elevado de transformación maligna y de los carcinomas invasivos colorrectales es elevada en las mismas poblaciones;
- el pico de incidencia de los pólipos adenomatosos precede desde hace algunos años al de los cánceres;
- 45 - el riesgo de cáncer depende del número de adenomas, lo que explica el carácter ineluctable de transformación de las poliposis familiares que se caracterizan por la presencia de más de 2000 adenomas;
- se observan frecuentemente en las piezas de colectomía unas lesiones adenomatosas en contacto con el foco carcinomatoso infiltrante;
- 50 - la incidencia del cáncer colorrectal disminuye después de la extirpación de los adenomas.

Se evalúa el grado de displasia de los adenomas en función de las anomalías de estructura, de citología y de diferenciación. Todos los adenomas son displásicos, pero se distinguen las displasias de bajo grado (antiguamente
55 ligeras o moderadas) y de alto grado (severas). Cualquier adenoma benigno está, por definición, en displasia de bajo grado, pero puede a continuación evolucionar en adenoma en displasia de alto grado, generalmente asociada a su aumento de tamaño de más de 1 cm de diámetro.

En la práctica, la secuencia adenoma-cáncer progresa desde el adenoma en displasia de bajo grado hasta el carcinoma invasivo, con las diferentes etapas siguientes:

- 60 - displasia de bajo grado
- displasia de alto grado
- tumor *in situ* (Tis, o carcinoma intra epitelial o intra mucoso)
- 65 - carcinoma invasivo a partir de la invasión de la sub-mucosa.

De manera general, el cáncer *in situ* es un cáncer en fase inicial de su desarrollo, que permanece limitado al tejido

que le ha dado nacimiento. Su definición es microscópica. En los carcinomas invasivos de colon, las células malignas han franqueado la muscularis mucosa y alcanzan por lo menos la sub-mucosa (fase T1 de la clasificación TNM) o la muscularis (fase T2). La muscularis mucosa es una fina capa de músculo liso, atravesada por complejos linfoglandulares, canales vasculares y células nerviosas.

Cuando se progresa de la fase T0 a la fase T4, existe, a escala tisular, una desorganización estructural cada vez más importante. La extensión se realiza hacia la serosa, frecuentemente con una invasión de los linfáticos. La infiltración del cáncer se puede asociar a una invasión vascular o a un recubrimiento peri-nervioso por las células tumorales. El carcinoma puede estar más o menos bien diferenciado, sea cual sea su fase.

Es la degradación de la membrana basal y después el paso de la muscularis mucosa los que permitirán la migración de las células tumorales y la difusión del cáncer. Los carcinomas colorrectales invasivos se clasifican según la clasificación internacional TNM en cánceres de fase I a IV.

Los tumores *in situ* T0 (Tis, o carcinomas intra-epiteliales o intra-mucosos) podrían considerarse como correspondientes a una fase 0, pero que no existe en la clasificación TNM, ya que no se consideran como cánceres, no son invasivos, y no son susceptibles de ir acompañados de invasión ganglionar ni metástasis. Por el contrario, son unas lesiones susceptibles de evolucionar en cáncer invasivo y por lo tanto que deben detectarse para realizar la ablación y prevenir la evolución hacia un cáncer invasivo.

En la práctica, la secreción de los marcadores tumorales es en general proporcional a la fase de los tumores. La desorganización estructural, la invasión tisular, y la presencia de émbolos vasculares favorecen la liberación de marcadores tumorales en los fluidos biológicos, así como favorecen la diseminación del cáncer a distancia por la migración de las células tumorales. Cuando la membrana basal no está franqueada, como es el caso en adenomas y en carcinomas no invasivos intra-epiteliales, o cuando el cáncer es estrictamente intra-mucoso, la liberación de marcadores en la circulación es muy improbable, lo que no es el caso cuando el tumor es invasivo y en particular cuando existen émbolos vasculares o nerviosos. De manera inesperada, la solicitante ha descubierto que la proteína Liver Fatty Acid-Binding Protein (LFABP) constituye un marcador, a distancia, de lesiones colorrectales no cancerosas y de tumores *in situ*. La detección de tales lesiones cuya evolución en carcinoma invasivo es significativamente elevada, permite su ablación, y por lo tanto reducir el número de cáncer colorrectal invasivo y la mortalidad debido a este cáncer.

Esta proteína, LFABP (N° Swiss Prot P07148, también denominada L-FABP, FABP1, FABPL, proteína Z o proteína transportadora de esteroles) pertenece a la familia de las FABP que comprende nueve isoformas. Cada isoforma se denomina según el tejido en el que se ha detectado la primera vez. Estas isoformas poseen una comunidad de funciones, unas estructuras tridimensionales que se parecen pero su homología de secuencia no es elevada. La LFABP se ha secuenciado en 1985. 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.

Para el cáncer de colon, varios equipos han identificado una disminución de la expresión de la proteína LFABP a nivel del tejido tumoral (neoplásico o pre-neoplásico) comparada con la mucosa cólica normal, utilizando unas técnicas de electroforesis en 2 dimensiones. Este resultado se confirmó también mediante técnicas de inmunohistoquímica. La expresión tisular de la LFABP disminuye en el tumor primario colorrectal en pacientes que padecen infecciones ganglionares, comparados con pacientes sanos sin padecimiento ganglionar.

Por otro lado, la expresión de ARNm de la LFABP y la proteína disminuye en sí durante la secuencia "tejido normal/adenoma/cáncer colorrectal", como se demuestra por numerosos autores [Lee *et al.*, Differential expression in normal-adenoma-carcinoma sequence suggests complex molecular carcinogenesis in colon. *Oncol Rep.* 2006 Oct;16(4):747-54], lo que significa que debería haber menos LFABP en el tejido de los adenomas que en el tejido normal. Lauriola *et al.* [Lauriola M *et al.*, Identification by a Digital Gene Expression Displayer (DGED) and test by RT-PCR analysis of new mRNA candidate markers for colorrectal cancer in peripheral blood. *Int J Oncol.* 2010 Aug;37(2):519-25] han intentado cuantificar los ARNm que circulan en la sangre para la LFABP y para otros marcadores, sin conseguir detectar la LFABP en pacientes con cáncer, ni en los sujetos controles.

En la solicitud de patente WO 2009/019368A2, la solicitante ha puesto en evidencia que la detección de la proteína LFABP, en combinación con los marcadores ACE (antígeno carcino-embriónar) y CA 19-9, permitía mejorar la detección de los pacientes que padecen cáncer colorrectal.

La solicitante ha descubierto ahora de manera sorprendente que la LFABP se libera por las lesiones cólicas no cancerosas, es decir los adenomas y las lesiones no invasivas Tis T0, y eso de manera abundante, lo que no era previsible ya que en las lesiones cólicas no invasivas la membrana basal no está franqueada, lo que hace más que improbable la liberación de marcadores en la circulación. La FABP puede entonces detectarse en las muestras biológicas distantes de los tumores.

Así, un objeto de la invención es un procedimiento de detección de una lesión colorrectal no cancerosa susceptible de evolucionar en carcinoma (o cáncer) colorrectal invasivo, en un paciente que no tiene cáncer colorrectal

invasivo, por la determinación de la presencia de la LFABP (Liver Fatty Acid-Binding Protein) y por la puesta en evidencia de una variación de la expresión de la LFABP por comparación con una población de referencia denominada de control. Según el procedimiento de la invención, se detecta tal lesión colorrectal, *in vitro*, en una muestra biológica del paciente seleccionada entre la sangre entera, el suero y el plasma.

Una aplicación de la invención es un procedimiento de detección, *in vitro*, de una lesión corporal en una población por determinación de la presencia de la LFABP en una muestra biológica de un individuo.

Un procedimiento de la invención puede además comprender una puesta en evidencia de una variación de la expresión de LFABP. Ventajosamente, se pone en evidencia un aumento de la expresión de LFABP. Esta variación se puede observar por comparación con una población de referencia denominada de control, de pacientes no sospechosos de padecer CCR, por ejemplo de pacientes que han tenido una colonoscopia que se reveló normal, o por comparación con un valor de referencia predeterminado. Preferentemente, la variación se observa con respecto a una población de referencia, para unas muestras de misma naturaleza.

La invención se refiere también a las aplicaciones de un procedimiento de la invención. Se refiere especialmente a un procedimiento de detección de una susceptibilidad a un cáncer colorrectal, en un paciente, que utiliza un procedimiento de la invención. Según una variante, esta susceptibilidad se realiza *in vitro*, por una detección en una muestra biológica.

Según la invención, se entiende por lesión colorrectal susceptible de evolucionar en carcinoma, o cáncer, colorrectal invasivo, una lesión no cancerosa, tal como un adenoma, un adenoma displásico con una displasia de bajo grado o una displasia de alto grado, un carcinoma *in situ* (intraepitelial o intramucosa), tal como se ha definido anteriormente. En efecto, como se ha explicado anteriormente, un carcinoma *in situ* no es invasivo, está en la fase 0 (T0), pero debido a su histología, su probabilidad de evolucionar en cáncer invasivo es más elevada que la de un adenoma displásico.

Por liberación por los tumores cólicos, se entiende según la invención la secreción activa o pasiva o la liberación, sea cual sea el mecanismo, del marcador tumoral por las lesiones colorrectales.

Con respecto a los otros marcadores tumorales conocidos, como el antígeno carcino-embionario o el CA 19-9, la detección de LFABP permite prevenir un cáncer colorrectal invasivo (CCR).

Con respecto a la técnica anterior, no sólo este marcador permite prevenir un CCR, en ausencia de cualquier sospecha de CCR invasivo en el paciente, sino que se puede detectar en una muestra biológica, y muy ventajosamente una muestra distante de la lesión.

Por muestra biológica, se entiende cualquier muestra susceptible de contener LFABP y/o por lo menos un trazador representativo de la LFABP. Esta muestra puede provenir de una extracción de cualquier fluido biológico, como la sangre total, el suero, el plasma, la orina, el líquido cefalo-raquídeo, las secreciones orgánicas, la saliva, los derrames, las heces, la médula ósea, y las células purificadas a partir de estas muestras líquidas, o de una extracción tisular o un tejido, o unas células aisladas. Preferentemente, la muestra está distante de la lesión potencial.

Por determinación de la presencia o de la expresión de LFABP, se comprende que se detecta la LFABP y/o por lo menos un trazador representativo de la LFABP. Este trazador es característico de la presencia de la LFABP. Según el contenido en LFABP en el paciente o en la muestra biológica y según la técnica empleada, la detección de un trazador antes citado puede ser más pertinente que la de la LFABP en sí. Así, un trazador se puede seleccionar entre los precursores de LFABP, los metabolismos de LFABP y cualquier molécula asociada a la actividad biológica de LFABP, especialmente a la actividad enzimática de LFABP, unos productos de degradación o de escisión de LFABP, o a una respuesta inmune debida a la LFABP. Así, un trazador de LFABP se selecciona preferentemente entre unos péptidos, preferentemente unas mezclas de péptidos de LFABP; unos ácidos nucleicos, preferentemente unos ARN mensajeros; una modificación del gen que codifica para la LFABP, como una metilación de su promotor, o una modificación del ácido nucleico que conduce a una modificación de la expresión de LFABP; unos anticuerpos que reconocen específicamente la LFABP y producidos en el paciente en respuesta a una presencia de LFABP, por reacción inmunológica.

Un trazador preferido es un anticuerpo seleccionado entre los que reconocen específicamente un péptido de secuencia seleccionada entre las SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3 y SEC ID nº 4.

Otros trazadores ventajosos se seleccionan entre unos péptidos que presentan las secuencias siguientes: SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6 y SEC ID nº 7, y sus mezclas.

Más particularmente, según un procedimiento de detección de una lesión colorrectal, se detecta la LFABP y/o por lo menos un trazador representativo de la LFABP y/o se mide por lo menos una actividad biológica, por ejemplo enzimática, específica de la LFABP, en dicha muestra biológica.

Los diferentes procedimientos descritos anteriormente se pueden realizar mediante cualquier técnica apropiada y bien conocida por el experto en la materia.

5 Así, se puede analizar la LFABP mediante una técnica cuantitativa de espectrometría de masas, mediante cualquier técnica inmunológica, o una combinación de las dos técnicas, o mediante cualquier técnica enzimática. Se puede utilizar, por ejemplo, la técnica LC-MRM-MS que combina la cromatografía líquida y la espectrometría de masa en modo MRM (Monitorización de Reacción Múltiple - Multiple Reaction Monitoring).

10 El procedimiento de la invención se puede mejorar detectando, además de la LFABP, por lo menos otro marcador que permite detectar una lesión colorrectal en una fase no cancerosa, llegado el caso también liberado por las lesiones cólicas fuera de los tejidos. Así, la combinación de por lo menos dos marcadores permite mejorar la especificidad y la sensibilidad del ensayo de diagnóstico de las lesiones susceptibles de evolucionar en CCR invasivo.

15 En los siguientes ejemplos se exponen diferentes variantes de realización del procedimiento, haciendo referencia a las figuras 1-5, según las cuales:

20 La figura 1 representa los resultados del análisis ELISA de LFABP sobre Vidas®, en pacientes control que presentan una colonoscopia negativa (ColonNeg) y pacientes que presentan adenomas, tal como se describe en el ejemplo 3.

25 La figura 2 representa los resultados del análisis ELISA de LFABP sobre Vidas® en pacientes control que presentan una colonoscopia negativa (ColonNeg), y pacientes que presentan tumores *in situ* (Tis, T0), tal como se describe en el ejemplo 4.

30 Las figuras 3, 4 y 5 representan los resultados del análisis ELISA sobre Vidas® de LFABP, del marcador ACE y del marcador CA19-9, respectivamente, en paciente en diferentes fases de tumores, fase Tis y CCR invasivos de fases TNM I a IV, tal como se describe en el ejemplo 4.

Ejemplo 1: Obtención de anticuerpos monoclonales dirigidos contra LFABP

1) Obtención de la proteína recombinante

35 Para realizar unas inmunizaciones y obtener unos anticuerpos monoclonales contra la proteína LFABP, se obtuvo en primer lugar la proteína recombinante LFABP.

40 El ADN complementario, los vectores de expresión, la clonación y la obtención de la proteína recombinante LFABP (expresión y purificación) se realizaron de la misma manera que la descrita en la patente WO2010/004214.

2) Inmunizaciones

2.1) Modelo animal

45 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.

2.2) Inmunógenos e inmunizaciones

50 Con el fin de aumentar las respuestas inmunes obtenidas en los ratones y poder generar unos anticuerpos monoclonales, la proteína LFAB se ha producido en forma de proteína recombinante producida según los modos de realización descritos en la patente WO2010/004214A1. La proteína se ha mezclado volumen por volumen con el adyuvante de Freund (Sigma), preparado en forma de emulsión agua en aceite y del cual se sabe que presenta un buen poder inmunógeno. Se han inmunizado tres ratones. Los ratones recibieron 3 dosis sucesivas de 10 µg de los inmunógenos a 0, 2 y 4 semanas. Todas las inyecciones se han realizado por vía sub-cutánea. La primera inyección se hace en mezcla con el adyuvante de Freund completo, las dos siguientes se hacen en mezcla con el adyuvante de Freund incompleto. Entre los D50 y D70 después de la primera inyección, las respuestas humorales se han realizado con una inyección intravenosa de 100 µg de la proteína recombinante.

2.3) Seguimiento de la aparición de la respuesta humoral

60 Con el fin de vigilar la aparición de los anticuerpos, se efectúan regularmente en los ratones unas extracciones de sangre. La presencia de los anticuerpos anti-marcador tumoral se ensaya utilizando un ELISA. La proteína de interés se utiliza en captura (1 µg/pocillo), después de la saturación se hacen reaccionar con el antígeno diferentes diluciones de los 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 AffinePure 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).

2.4) Obtención de anticuerpos monoclonales

Tres días después de la última inyección, para cada marcador tumoral, se ha sacrificado uno de los ratones inmunizado; se extrajeron la sangre y el bazo. Los esplenocitos obtenidos a partir del bazo se han cultivado con las células de mieloma Sp2/0-Ag14 para que fusionen y se immortalicen, según el protocolo descrito por Köhler y Milstein [G. Köhler y C. Milstein, 1975, Nature, 256, 495-497; G. Köhler y C. Milstein, 1976, Eur J Immunol, 6, 511-519].

Después de un periodo de incubación de 12-14 días, se ha realizado un cribado de los sobrenadantes de los hibridomas obtenidos para determinar la presencia de anticuerpos anti-marcador tumoral utilizando el ensayo ELISA descrito en el punto 3 de este ejemplo. Las colonias de hidriboma positivas se han sub-clonado dos veces según la técnica de la dilución límite, bien conocida por el experto en la materia.

3) Caracterización de los anticuerpos monoclonales

La lista de los anticuerpos monoclonales obtenidos se presenta en la tabla 1. Estos anticuerpos monoclonales se han analizado mediante la técnica de transferencia Western.

Tabla 1

Anticuerpos monoclonales
2E5G9
3A7B4
5A8H2
2C9G6
3D6G1
8B10B8
7D8A11

3.1) Complementariedad de los anticuerpos

Para poder construir el ensayo ELISA que permita analizar las muestras de pacientes, se ha ensayado en primer lugar la complementariedad de los anticuerpos. Son los mismos anticuerpos que se utilizan en la captura o en la revelación (después de la biotinilación). Cada anticuerpo de revelación biotinilado se ensaya con cada anticuerpo de captura (anticuerpos del cono VIDAS®). Las parejas se ensayan con la proteína recombinante LFABP descrita anteriormente. La tabla 2 resume los resultados obtenidos para las diferentes parejas de anticuerpos.

Tabla 2

Tabla cruzada que muestra los resultados obtenidos para cada pareja de anticuerpo con la proteína recombinante LFABP (media de la señal - media del ruido de fondo en RFV). (RFV o Valor de Fluorescencia Relativa (Relative Fluorescence Value) es la señal leída por Vidas®)

Captura	Detección						
	2E5G9	3A7B4	5A8H2	2C9G6	3D6G1	8B10B8	7D8A11
2E5G9	10,5	16,5	25	10537	10377,5	5066	0,5
3A7B4	42	198	707,5	10071	9923	10009	24,5
5A8H2	36	109	513	10404	10283,5	9930	18,5
2C9G6	10753,5	10815	10708,5	1417,5	213	10774,5	1562
3D6G1	10136,5	10707,5	10684,5	606,5	138	10462	1038,5
8B10B8	8846	9940,5	9677	10385,5	10637,5	87	363,5
7D8A11	5,5	21,5	14	8053,5	8094,5	128	4,5

Al final de estos ensayos, se conservan las 6 parejas de anticuerpos complementarios siguientes:

- 3A7B4/3D6G1
- 5A8H2/3D6G1
- 2C9G6/5A8H2
- 3D6G1/5A8H2
- 8B10B8/5A8H2
- 2C9G6/2E5G9

3.2) Caracterización de los epítomos

Los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales se han caracterizado utilizando las técnicas de Spotscan, el cribado del banco de péptidos portados por los fagos, y la construcción de proteínas quiméricas (biblioteca de fragmentos).

3.2.1) Metodología

La técnica del Spotscan, adaptada según Frank y Döring, 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, superponiéndose de 1 a 4 restos. Estos péptidos se ponen después en contacto con el anticuerpo a estudiar en un ensayo colorimétrico de tipo transferencia, y la identificación de los péptidos inmunorreactivos permite deducir la secuencia mínima del epítomo del anticuerpo y localizarlo precisamente sobre el antígeno.

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 NH_2 libre al 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-fluorometiloxycarbonil), y sus cadenas laterales, susceptibles de reaccionar durante la síntesis, también está protegida por unos grupos tritil, t-butil o t-butiléter. Las soluciones madre de aminoácidos se preparan a una concentración de 0,33 M en NMP (N-metil-pirrolidona) que contiene 0,5 M de HOBt (hidroxibenzotriazol). El depósito de los aminoácidos se efectúa con la ayuda del robot ASP 222 (Abimed, Langenfeld, Alemania), controlado por medio del programa AutoSpot XL. La utilización de este robot permite hacer simultáneamente hasta 4 membranas de 96 puntos, es decir 284 péptidos.

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 de solución madre de aminoácido) sobre las membranas. Este depósito se repite una segunda vez, después las membranas se aclaran en DMF (N,N-dimetilformamida). Los grupos NH_2 que no han reaccionado se acetilan después por de 4 a 6 incubaciones de 10 minutos en una solución de anhídrido acético al 10% en DMF, con el 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 al 20% en DMF. Después de 4 lavados en DMF, los puntos se colorean con la ayuda de una solución de azul de bromofenol al 1% en DMF, después la membrana se aclara 3 veces en metanol y se seca al aire libre antes del ciclo de acoplamiento siguiente.

Este protocolo se repite para la adición de cada nuevo aminoácido. Después del acoplamiento del último aminoácido, los péptidos se acetilan con el fin de permitir el bloqueo de todos los grupos NH_2 libres, impidiendo así la adición de otro aminoácido. Después, las cadenas laterales de todos los péptidos se desprotegen por la incubación de las membranas en un baño ácido trifluoroacético/diclorometano/trisobutilsilano (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 se conservan 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 incubarse durante la 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 al 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en solución de saturación. Las membranas se lavan después 3 veces con TBS-T, después se incuban en el conjugado anti-ratón acoplado a la fosfatasa alcalina (Jackson Immunoresearch), diluido al 1/2000 en solución de saturación. Después de 2 lavados de 10 minutos en TBS-T, y 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-indoil, fosfato 600 μM , bromuro de tiazolil azul tetrazolio 720 μM , y MgCl_2 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 su regeneración.

La regeneración permite eliminar los anticuerpos y conjugarlos fijados sobre los péptidos, lo que permite así realizar un nuevo ensayo de inmunorreactividad frente a otro anticuerpo. Las membranas sufren una serie de lavados de 10 minutos cada uno: 1 lavado en agua destilada, 6 lavados en DMF, 3 lavados en tampón de regeneración A (urea 8 M, SDS (sodio dodecil sulfato) 35 mM, β -mercaptoetanol al 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. No. E#8110S) de New England Biolabs,

siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit, versión 2.7 del protocolo que tiene la fecha de noviembre de 2007.

Una tercera tecnología de localización de epítipo se ha utilizado: la construcción de una biblioteca de fragmentos de proteína LFABP recombinante, contra la cual se ha ensayado la afinidad de los anticuerpos de interés.

3.2.2) Resultados

La tabla 3 resume los epítipos reconocidos por 5 anticuerpos LFABP cuyos epítipos se han analizado mediante las 3 técnicas mencionadas.

Tabla 3

Anticuerpo	Nº epítipo	Secuencia del epítipo ^a	Tipo de epítipo	Técnica
2C9G6	1	N-term 1-56 (SEC ID nº 1)	Conformacional	biblioteca de fragmentos
3D6G1	1	N-term 1-56 (SEC ID nº 1)	Conformacional	biblioteca de fragmentos
8B10B8	1	N-term 1-56 (SEC ID nº 1)	Conformacional	biblioteca de fragmentos
5A8H2	2	N-term 1-65 (SEC ID nº 2) (AA 57 a 65 necesarios)	Secuencia necesaria para la unión	Biblioteca de fragmentos
	3	HLSEYHPWHPR (SEC ID nº 3)	Mimotopo Epítipo conformacional	Cribado de banco de fago
7D8A11	4	102-127 SEC ID nº 4	Epítipo lineal	Spotscan y biblioteca de fragmentos

^a Secuencia en aminoácido de la región de fijación de la LFABP al anticuerpo ensayado. Los números entre paréntesis corresponden a la posición del epítipo sobre la secuencia en aminoácidos de la LFABP, empezando la enumeración en la metionina inicial.

Los epítipos reconocidos por los anticuerpos 3A7B4 y 5A8H2 no han podido determinarse por 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 1 mimotopo (secuencia lineal que imita un epítipo) que reacciona con el anticuerpo 5A8H2. La secuencia de consenso de este mimotopo se ha alineado con el fin de determinar una secuencia de consenso (SEC ID nº 3) que se indica en la tabla 3, que representa la secuencia mínima reconocida por el anticuerpo. No ha sido posible encontrar esta secuencia de consenso en la estructura primaria (o secuencia peptídica) de la LFABP. Así, esta secuencia de consenso corresponde a unos restos situados en diferentes sitios en la estructura primaria de la proteína, pero que comparte una similitud en su estructura tridimensional con el fin de formar un epítipo conformacional. Por otro lado, la utilización de la bibliografía de fragmentos de proteína recombinante ha permitido localizar el epítipo para los anticuerpos 2C9G6, 3D6G1 y 8B10B8 en los 56 primeros aminoácidos de la proteína (SEC ID nº 1). El anticuerpo 5A8H2 necesita, por su parte, 9 aminoácidos suplementarios (AA 1 a 65) para fijarse al sitio de unión opuesto al sitio de unión del anticuerpo 7D8A11 (SEC ID nº 2). El anticuerpo 7D8A11 es el único que tiene un epítipo lineal que se ha podido caracterizar por spotscan (SEC ID nº 4).

Los anticuerpos mencionados en la tabla 3 anterior constituyen una herramienta de dosificación de la LFABP más sensible con respecto a otros anticuerpos conocidos de la LFABP.

Ejemplo 2: desarrollo de ensayos ELISA sándwich contra la proteína LFABP sobre el autómata Vidas®

La proteína LFABP se ha analizado con la ayuda de anticuerpos descritos en el ejemplo 1 y de un inmuno-ensayo de tipo sándwich, utilizando por ejemplo el autómata de ELISA Vidas® (bioMérieux). Este tipo de ensayo se puede realizar también en microplaca, de manera automatizada o manual. En primer lugar, los diferentes anticuerpos disponibles se han ensayado para seleccionar una pareja de anticuerpos funcional, es decir, por lo menos un anticuerpo capaz de capturar la proteína biomarcador (anticuerpo de captura) y por lo menos un anticuerpo capaz de revelar la molécula biomarcador (anticuerpo de revelación).

Para este fin, se ha construido el ensayo ELISA utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. Nº 30315).

Los reactivos se han utilizado tal como se describen en el prospecto correspondiente (ref. 11728D-FR-2005/05), con las modificaciones siguientes:

- los conos se sensibilizaron con uno de los 5 Ac de captura seleccionados utilizados a una concentración de 10 µg/ml.

- el contenido del segundo pocillo del cartucho HBS Ag Ultra se sustituyó por 300 µl de anticuerpo de revelación, acoplado a la biotina, diluidos por 300 µl de anticuerpos de revelación, acoplado a la biotina, diluidos a 1 µg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBS Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).
- la muestra de suero (50 µl) se ha diluido directamente en el segundo pocillo el cartucho HBS Ag Ultra.
- la reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómatas Vidas® y del protocolo HBS cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpo de captura y de revelación se había llevado a 100 ciclos.
- 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 un intervalo de concentración de la proteína biomarcador recombinante. La curva patrón se ha trazado detallando en las abscisas la concentración de la proteína biomarcador y en las ordenadas la señal leída por Vidas® (RFV o Valor de Fluorescencia Relativa - Relative Fluorescence Value). La concentración de la proteína biomarcador presente en el fluido corporal a analizar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado detallando la concentración que corresponde a la señal RFV leída por Vidas®.

Equivalencia de los diferentes ensayos ELISA desarrollados

Se ha querido evaluar la correlación entre los diferentes inmunoensayos sándwich desarrollados. Los ensayos Vidas® se compararon entre sí y también se compararon al ensayo comercial de la compañía Hycult Biotechnology para evaluar la proteína LFABP humana (Cat. Nº HK404), tal como se describe en la solicitud de patente WO2009019368A2.

Estos ensayos de equivalencia se realizaron gracias a unas muestras séricas de pacientes que padecen cáncer colorrectal (CCR) o de sujeto sano de control donantes de sangre (EFS), obtenidos respectivamente en unos servicios hospitalarios en el ámbito de 2 protocolos de la ley Huriet, y en un establecimiento francés de banco de sangre (sujetos sanos).

Tabla 4

Análisis de LFABP en ng/ml obtenidos con el ensayo comercial Hycult biotechnology y con los diferentes ensayos Vidas® desarrollados

Paciente	Hycult	2C9G6/5 A8H2	5A8H2/3D 6G1	2C9G6/2E5 G9	3A7B4/3D6 G1	3D6G1/5A8 H2	8B10B8/5A8 H2
CBSE004	7,78		2,87	1,74	2,57		
CBSE011	7,73		1,92	1,33	1,72		
CBSE012	0,11		2,31	1,83	2,07		
CBSE018			1,35	0,75	1,19		
CBSE019	6,65		4,48	3,41	3,98		
CBSE023	8,21		4,60	4,92	4,07		
CBSE025	16,38		7,88	7,45	6,87		
CLSP043	2,89	1,94	2,49	1,70	2,47	2,29	0,22
CLSP047	1,94		1,39	0,00	1,22		
CLSP078	2,56		13,01	8,27	11,33		
CLSP090	3,77		1,18	0,98	1,04		
CLSP164	6,54	4,18	4,77	4,60	4,49	4,14	1,54
CLSP165	7,86	1,27	1,68	1,80	2,32	1,82	1,64
CLSP167	8,17	0,00	0,43	0,00	2,01	0,00	0,52
CLSP170	6,02	4,36	4,26	4,61	4,16	3,60	2,11
CLSP174	23,64	5,57	6,73	6,26	7,80	4,67	7,39
CLSP182	7,25	4,47	4,61	5,50	4,46	4,21	4,06
CLSP183	16,90	11,07	10,12	9,79	9,32	7,08	15,94
CLSP185	19,63	5,35	7,01	6,36	8,41	4,44	5,32
CLSP186	7,06	4,59	4,42	5,35	4,44	3,39	2,72
CLSP189	5,34	0,00	0,25	0,00	1,16	0,00	0,69
CLSP194	13,09	5,38	5,65	6,71	5,40	5,17	5,52
CLSP198	8,16	2,20	3,10	3,14	4,24	2,88	1,94
CLSP207	6,02	4,60	4,71	5,58	4,67	4,01	1,91

ES 2 735 330 T3

Paciente	Hycult	2C9G6/5 A8H2	5A8H2/3D 6G1	2C9G6/2E5 G9	3A7B4/3D6 G1	3D6G1/5A8 H2	8B10B8/5A8 H2
GHBD020	2,24		5,46	3,08	4,81		
GHBD021	1,84		1,58		1,41		
GHBD029	2,75		3,42	2,74	3,05		
N000533	3,46	0,59	1,18	0,96	1,51	1,21	1,85
N002301	7,78		5,54	5,19	4,88		
N005702	2,74		1,04	0,79	0,91		
N009944	3,49	1,41	2,06	2,66	1,90	1,98	1,69
N011147	2,86	0,92	1,52	1,82	1,41	1,50	1,16
N011968	2,06	1,26	1,56	1,64	1,62	1,65	0,97
N011984	5,29	0,87	1,32	1,21	1,80	1,45	1,19
N014106	2,66	0,45	0,91	0,66	1,25	0,89	0,74
N015402	4,41		1,34	0,90	1,18		
N017234	4,04	1,90	2,49	3,33	2,41	2,61	2,48
N017269	2,89	1,46	2,13	2,38	2,00	1,97	2,01
N018544	2,42	0,99	1,47	2,17	1,49	1,67	1,11
N018552	2,28	0,00	0,15	0,00	0,52	0,00	0,47
N020501	11,37		2,61	2,90	2,34		
N045730	2,29	0,19	0,69	0,63	0,89	0,61	0,74
N054582	1,84		1,45	1,65	1,28		
N057046	5,59		0,82	0,00	0,70		
N057054	21,05		2,69	3,25	2,40		
N074598	2,53		1,53	1,13	1,36		
N286613	4,11	2,38	2,54	3,30	2,56	3,00	3,83
N286656	7,95	1,77	2,26	2,73	3,24	2,60	4,12
N286680	4,58	2,75	2,86	3,30	2,85	3,39	1,45
N318050	3,93	1,56	2,16		2,18		2,05
N318341	4,46	1,72	2,38	2,86	2,12	2,40	1,86
N318384	1,63	0,60	1,19	1,29	1,12	1,18	0,71
N318421	3,86	0,69	1,15	1,45	1,47	1,14	1,56
N329630	6,90	1,24	1,69	2,34	2,28	1,82	4,04
N376488	4,73	0,64	1,20	1,30	1,57	1,14	1,57
N376912	2,55	0,27	0,84	0,94	1,15	0,80	1,07
N40776-	3,46	0,62	1,00	0,98	1,35	1,15	1,21
N418599	2,60	1,11	1,46	1,94	1,49	1,63	2,01
N46043-	4,18	0,67	1,34	1,18	1,72	1,03	0,90
N461993	2,92	0,00	0,16	0,01	0,69	0,00	0,73
N462187	3,96	0,79	1,32	1,18	1,79	1,43	1,23
N483535	6,42	0,00	0,30	0,00	1,28	0,00	0,83
N491678	7,73		3,86	3,38	3,43		
N494801	4,38		2,96	2,64	2,65		
N511498	2,24	0,46	0,81	0,71	1,03	0,78	0,51
N520547	7,74		3,03	3,74	2,70		
N527039	2,36	0,31	0,79	0,41	1,03	0,70	0,60
N530485	6,80	0,00	0,32	0,00	1,40	0,00	0,66
N593116	2,38	0,99	1,41	1,95	1,42	1,49	1,46
N734641	3,04		8,30	7,31	7,23		
N748022	2,14	0	0,17	0,00	0,46	0,00	0,47
N828353	8,21		4,52	4,11	4,01		
N831245	7,74		2,77	2,32	2,48		
N862300	3,59	1,79	4,75		3,53		2,33

Las correlaciones de estos diferentes ensayos con respecto al ensayo 2C9G6/5A8H2 se detallan en la tabla 5 siguiente.

Tabla 5

Datos de correlación entre los diferentes ensayos ELISA

Parámetro	5A8H2/3D6G1	2C9G6/2E5G9	3A7B4/3D6G1	3D6G1/5A8H2	8B10B8/5A8H2	Hycult
No. de pares XY	47	45	47	45	47	47

Parámetro	5A8H2/3D6G1	2C9G6/2E5G9	3A7B4/3D6G1	3D6G1/5A8H2	8B10B8/5A8H2	Hycult
Spearman r	0,9864	0,9783	0,9244	0,9909	0,8091	0,5298
Intervalo de confianza al 95%	0.9752 a 0.9926	0.9598 a 0.9883	0.8653 a 0.9581	0.9831 a 0.9951	0.6752 a 0.8914	0.2781 a 0.7135
Valor de P (bilateral)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0,0001
Es significativa la correlación? (alfa=0.05)	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Los diferentes ensayos desarrollados en Vidas® tienen una buena correlación entre sí y pueden utilizarse todos para analizar la proteína LFABP.

5 Ejemplo 3: Detección de pacientes con adenomas mediante la análisis ELISA de la LFABP sobre el autómata Vidas®

1) Pacientes y extracciones

10 La recogida de muestras de sangre se ha realizado gracias a una red de 8 centros clínicos repartidos por toda Francia, en el ámbito de 2 protocolos de la ley Huriet para los pacientes que padecen cáncer colorrectal. Para los pacientes de control, colonoscopias negativas, y portadores de adenomas colorrectales, se ha implementado un estudio multicentro que implica una treintena de gastroenterólogos para recoger la sangre de pacientes Hémocult™ positivos, antes de la realización de la colonoscopia y de toda la preparación cólica.

15 Todas las extracciones se realizaron según la legislación en vigor y las Buenas Prácticas Clínicas, según un proceso de almacenamiento y de seguimiento conformes a las buenas prácticas de laboratorio, estando los pacientes y los controles colonoscópicos negativos extraídos exactamente en las mismas condiciones.

20 Para la obtención de suero, la extracción sanguínea se lleva a cabo en un tubo seco. Después de la coagulación, el tubo se centrifuga durante 10 minutos a 1000 g, se extrae el suero, se divide en alícuotas y se conserva a -80°C. Las muestras se documentan perfectamente para la historia clínica de los pacientes.

25 En total, se ensayaron 147 pacientes: 70 pacientes control con una colonoscopia totalmente normal (Coloneg), y 77 pacientes que padecen adenomas colorrectales (displasia de alto grado o de bajo grado).

De los 77 adenomas:

30 24 son unos adenomas de bajo riesgo (displasia de bajo grado y tamaño <1 cm, y ausencia de componente vellosa)

37 son unos adenomas de alto riesgo sin displasia severa (≥ 1 cm o presencia de un componente vellosa)

35 16 son unos adenomas de alto riesgo de alto grado (displasia severa, sea cual sea el tamaño, con o sin componente vellosa).

2) Análisis Vidas® LFABP, ACE y CA19-9

40 La proteína LFABP se ha analizado con la ayuda del ensayo LFABP Vidas® 2C9G6/5A8H2 descrito en el ejemplo 2. Este tipo de ensayo se puede realizar también en microplaca, de manera automatizada o manual.

Para este ejemplo, el ensayo ELISA se ha construido utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315).

45 Los reactivos se utilizaron tal como se describen en el prospecto correspondiente (ref. 11728 D-FR-2005/05), con las modificaciones siguientes:

- los conos se sensibilizaron con los Ac de captura 2C9G6 utilizado a una concentración de 10 µg/ml.

50 - el contenido del segundo pocillo del cartucho HBS Ag Ultra se ha sustituido por 300 µl de anticuerpos de revelación 5A8H2, acoplado con biotina, diluidos a 1 µg/ml de tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).

- La muestra de suero (50 µl) se ha diluido directamente en el segundo pocillo del cartucho HBS Ag Ultra.
- La reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómatas Vidas® y del protocolo HBS cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación se había llevado a 100 ciclos.
- 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).

Los marcadores tumorales ACE y CA19-9 se analizaron con la ayuda de los kits de análisis de la solicitante, respectivamente Vidas® CEAs, Vidas® CA19-9, siguiendo el protocolo de realización específico de cada kit.

Se ha establecido una curva patrón analizando un intervalo de concentración de la proteína biomarcador recombinante. La curva patrón se ha trazado detallando en las abscisas la concentración de la proteína biomarcador y en las ordenadas la señal leída por Vidas® (RFV o Valor de Fluorescencia Relativa - Relative Fluorescence Value). La concentración de la proteína biomarcador presente en el fluido corporal a analizar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado detallando la concentración que corresponde a la señal RFV leída por Vidas®.

Tabla 6

Análisis séricos de laLFABP,de ACE y de CA-19-9 en los pacientes con adenomas y en los controles de colonoscopias negativas (ColoNeg)

Patología	Nº Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
ColoNeg	HGED005	68	Hombre	NA	2,08	4,38	3,70
ColoNeg	PROMIS 21-01-005	68	Hombre	NA	0,50	16,94	5,94
ColoNeg	PROMIS 21-01-006	62	Hombre	NA	0,00	2,10	2,65
ColoNeg	PROMIS 21-01-009	51	Mujer	NA	0,68	10,36	9,52
ColoNeg	PROMIS 21-01-011	60	Mujer	NA	0,00	4,31	0,45
ColoNeg	PROMIS 21-01-012	55	Mujer	NA	2,10	9,02	1,94
ColoNeg	PROMIS 21-02-001	73	Mujer	NA	1,15	5,02	11,06
ColoNeg	PROMIS 21-02-003	55	Mujer	NA	0,81	19,93	3,38
ColoNeg	PROMIS 21-02-004	57	Hombre	NA	0,00	2,48	7,23
ColoNeg	PROMIS 21-02-006	51	Hombre	NA	0,00	3,67	4,47
ColoNeg	PROMIS 21-02-008	55	Hombre	NA	1,10	7,61	10,22
ColoNeg	PROMIS 21-02-011	55	Mujer	NA	1,56	13,65	2,01
ColoNeg	PROMIS 21-02-014	58	Hombre	NA	0,81	2,02	6,68
ColoNeg	PROMIS 21-02-016	62	Hombre	NA	3,36	3,43	0,43
ColoNeg	PROMIS 21-03-004	61	Hombre	NA	3,46	2,33	8,62
ColoNeg	PROMIS 21-03-013	52	Mujer	NA	0,00	1,02	2,98
ColoNeg	PROMIS 21-03-015	74	Mujer	NA	0,90	2,48	7,26
ColoNeg	PROMIS 21-04-002	67	Hombre	NA	0,83	9,73	5,97
ColoNeg	PROMIS 21-04-006	72	Hombre	NA	0,68	2,33	2,25
ColoNeg	PROMIS 21-04-007	68	Mujer	NA	0,79	3,04	7,26
ColoNeg	PROMIS 21-04-008	62	Mujer	NA	1,06	1,02	5,97
ColoNeg	PROMIS 21-04-009	58	Hombre	NA	1,10	11,92	3,67
ColoNeg	PROMIS 21-04-013	63	Mujer	NA	3,09	11,92	5,03
ColoNeg	PROMIS 21-07-004	66	Hombre	NA	1,33	3,83	9,55
ColoNeg	PROMIS 21-12-007	53	Mujer	NA	0,00	2,86	6,03
ColoNeg	PROMIS 21-12-011	52	Hombre	NA	4,24	8,63	1,79
ColoNeg	PROMIS 21-22-001	61	Mujer	NA	2,87	17,25	2,08
ColoNeg	PROMIS 21-22-006	65	Mujer	NA	1,06	2,33	6,60
ColoNeg	PROMIS 21-22-008	57	Mujer	NA	0,00	2,79	5,20
ColoNeg	PROMIS 37-03-004	53	Mujer	NA	0,74	2,17	2,18
ColoNeg	PROMIS 37-04-001	62	Hombre	NA	5,16	4,54	7,09
ColoNeg	PROMIS 37-04-005	69	Mujer	NA	0,92	3,51	6,51
ColoNeg	PROMIS 37-05-008	55	Hombre	NA	0,00	2,86	6,60
ColoNeg	PROMIS 37-06-001	65	Mujer	NA	1,49	5,65	5,99
ColoNeg	PROMIS 37-09-002	50	Mujer	NA	0,77	26,00	1,74
ColoNeg	PROMIS 37-11-001	56	Hombre	NA	0,00	1,63	2,72
ColoNeg	PROMIS 37-11-002	59	Hombre	NA	0,00	1,86	2,40
ColoNeg	PROMIS 37-11-011	71	Hombre	NA	1,28	0,48	4,69
ColoNeg	PROMIS 37-11-016	50	Mujer	NA	0,00	5,02	1,87

ES 2 735 330 T3

Patología	Nº Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
ColoNeg	PROMIS 37-12-002	63	Hombre	NA	0,79	2,63	3,01
ColoNeg	PROMIS 37-13-003	53	Mujer	NA	0,92	7,38	4,28
ColoNeg	PROMIS 37-13-006	53	Hombre	NA	0,88	1,48	8,85
ColoNeg	PROMIS 37-13-008	61	Hombre	NA	0,00	0,94	4,22
ColoNeg	PROMIS 37-14-009	63	Hombre	NA	0,97	0,64	8,69
ColoNeg	PROMIS 37-14-018	60	Hombre	NA	0,57	2,86	6,11
ColoNeg	PROMIS 37-14-021	61	Mujer	NA	0,92	3,59	0,62
ColoNeg	PROMIS 37-15-002	68	Mujer	NA	0,68	3,75	3,15
ColoNeg	PROMIS 37-15-006	67	Mujer	NA	1,08	2,10	6,30
ColoNeg	PROMIS 37-16-001	57	Hombre	NA	0,74	3,75	3,99
ColoNeg	PROMIS 37-17-001	52	Hombre	NA	1,87	4,78	4,63
ColoNeg	PROMIS 37-17-003	55	Hombre	NA	5,81	1,71	2,65
ColoNeg	PROMIS 37-17-004	58	Mujer	NA	1,01	3,04	5,68
ColoNeg	PROMIS 37-18-001	53	Hombre	NA	0,55	3,43	4,31
ColoNeg	PROMIS 37-18-003	50	Mujer	NA	0,63	2,33	7,76
ColoNeg	PROMIS 37-18-004	57	Hombre	NA	0,00	2,10	3,83
ColoNeg	PROMIS 37-18-005	55	Mujer	NA	0,85	3,28	3,49
ColoNeg	PROMIS 37-18-024		Hombre	NA	1,10	4,38	2,55
ColoNeg	PROMIS 37-19-006	50	Hombre	NA	0,00	1,63	9,08
ColoNeg	PROMIS 37-19-007	51	Mujer	NA	0,66	0,56	3,33
ColoNeg	PROMIS 37-20-004	53	Mujer	NA	1,17	1,02	2,84
ColoNeg	PROMIS 71-02-003	60	Mujer	NA	0,55	1,33	1,62
ColoNeg	PROMIS 71-04-003	75	Mujer	NA	0,57	5,57	6,93
ColoNeg	PROMIS 71-09-007	52	Hombre	NA	0,88	4,86	4,81
ColoNeg	PROMIS 71-10-001	56	Mujer	NA	1,15	15,14	2,15
ColoNeg	PROMIS 71-10-007	71	Mujer	NA	2,80	3,20	0,82
ColoNeg	PROMIS 71-11-001	63	Hombre	NA	1,45	3,00	3,44
ColoNeg	PROMIS 71-11-003	59	Mujer	NA	1,26	40,93	3,91
ColoNeg	PROMIS 71-11-006	59	Hombre	NA	0,66	2,33	4,22
ColoNeg	PROMIS 71-11-008	54	Hombre	NA	0,88	8,32	2,59
ColoNeg	PROMIS 71-11-009	60	Mujer	NA	0,50	7,30	5,82
Adenoma	GHAB007	67	Hombre	NA	2,65	6,89	4,12
Adenoma	GHAB028	77	Hombre	NA	1,79	3,53	13,02
Adenoma	GHAB046	54	Hombre	NA	3,07	5,97	5,09
Adenoma	GHAB054	62	Hombre	NA	1,22	3,00	2,09
Adenoma	GHBD079	76	Hombre	NA	5,87	8,08	3,49
Adenoma	HGED009	68	Mujer	NA	1,45	4,55	4,12
Adenoma	HGED013	59	Hombre	NA	1,18	3,00	4,65
Adenoma	HGED019	52	Hombre	NA	1,67	3,00	1,76
Adenoma	HGED038	58	Hombre	NA	2,18	3,00	11,29
Adenoma	HGED046	57	Hombre	NA	2,09	3,00	20,40
Adenoma	PROMIS 21-01-008			NA	0,55	3,00	2,14
Adenoma	PROMIS 21-02-012	50	Hombre	NA	1,20	3,00	13,31
Adenoma	PROMIS 21-08-004	69	Mujer	NA	1,26	3,00	2,65
Adenoma	PROMIS 21-22-016	68	Mujer	NA	0,76	3,00	3,63
Adenoma	PROMIS 21-22-019	68	Mujer	NA	0,50	3,28	3,88
Adenoma	PROMIS 37-03-008	53	Hombre	NA	1,91	3,00	12,35
Adenoma	PROMIS 37-03-011	62	Hombre	NA	0,50	3,00	4,92
Adenoma	PROMIS 37-05-012	71	Mujer	NA	0,78	3,00	3,57
Adenoma	PROMIS 37-08-001	64	Mujer	NA	1,24	3,00	9,82
Adenoma	PROMIS 37-09-001	56	Mujer	NA	7,08	3,00	3,63
Adenoma	PROMIS 37-11-003	70	Hombre	NA	2,14	3,00	6,83
Adenoma	PROMIS 37-11-008	51	Hombre	NA	1,06	3,53	3,14
Adenoma	PROMIS 37-11-015	69	Hombre	NA	2,67	3,00	10,56
Adenoma	PROMIS 37-11-018	57	Hombre	NA	1,61	29,05	7,95
Adenoma	PROMIS 37-13-002	59	Hombre	NA	1,71	3,00	4,65
Adenoma	PROMIS 37-14-002	53	Hombre	NA	1,57	3,00	3,73
Adenoma	PROMIS 37-14-003	63	Mujer	NA	1,45	3,00	8,05
Adenoma	PROMIS 37-14-008	52	Mujer	NA	0,55	3,00	0,89
Adenoma	PROMIS 37-15-004	58	Hombre	NA	3,18	9,30	1,59
Adenoma	PROMIS 37-15-005	72	Hombre	NA	3,07	3,00	0,68

Patología	N° Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
Adenoma	PROMIS 37-20-003	64	Hombre	NA	2,91	3,00	13,31
Adenoma	PROMIS 37-23-001	52	Hombre	NA	3,84	9,92	4,72
Adenoma	PROMIS 37-23-004	71	Mujer	NA	1,08	10,20	4,31
Adenoma	PROMIS 71-08-008	51	Hombre	NA	1,24	3,00	7,08
Adenoma	PROMIS 71-10-002	62	Hombre	NA	2,37	18,29	1,09
Adenoma	PROMIS 71-10-004	63	Hombre	NA	2,01	3,77	3,04
Adenoma	PROMIS 71-11-002	75	Hombre	NA	2,47	6,02	26,32
Adenoma	CLSP350	76	Hombre	NA	7,03	3,00	3,05
Adenoma	CLSP398	43	Mujer	NA	1,32	3,00	4,82
Adenoma	CLSP427	83	Hombre	NA	3,11	7,99	11,24
Adenoma	CLSP457	66	Hombre	NA	10,92	3,00	11,36
Adenoma	CLSP681	61	Mujer	NA	0,76	8,27	26,13
Adenoma	CLSP769	50	Mujer	NA	0,50	3,00	44,76
Adenoma	GHBD014	71	Hombre	NA	1,95	4,13	24,03
Adenoma	GHBD053	66	Mujer	NA	0,85	3,00	4,56
Adenoma	PROMIS 21-02-007			NA	0,61	3,00	8,56
Adenoma	PROMIS 21-02-009			NA	3,22	7,93	7,09
Adenoma	PROMIS 21-02-017	64	Hombre	NA	1,49	3,00	1,83
Adenoma	PROMIS 21-03-001	58	Hombre	NA	2,09	3,00	7,32
Adenoma	PROMIS 21-03-017	69	Hombre	NA	1,57	5,44	4,52
Adenoma	PROMIS 21-08-001	52	Hombre	NA	3,26	11,66	3,71
Adenoma	PROMIS 37-03-003	57	Hombre	NA	0,97	3,00	5,98
Adenoma	PROMIS 37-03-006	60	Mujer	NA	0,50	14,27	0,50
Adenoma	PROMIS 37-06-003	60	Mujer	NA	0,64	3,00	1,82
Adenoma	PROMIS 37-09-004	74	Hombre	NA	2,18	5,61	10,20
Adenoma	PROMIS 37-11-005	54	Mujer	NA	0,53	3,00	3,20
Adenoma	PROMIS 37-13-007	65	Mujer	NA	0,93	3,00	3,53
Adenoma	PROMIS 37-14-015	74	Mujer	NA	1,45	8,39	1,88
Adenoma	PROMIS 37-19-001	71	Hombre	NA	1,77	5,44	4,53
Adenoma	PROMIS 37-23-003	67	Mujer	NA	0,82	5,67	5,18
Adenoma	PROMIS 71-10-012	50	Hombre	NA	0,66	3,00	12,36
Adenoma	CLSP022	70	Hombre	NA	200,00	3,00	0,71
Adenoma	CLSP036	70	Hombre	NA	0,91	3,00	7,73
Adenoma	CLSP270	75	Hombre	NA	1,20	3,00	10,36
Adenoma	CLSP287	56	Mujer	NA	1,20	3,16	2,83
Adenoma	CLSP337	63	Mujer	NA	0,61	1,71	14,47
Adenoma	CLSP358	73	Hombre	NA	2,09	22,23	5,48
Adenoma	CLSP359	60	Hombre	NA	1,65	17,96	6,58
Adenoma	CLSP362	81	Hombre	NA	1,28	3,00	11,19
Adenoma	CLSP378	75	Hombre	NA	0,63	2,10	3,93
Adenoma	CLSP719	62	Hombre	NA	1,55	3,00	19,42
Adenoma	CNSE018	75	Mujer	NA	0,50	3,00	7,42
Adenoma	GESE003	59	Mujer	NA	0,50	3,00	2,46
Adenoma	GHAB004	84	Hombre	NA	4,17	4,79	5,80
Adenoma	GHBD002	87	Hombre	NA	0,61	3,00	4,28
Adenoma	PROMIS 21-22-004	71	Mujer	NA	2,73	21,25	3,62
Adenoma	PROMIS 71-10-006	57	Hombre	NA	4,74	18,84	9,59
Límite (concentración máx. de los ColoNeg)					5,81	40,93	11,06
Adenomas superiores al límite					4	0	16

Los resultados de análisis de la LFABP se representan en la figura 1.

5 Con el límite de LFABP de 11,06 ng/ml (índice más elevado para los controles ColoNeg, es decir una especificidad del 100%), se detectan 16 pacientes con adenoma de 77, es decir un 20.5% de sensibilidad para los adenomas, alto riesgo y bajo riesgo combinados. El alto riesgo se define por el tamaño ≥ 1 cm, la presencia de una displasia severa o la presencia de un componente vellosos.

10 Para conocer el valor predictivo que tendría un ensayo de detección de los adenomas, se necesita la prevalencia de la enfermedad.

Según los estudios (autopsia, colonoscopias sistemáticas, análisis post-sangre en las heces), la prevalencia de los

adenomas varía un poco. En un estudio reciente publicado en el JAMA [Ferlitsch *et al*, Sex-Specific Prevalence of Adenomas, Advanced Adenomas, and Colorectal Cancer in Individuals Undergoing Screening Colonoscopy JAMA, 28 de septiembre de 2011-Vol 306, N° 12], la prevalencia de todos los adenomas se describe en un 19.7%, y la de los adenomas avanzados en un 6.3%. Pero, en este mismo estudio, la prevalencia de los cánceres es del 1,1%, lo que es el doble de lo que se describe en Europa (quizás debido a un efecto de detección por colonoscopia: no sólo sujetos asintomáticos). La definición de los adenomas avanzados es quizás diferente de la que se ha utilizado aquí.

En un estudio autopsico [Williams AR, Balasooriya BA, Day DW. Polyps and cancer of the large bowel: a necropsy study in Liverpool. Gut. 1982 Oct; 23(10):835-42], la prevalencia se había descrito al 33% para los adenomas y 13% para los adenomas avanzados.

En base a los resultados anteriores, fijando el límite a 11.06 ng/ml para guardar el mismo límite que para los carcinomas *in situ* T0, se detectan un 20.5% de los adenomas. Se puede extrapolar un valor predictivo positivo del ensayo LFABP para la detección de los adenomas: del 50% al 62% según las cifras de prevalencia utilizadas (para una especificidad fijada al 95%).

Por lo tanto, el valor predictivo positivo (VPP) del análisis de la LFABP en el suero de los pacientes, para la detección de los adenomas, es bueno. En particular, la VPP es tan buena como lo que se describe para los ensayos de sangre en las heces (las cifras de VPP en la bibliografía son del 34 al 43% para los adenomas avanzados en función del ensayo de búsqueda de sangre en las heces utilizado, sobre los estudios de detección realizados con los ensayos inmunológicos de búsqueda de sangre en las heces, y alrededor del 13% al 20% para los ensayos con guayaco).

Resultados los análisis de ACE (sobre Vidas® CEAs) para la detección de los pacientes con adenomas:

Comparativamente, sólo 4 pacientes con adenomas tienen un índice de ACE por encima del límite de los controles de colonoscopia negativa (6.05 ng/ml en nuestra cohorte, descrito por estar entre 5 y 10 ng/ml). Sólo 2 pacientes tienen un índice de ACE >10 ng/ml de los 77 pacientes con adenomas ensayados.

Resultados los análisis de CA19-9 (sobre Vidas® CA19-0) para la detección de los pacientes con adenomas:

No existe ningún paciente con adenoma que tenga un índice de CA-19-9 por encima del límite de las colonoscopias negativas. Para los pacientes con adenomas, el índice más elevado es de 29,05 U/ml.

Ejemplo 4: Detección de los tumores *in situ* (T0) por el análisis ELISA de la LFABP sobre el autómata Vidas®

1) Pacientes y extracciones

La recogida de las muestras de sangre se ha realizado gracias a una red de 8 centros clínicos repartidos por toda Francia, en el ámbito de 2 protocolos de la ley Huriet para los pacientes que padecen cáncer colorrectal y de tumores *in situ*. Para los pacientes de control, de colonoscopias negativas, y portadores de adenomas colorrectales, se ha elaborado un estudio multicentro que implica una treintena de gastroenterólogos para recoger la sangre de pacientes Hémocult™ positivos antes de la realización de la colonoscopia y de toda preparación cólica. Por otro lado, se obtuvieron unas muestras de suero de donantes de sangre de los Establecimientos Franceses de la Sangre (EFS), según los procedimientos en práctica en estos centros.

Todas las extracciones se realizaron según la legislación en vigor y las Buenas Prácticas Clínicas, según un proceso de almacenamiento y de seguimiento según las buenas prácticas de laboratorio, estando los pacientes y los controles colonoscópicos negativos extraídos exactamente en las mismas condiciones.

Para la obtención de suero, la extracción sanguínea se lleva a cabo sobre tubo seco. Después de la coagulación, el tubo se centrifuga 10 min con 1000 g, se extrae el suero, se divide en alícuotas y se conserva a -80°C. Las muestras se documentan perfectamente para el historial clínico de los pacientes.

En total, se han ensayado 182 pacientes: 8 pacientes que presentan un tumor *in situ* T0, 104 pacientes que presentan un cáncer colorrectal invasivo de fase TNM I a IV, 70 pacientes control con una colonoscopia totalmente normal.

- 8 pacientes que padecen Tis (Tumor *in situ*, o carcinoma intra-mucosa, no invasivo (T0, N0, MO en el momento de la extracción sanguínea)
- 14 pacientes CCR invasivo de fase TNM I
- 49 pacientes CCR invasivo de fase TNM II

- 27 pacientes CCR invasivo de fase TNM III
- 13 pacientes CCR invasivo de fase TNM IV
- 1 paciente CCR no clasificado

2) Análisis Vidas®

La proteína LFABP se ha analizado con la ayuda del ensayo LFABP Vidas® 2C9G6/5A8H2 descrito en el ejemplo 2. Este tipo de ensayo se puede realizar también en microplaca, de manera automatizada o manual.

Para este ejemplo, el test ELISA se ha construido utilizando los reactivos del kit Vidas® HBs Ag Ultra (bioMérieux, Cat. No. 30315). Los reactivos se utilizaron tales como se describen en el prospecto correspondiente (ref. 11728 D-FR-2005/05), modificada de la siguiente manera:

- Los conos se sensibilizaron con los AC de captura 2C9G6 utilizado a una concentración de 10 µg/ml.
- El contenido del segundo pocillo del cartucho HBS Ag Ultra se ha sustituido por 300 µl de anticuerpos de revelación 5A8H2, acoplado con biotina, diluidos a 1 µg/ml en el tampón del segundo pocillo del kit Vidas® HBs Ag Ultra (tampón con suero de cabra y azida de sodio a 1 g/l).
- La muestra de suero (50µl) se ha diluido directamente en el segundo pocillo del cartucho HBS Ag Ultra.
- La reacción ELISA se ha realizado con la ayuda del autómatas Vidas® y del protocolo HBS cuya etapa de incubación de la muestra con los anticuerpos de captura y de revelación se había llevado a 100 ciclos.
- 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).

Los marcadores tumorales ACE et CA19-9 se han analizado con la ayuda de los kits de análisis de la solicitante, respectivamente Vidas® CEAs, Vidas® CA19-9, siguiendo el protocolo de realización específico de cada kit.

Se ha establecido una curva patrón analizando un intervalo de concentración de la proteína biomarcador recombinante. La curva patrón se ha trazado detallando en las abscisas la concentración de la proteína biomarcador y en las ordenadas la señal leída por Vidas® (RFV o Valor de Fluorescencia Relativa - Relative Fluorescence Value). La concentración de la proteína biomarcador presente en el fluido corporal a analizar (sangre, suero, plasma, heces) se ha calculado detallando la concentración que corresponde a la señal RFV leída por Vidas®.

Los marcadores tumorales ACE et CA19-9 se analizaron con la ayuda de los kits de análisis de la solicitante, respectivamente Vidas® CEAs, Vidas® CA19-9, siguiendo el protocolo de realización específico de cada kit.

Tabla 7

Análisis LFABP, ACE y CA19-9 de los 182 pacientes ensayados

Patología	N° Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	Nota	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
ColoNeg	HGED005	68	Hombre	NA		2,08	4,38	3,70
ColoNeg	PROMIS 21-01-005	68	Hombre	NA		0,50	16,94	5,94
ColoNeg	PROMIS 21-01-006	62	Hombre	NA		0,00	2,10	2,65
ColoNeg	PROMIS 21-01-009	51	Mujer	NA		0,68	10,36	9,52
ColoNeg	PROMIS 21-01-011	60	Mujer	NA		0,00	4,31	0,45
ColoNeg	PROMIS 21-01-012	55	Mujer	NA		2,10	9,02	1,94
ColoNeg	PROMIS 21-02-001	73	Mujer	NA		1,15	5,02	11,06
ColoNeg	PROMIS 21-02-003	55	Mujer	NA		0,81	19,93	3,38
ColoNeg	PROMIS 21-02-004	57	Hombre	NA		0,00	2,48	7,23
ColoNeg	PROMIS 21-02-006	51	Hombre	NA		0,00	3,67	4,47
ColoNeg	PROMIS 21-02-008	55	Hombre	NA		1,10	7,61	10,22
ColoNeg	PROMIS 21-02-011	55	Mujer	NA		1,56	13,65	2,01
ColoNeg	PROMIS 21-02-014	58	Hombre	NA		0,81	2,02	6,68
ColoNeg	PROMIS 21-02-016	62	Hombre	NA		3,36	3,43	0,43
ColoNeg	PROMIS 21-03-004	61	Hombre	NA		3,46	2,33	8,62
ColoNeg	PROMIS 21-03-013	52	Mujer	NA		0,00	1,02	2,98

ES 2 735 330 T3

Patología	N° Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	Nota	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
ColoNeg	PROMIS 21-03-015	74	Mujer	NA		0,90	2,48	7,26
ColoNeg	PROMIS 21-04-002	67	Hombre	NA		0,83	9,73	5,97
ColoNeg	PROMIS 21-04-006	72	Hombre	NA		0,68	2,33	2,25
ColoNeg	PROMIS 21-04-007	68	Mujer	NA		0,79	3,04	7,26
ColoNeg	PROMIS 21-04-008	62	Mujer	NA		1,06	1,02	5,97
ColoNeg	PROMIS 21-04-009	58	Hombre	NA		1,10	11,92	3,67
ColoNeg	PROMIS 21-04-013	63	Mujer	NA		3,09	11,92	5,03
ColoNeg	PROMIS 21-07-004	66	Hombre	NA		1,33	3,83	9,55
ColoNeg	PROMIS 21-12-007	53	Mujer	NA		0,00	2,86	6,03
ColoNeg	PROMIS 21-12-011	52	Hombre	NA		4,24	8,63	1,79
ColoNeg	PROMIS 21-22-001	61	Mujer	NA		2,87	17,25	2,08
ColoNeg	PROMIS 21-22-006	65	Mujer	NA		1,06	2,33	6,60
ColoNeg	PROMIS 21-22-008	57	Mujer	NA		0,00	2,79	5,20
ColoNeg	PROMIS 37-03-004	53	Mujer	NA		0,74	2,17	2,18
ColoNeg	PROMIS 37-04-001	62	Hombre	NA		5,16	4,54	7,09
ColoNeg	PROMIS 37-04-005	69	Mujer	NA		0,92	3,51	6,51
ColoNeg	PROMIS 37-05-008	55	Hombre	NA		0,00	2,86	6,60
ColoNeg	PROMIS 37-06-001	65	Mujer	NA		1,49	5,65	5,99
ColoNeg	PROMIS 37-09-002	50	Mujer	NA		0,77	26,00	1,74
ColoNeg	PROMIS 37-11-001	56	Hombre	NA		0,00	1,63	2,72
ColoNeg	PROMIS 37-11-002	59	Hombre	NA		0,00	1,86	2,40
ColoNeg	PROMIS 37-11-011	71	Hombre	NA		1,28	0,48	4,69
ColoNeg	PROMIS 37-11-016	50	Mujer	NA		0,00	5,02	1,87
ColoNeg	PROMIS 37-12-002	63	Hombre	NA		0,79	2,63	3,01
ColoNeg	PROMIS 37-13-003	53	Mujer	NA		0,92	7,38	4,28
ColoNeg	PROMIS 37-13-006	53	Hombre	NA		0,88	1,48	8,85
ColoNeg	PROMIS 37-13-008	61	Hombre	NA		0,00	0,94	4,22
ColoNeg	PROMIS 37-14-009	63	Hombre	NA		0,97	0,64	8,69
ColoNeg	PROMIS 37-14-018	60	Hombre	NA		0,57	2,86	6,11
ColoNeg	PROMIS 37-14-021	61	Mujer	NA		0,92	3,59	0,62
ColoNeg	PROMIS 37-15-002	68	Mujer	NA		0,68	3,75	3,15
ColoNeg	PROMIS 37-15-006	67	Mujer	NA		1,08	2,10	6,30
ColoNeg	PROMIS 37-16-001	57	Hombre	NA		0,74	3,75	3,99
ColoNeg	PROMIS 37-17-001	52	Hombre	NA		1,87	4,78	4,63
ColoNeg	PROMIS 37-17-003	55	Hombre	NA		5,81	1,71	2,65
ColoNeg	PROMIS 37-17-004	58	Mujer	NA		1,01	3,04	5,68
ColoNeg	PROMIS 37-18-001	53	Hombre	NA		0,55	3,43	4,31
ColoNeg	PROMIS 37-18-003	50	Mujer	NA		0,63	2,33	7,76
ColoNeg	PROMIS 37-18-004	57	Hombre	NA		0,00	2,10	3,83
ColoNeg	PROMIS 37-18-005	55	Mujer	NA		0,85	3,28	3,49
ColoNeg	PROMIS 37-18-024		Hombre	NA		1,10	4,38	2,55
ColoNeg	PROMIS 37-19-006	50	Hombre	NA		0,00	1,63	9,08
ColoNeg	PROMIS 37-19-007	51	Mujer	NA		0,66	0,56	3,33
ColoNeg	PROMIS 37-20-004	53	Mujer	NA		1,17	1,02	2,84
ColoNeg	PROMIS 71-02-003	60	Mujer	NA		0,55	1,33	1,62
ColoNeg	PROMIS 71-04-003	75	Mujer	NA		0,57	5,57	6,93
ColoNeg	PROMIS 71-09-007	52	Hombre	NA		0,88	4,86	4,81
ColoNeg	PROMIS 71-10-001	56	Mujer	NA		1,15	15,14	2,15
ColoNeg	PROMIS 71-10-007	71	Mujer	NA		2,80	3,20	0,82
ColoNeg	PROMIS 71-11-001	63	Hombre	NA		1,45	3,00	3,44
ColoNeg	PROMIS 71-11-003	59	Mujer	NA		1,26	40,93	3,91
ColoNeg	PROMIS 71-11-006	59	Hombre	NA		0,66	2,33	4,22
ColoNeg	PROMIS 71-11-008	54	Hombre	NA		0,88	8,32	2,59
ColoNeg	PROMIS 71-11-009	60	Mujer	NA		0,50	7,30	5,82
Tis	CLSP234	79	Hombre	T0		1,45	2,33	11,29
Tis	CLSP300	80	Mujer	T0		1,61	2,02	8,15
Tis	CLSP315	58	Hombre	T0		0,70	2,10	11,12
Tis	CLSP367	78	Hombre	T0		0,90	4,31	7,21
Tis	CLSP724	48	Hombre	T0		0,92	28,45	11,90
Tis	CNSE003	83	Mujer	T0		0,00	5,65	17,82
Tis	CNSE004	73	Mujer	T0		0,00	1,40	4,30

ES 2 735 330 T3

Patología	N° Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	Nota	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
Tis	GHBD015	82	Hombre	T0		0,83	5,65	12,83
CCR	CBSE001	69	Mujer	I		4,06	3,00	14,92
CCR	CBSE016	74	Hombre	I		6,79	1,25	17,36
CCR	CLSP047	76	Mujer	I		1,06	0,79	0,26
CCR	CLSP162	63	Mujer	I		0,00	0,71	6,22
CCR	CLSP196	55	Hombre	I		3,71	8,95	10,30
CCR	CLSP224	84	Mujer	I		4,62	6,12	42,38
CCR	CLSP235	71	Mujer	I		0,00	3,43	2,63
CCR	CLSP263	70	Hombre	I		1,10	30,04	8,05
CCR	CLSP340	78	Hombre	I		1,28	3,00	3,85
CCR	CLSP344	77	Mujer	I		1,49	2,17	3,78
CCR	CLSP364	81	Mujer	I		1,24	4,62	1,42
CCR	CLSP376	51	Hombre	I		1,17	12,63	2,58
CCR	GHBD003	54	Hombre	I		0,99	2,56	0,88
CCR	GHBD094	82	Hombre	I		1,12	9,18	8,08
CCR	CLSP075	65	Hombre	II		0,74	2,71	5,19
CCR	CLSP076	82	Mujer	II		0,97	0,71	10,27
CCR	CLSP080	74	Mujer	II		0,59	4,23	0,89
CCR	CLSP096	79	Mujer	II		12,70	7,22	8,86
CCR	CLSP110	67	Mujer	II		0,00	2,25	10,41
CCR	CLSP117	78	Mujer	II		2,08	5,25	20,19
CCR	CLSP130	81	Hombre	II		1,15	3,59	11,15
CCR	CLSP133	78	Mujer	II		0,70	3,59	3,52
CCR	CLSP143	76	Mujer	II		5,45	2,33	5,87
CCR	CLSP147	83	Hombre	II		1,56	1,56	3,55
CCR	CLSP154	76	Mujer	II		11,04	8,40	6,33
CCR	CLSP155	81	Mujer	II		11,53	37,95	3,30
CCR	CLSP157	45	Mujer	II		0,70	1,48	8,47
CCR	CLSP165	52	Hombre	II		0,00	2,33	5,64
CCR	CLSP170	80	Mujer	II		5,11	8,00	13,10
CCR	CLSP173	49	Mujer	II		0,66	8,79	0,61
CCR	CLSP177	81	Hombre	II		1,47	29,49	8,63
CCR	CLSP178	55	Hombre	II		20,68	8,95	101,48
CCR	CLSP179	69	Mujer	II		5,81	8,24	9,89
CCR	CLSP186	69	Desconocido	II		1,45	2,94	13,47
CCR	CLSP194	70	Hombre	II		1,01	1,79	19,11
CCR	CLSP201	75	Hombre	II		2,51	0,71	16,22
CCR	CLSP207	72	Mujer	II		1,35	26,00	15,17
CCR	CLSP209	38	Mujer	II		0,97	2,63	17,92
CCR	CLSP220	81	Mujer	II		7,52	12,79	10,63
CCR	CLSP222	81	Hombre	II		5,50	3,83	21,07
CCR	CLSP236	69	Hombre	II		0,00	1,63	13,64
CCR	CLSP253	61	Mujer	II		1,54	2,48	6,64
CCR	CLSP256	86	Mujer	II		3,54	10,75	8,27
CCR	CLSP280	62	Hombre	II		2,20	8,63	5,70
CCR	CLSP296	56	Hombre	II		1,89	73,08	9,93
CCR	CLSP310	81	Hombre	II		1,89	6,98	2,94
CCR	CLSP327	84	Hombre	II		0,94	1,17	7,25
CCR	CLSP333	87	Hombre	II		1,58	19,45	10,01
CCR	CLSP341	45	Hombre	II		0,53	3,67	3,46
CCR	CLSP346	66	Hombre	II		7,20	39,88	5,67
CCR	CLSP347	49	Mujer	II		7,41	1,25	6,43
CCR	CLSP380	60	Hombre	II		0,70	3,04	7,83
CCR	CNSE002	62	Mujer	II		3,84	4,46	1,58
CCR	GHBD021	71	Mujer	II		0,53	1,94	1,04
CCR	GHBD043	71	Hombre	II		2,27	9,18	5,78
CCR	GHBD064	83	Mujer	II		21,08	5,65	23,26
CCR	GHBD066	82	Mujer	II		0,57	1,94	6,98
CCR	GHBD075	58	Hombre	II		2,53	1,86	6,34
CCR	GHBD087	62	Mujer	II		2,17	5,10	8,83
CCR	GHBD090	59	Hombre	II		0,79	3,59	4,82

ES 2 735 330 T3

Patología	N° Paciente	Edad	Sexo	Fase TNM	Nota	ACE ng/ml	CA19-9 U/ml	LFABP ng/ml
CCR	GHBD096	62	Mujer	II		3,04	1,71	6,80
CCR	GHBD100	75	Hombre	II		2,08	4,94	10,82
CCR	GHBD103	68	Hombre	II		1,06	3,20	10,41
CCR	CBSE023	76	Hombre	III		2,27	9,34	11,10
CCR	CLSP044	81	Hombre	III		74,10	4,31	4,69
CCR	CLSP074	79	Mujer	III		0,81	7,06	4,26
CCR	CLSP078	72	Mujer	III		0,57	2,33	21,69
CCR	CLSP081	78	Mujer	III		1,56	2,94	4,80
CCR	CLSP098	61	Hombre	III		0,77	2,56	4,55
CCR	CLSP174	77	Hombre	III		31,33	264,90	20,46
CCR	CLSP227	52	Hombre	III		14,52	7,30	44,85
CCR	CLSP233	59	Hombre	III		1,03	4,23	2,38
CCR	CLSP255	42	Mujer	III		0,85	65,91	30,53
CCR	CLSP289	52	Hombre	III		0,90	2,17	8,30
CCR	CLSP320	70	Hombre	III		1,70	3,04	3,62
CCR	CLSP324	53	Hombre	III		4,57	15,37	2,02
CCR	CLSP383	78	Hombre	III		1,84	1,79	1,20
CCR	CLSP384	37	Hombre	III		68,52	26,63	15,70
CCR	CNSE001	78	Hombre	III		6,45	40,28	5,87
CCR	CNSE016	65	Hombre	III		20,59	91,16	52,41
CCR	CNSE017	77	Mujer	III		0,61	2,17	16,79
CCR	CSEM015	65	Mujer	III		1,38	1,02	11,51
CCR	CSEM029	63	Mujer	III		2,13	3,67	5,65
CCR	GHBD004	58	Hombre	III		16,26	5,73	1,97
CCR	GHBD017	70	Hombre	III		0,68	3,99	0,91
CCR	GHBD034	48	Mujer	III		0,57	2,94	0,52
CCR	GHBD042	77	Mujer	III		0,50	13,88	5,95
CCR	GHBD045	73	Hombre	III		0,55	1,56	1,07
CCR	GHBD089	54	Mujer	III		24,47	10,12	6,99
CCR	GHBD105	79	Hombre	III		1,35	37,39	5,84
CCR	CBSE012	37	Mujer	IV		4,06	44,73	4,48
CCR	CBSE026	72	Hombre	IV		333,40	23878,00	28,35
CCR	CLSP156	59	Hombre	IV		14,00	43,27	8,75
CCR	CLSP159	69	Mujer	IV		44,38	164,91	9,74
CCR	CLSP167	81	Hombre	IV		1,89	35,39	1,80
CCR	CLSP260	57	Mujer	IV		29,97	17,73	70,03
CCR	CLSP334	54	Mujer	IV		1,70	3,83	3,32
CCR	CLSP357	78	Hombre	IV		9,37	76,31	4,52
CCR	CLSP365	64	Hombre	IV		29,50	1135,20	6,41
CCR	CLSP366	45	Hombre	IV		2,63	52,40	4,62
CCR	GHBD022	56	Hombre	IV		1369,50	21,58	20,22
CCR	GHBD071	61	Hombre	IV		38,02	41,09	34,61
CCR	GHBD093	78	Hombre	IV		0,00	6,91	4,44
CCR	CLSP197	68	Mujer	NA		0,59	10,12	7,23
Límite (concentración máx. de los ColoNeg)						5,81	40,93	11,06
Tumor <i>in situ</i> Tis T0: Número de pacientes superiores al límite						0	0	5

	LFABP Número de pacientes detectados	ACE Número de pacientes detectados	CA 19-9 Número de pacientes detectados	Nombre total	
Tis T0	5	0	0	n= 8	
CCR+ fase I	3	1	0	n=14	
CCR+ fase II	13	8	1	n=49	
CCR+ fase III	10	9	3	n=27	
CCR+ fase IV	5	8	8	n=14	
			LFABP	ACE	CA19-9
sensibilidad Tis T0/ColoNeg en porcentaje			63	0	0
sensibilidad CCR fase I/ColoNeg			21	7	0
sensibilidad CCR fase II/ColoNeg			27	16	2
sensibilidad CCR fase III/ColoNeg			37	33	11
sensibilidad CCR fase IV/ColoNeg			36	57	57

Según la figura 2, se observa que la LFABP permite detectar 5 pacientes de 8 con un tumor *in situ* Tis (T0), sin detectar pacientes control con colonoscopia negativa (límite de especificidad fijada al 100%, con un límite de detección para la LFABP a 11,06 ng/ml). Al mismo tiempo, se tiene una buena detección de los cánceres colorrectales invasivos de fases I a IV por la LFABP.

La detección de Tis (T0) con respecto a las colonoscopias negativas es estadísticamente significativa ($P=0,0002$) con un t-ensayo de Mann-Withney. Como lo es la detección de los cánceres colorrectales invasivos de fase I a IV, ilustrada en la figura 3.

Como lo ilustran las figuras 4 y 5, comparativamente, con una especificidad fijada al 100% con el grupo control de colonoscopias negativas, no se detecta ningún paciente que padece Tis (T0) con el marcador antígeno carcinoembrionario (ACE). Y ningún paciente que padece adenoma, no paciente que padece Tis (T0), ni paciente portador de un CCR invasivo de fase TNM I con el marcador CA19-9 sobre la cohorte ensayada.

El ACE y el marcador CA 19-9 son unos marcadores tumorales y que detectan las fases avanzadas mejor que las fases precoces, siendo la liberación en la sangre del marcador proporcional al tamaño del tumor y a su agresividad.

Por el contrario, la solicitante ha puesto en evidencia de manera sorprendente que la LFABP detecta tanto las lesiones precancerosas (adenomas) y los tumores *in situ* T0 como las fases precoces y las fases avanzadas de cáncer colorrectal invasivo, y permite así mejorar las posibilidades de supervivencia de los pacientes.

Ejemplo 5: Detección de la LFABP por la técnica LC-MRM-MS y MRM cube

1) técnica MRM

1.1) Metodología

El principio de los análisis utilizando la tecnología de análisis Monitorización de Reacción Múltiple (Multiple Reaction Monitoring) MRM se basa en la asociación entre la cromatografía líquida y un espectro de masas de tipo híbrido triple cuadrupolo/trampa iónica (5500Q trap de AB Sciex) que funciona en modo MRM (Q112Q3). En principio, para cada proteína de interés, se eligen los péptidos de tripsina de interés. Las transiciones se predicen, por ejemplo, con la ayuda de los programas Midas™ y después MRM pilot™ de AB Sciex.

Se cuantifica el marcador LFABP mediante la cuantificación de uno o varios de estos péptidos. Estos péptidos se seleccionan en función de sus características fisicoquímicas, y de su capacidad para detectarse en el espectrómetro de masas. Los péptidos seleccionados se aíslan en el primer cuadrupolo Q1, para fragmentarse en la célula de colisión del espectrómetro de masas (q2). A partir de los iones hijos generados, se han elegido los más representativos y que permitan la mejor especificidad, y la intensidad de estos iones hijos se ha monitorizado después de la selección en el tercer cuadrupolo Q3. La pareja de masa ion padre/ion hijo se denomina transición, y es la asociación de la transición al tiempo de retención cromatográfico que le corresponde que define la especificidad del ensayo con respecto a la proteína diana. Para obtener un análisis cuantitativo, se necesita añadir un estándar interno (por ejemplo un péptido idéntico "pesado" que servirá de patrón, en cantidad conocida, que se añade a la muestra y se eluye en el mismo tiempo cromatográfico y que permite la cuantificación relativa). Los péptidos se seleccionaron en función de su sensibilidad (mejor respuesta en el espectrómetro de masas) y de su especificidad en la matriz.

Se sintetizaron unos péptidos de secuencias idénticas a los péptidos dianas seleccionados, con lisina o arginina marcadas (C13 y N15): +8 Dalton para la lisina, +10 Da para la arginina, con el fin de poder realizar unos análisis cuantitativos. En efecto, estos péptidos pesados tienen las mismas propiedades fisicoquímicas que los péptidos diana, y se eluyen al mismo tiempo de retención cromatográfica.

Con el fin de poder disminuir el límite de detección a algunos ng/ml, se ha llevado a cabo un procedimiento mejorado de MRM-MS. Las etapas sucesivas de este procedimiento son: 1) digestión tripsica, 2) fraccionamiento SPE (extracción de fase sólida (solid-phase extraction)) de los péptidos, 3) cromatografía líquida (LC) acoplada a la MRM-MS.

La puesta a punto se ha realizado sobre unas muestras sobrecargadas (spike) añadiendo los péptidos sintéticos.

Digestión enzimática:

Las muestras de sueros se desnaturalizaron en una solución de urea 6M tamponada por 10 mM de Tris pH 8 y que contiene 30 mM de ditioltreitol, durante 40 minutos a 40°C, después alquiladas por yodoacetamida 50 mM, a temperatura ambiente, durante 40 minutos, en oscuridad. Se diluyeron 6 veces en agua, después se realizó la digestión tripsica a 37°C, durante la noche, utilizando un relación enzima sustrato de 1:30 (Promega). La digestión se detiene por adición de ácido fórmico a una concentración final del 0,5%. Las muestras digeridas se desalan por

extracción sobre fase sólida (SPE, solid phase extraction) utilizando los cartuchos en fase inversa Oasis HLB 3cc (60 mg) (Waters). Después de la aplicación de la muestra, los cartuchos se lavan con 1 ml de ácido fórmico al 0,1%, después se ha realizado la elución con una mezcla metanol/agua (80/20 v/v) que contiene un 0,1% de ácido fórmico. Los eluatos se secan al vacío.

Fraccionamiento SPE:

Las muestras secas se recogen en 1 ml de tampón de acetato y se cargan sobre los cartuchos mixtos (hidrófobo e intercambio de catión) Oasis MCX (Intercambio catiónico mixto - mixed catión Exchange) 60 mg (Waters) equilibradas previamente en tampón de acetato y metanol. Los cartuchos se lavan con 1 ml de tampón de acetato y 1 ml de metanol. Los péptidos de interés (tabla 8) 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 al 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 inyectó una alícuota de 50 µl en la LC acoplada a un sistema MS-MS.

Cromatografía líquida y espectrometría de masas:

El análisis LC-MS se ha efectuado 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 masas, AB Sciex 400 QTrap (MS híbrido triple cuadrupolo - trampa iónica) (MDS Sciex) para una mejor sensibilidad. La separación LC se ha efectuado sobre una columna C18 Symmetry (Waters), a un caudal de elución de 300 pl/min. (Eluyente A = 0,1% ácido fórmico en agua, eluyente B = 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo, gradiente lineal del 5%B al 50%B en 25 min, después del 50%B al 100%B en 3 min). El análisis MS se ha realizado en modo de ionización positiva a una tensión de 5500 V aplicada con una 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 de cortina (nitrógeno) son de 30 y 20 psi, respectivamente. La fuente iónica Turbo VTM se ajusta a 400°C, el flujo de nitrógeno auxiliar a 40 psi. La energía de colisión (CE), la tensión de orificio (DP, declustering potential) y la tensión a la salida de la célula de colisión (CXP, collision cell exit potential) se optimizan para cada una de las transiciones MRM seleccionadas.

Todos los iones padres di- o tri-cargados de los péptidos tripticos teóricos en un intervalo de masa que va de 800 a 3000 Da y todos los iones fragmentos posibles de tipo y o b. Para cada proteína, cada transición posible se ha ensayado con el fin de determinar las transiciones más sensibles y más específicas. El resultado de esta selección se resume en la Tabla 8. La separación cromatográfica MCX se ha realizado a diferentes pH, el pH seleccionado para la continuación de los experimentos siendo el pH que permite obtener el área del pico más elevado.

La lista de las transiciones MRM teóricas de las secuencias SEC ID nº 5 a 7 para la evaluación del marcador LFABP se han generado utilizando el programa MIDAS (MRM-initiated Détection and Sequencing). Esta lista comprende 3 péptidos de la proteína LFABP, y para cada péptido, se siguen varias transiciones:

Tabla 8

Péptidos y transiciones utilizados para el análisis de la LFABP

LFABP										
Secuencias (SEC ID nº)	pl	TR	Q1 (péptido ligero natural)	Q3 (péptido ligero natural)	Q1 (péptido pesado estándar interno)	Q3 (péptido pesado estándar interno)	DP	EP	CE	CXP
AIGLPEELIQK (SEC ID nº 5)	4,31	16,75	605,9	630,6	609,9	638,6	120	2,2	35	34,5
				759,7		767,7	120	2,2	34	30
				856,2		864,2	120	2,2	20	36
GVSEIVQNGK (SEC ID nº 6)	6,99	9,4	515,8	545,3	519,8	553,3	108	2,2	19,8	31
				874,5		882,5	108	2,2	23,3	31
				658,4		666,4	108	2,2	23,3	31
TWQLEGDNK (SEC ID nº 7)	4,11	9,65	551,8	675,3	555,8	683,3	88	4,2	25,7	16
				803,4		811,4	88	4,2	18,9	17,5
				902,4		910,4	88	4,2	16	21

Además, utilizando un estándar interno, por ejemplo un péptido pesado de tipo AQUA (Sigma) o también una proteína recombinante pesada que servirán de patrón de análisis, o cualquier otro método de estandarización conocida por el experto en la materia, es posible cuantificar de manera absoluta el marcador tumoral de interés en un medio biológico complejo.

En un modo preferido de la invención, se seguirá la transición 605,9/586,5 del péptido de SEC ID nº 5, y su

transición del péptido pesado correspondiente. Se establecerá la relación de las áreas del pico cromatográfico de la transición natural dividida por el área de la transición pesada para obtener un análisis por transición para cada muestra, después se sumarán entre sí o no los análisis obtenidos para las diferentes transiciones, por ejemplo mediante el método median polish según el procedimiento de Tukey.

2) Detección de la LFABP mediante la técnica MRM cubed

2.1) Metodología

Se trata de un nuevo método desarrollado por los autores de la invención, que permite aumentar la relación señal/ruido y la especificidad analítica de un análisis. En un fluido complejo como el suero, el aumento de la especificidad analítica permite un aumento de la sensibilidad observada. Este método tiene un tiempo de ajuste más largo, e implica también un tiempo de adquisición más largo para cada muestra.

Con este método, la LFABP se ha cuantificado mediante el péptido de SEC ID nº 5.

El método se desarrolla sobre un espectrómetro de masa de tipo híbrido triple cuádruplo/trampa iónica (5500Q trap de AB Sciex) y consiste en: i) selección del ion peptídico proteotípico en Q1, ii) activación CID del ion seleccionado en Q2, iii) captura de uno de los iones fragmentos más intenso en Q3, lo que define la transición MRM óptima, iv) activación de este ion hijo para generar unos fragmentos de segunda generación, v) escaneado selectivo de las masas generadas de estos iones de segunda generación. Después de la adquisición, se reconstruye un cromatograma MRM3 después de la extracción de uno o varios iones producidos a partir de la segunda generación para su cuantificación.

Esta metodología muy específica permite limitar el pre-tratamiento de muestra. En este ejemplo, el único pretratamiento de muestra ha sido una extracción de los péptidos en fase sólida sobre una columna de intercambios catiónicos. La plataforma utiliza unas columnas cromatográficas convencionales de 2,1 mm.

2.2) Correlación entre los diferentes métodos de análisis

Para asegurarse de la fiabilidad de nuestros métodos de análisis, y de la validez clínica del marcador LFABP, se ha mirado:

- los coeficientes de variación de las evaluaciones, su repetibilidad y reproducibilidad
- la consistencia de los análisis repitiendo a varios meses de intervalo los mismos análisis sobre varias muestras: el coeficiente de unión para los análisis Vidas® de la LFABP eran del 99%, la correlación de unión para el ensayo MRM (de SEC ID nº 5, 605,9/856,5) LFABP del 98%.
- la correlación entre los diferentes análisis. La medición de la correlación se ha realizado al mismo tiempo por un ensayo de regresión lineal y un ensayo de correlación de Spearman.

Se observa una buena correlación entre dos péptidos de la proteína LFABP, realizada por un ensayo sobre 182 pacientes: de SEC ID nº 7 y de SEC ID nº 5. Estos dos análisis MRM independientes analizan por lo tanto adecuadamente la misma molécula. Se observa también una buena correlación entre el análisis MRM del péptido de SEC ID nº 5 y el análisis ELISA 2C9G6/5A8H2.

Como se muestra en la tabla 9 siguiente, la correlación entre los ensayos ELISA Vidas® y los ensayos MRM y MRM3 es buena (r^2 superior a 0,90 en todos los casos).

Tabla 9

Correlación entre los diferentes métodos de análisis evaluados sobre 8 Tis, 104 CCR invasivos, 70 pacientes donantes de sangre y 31 ColoNeg

	MRM SEC ID NO: 5 856,5	MRM3	Vidas® 2C9G6/5A8H2	Vidas® 5A8H2/3D6G1	ELISA Hycult biotech
MRM de SEC ID nº 5 605,9/856,5	1	0.94	0.90	0.92	0.80
MRM3	0.94	1	0.90	0.90	0.77
VIDAS® 2C9G6/5A8H2	0.90	0.90	1	0.96	0.73
Vidas® 5A8H2/3D6G1	0.92	0.90	0.96	1	0.81
ELISA comercial	0.80	0.77	0.73	0.81	1

Listado de secuencias

<110> Biomérieux Centre Hospitalier Universitaire de Dijon

<120> Procedimiento de detección de una lesión colorrectal

<130> BR077487

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 56

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Phe Ser Gly Lys Tyr Gln Leu Gln Ser Gln Glu Asn Phe Glu
1 5 10 15

Ala Phe Met Lys Ala Ile Gly Leu Pro Glu Glu Leu Ile Gln Lys Gly
20 25 30

Lys Asp Ile Lys Gly Val Ser Glu Ile Val Gln Asn Gly Lys His Phe
35 40 45

Lys Phe Thr Ile Thr Ala Gly Ser
50 55

<210> 2

<211> 65

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ser Phe Ser Gly Lys Tyr Gln Leu Gln Ser Gln Glu Asn Phe Glu
1 5 10 15

Ala Phe Met Lys Ala Ile Gly Leu Pro Glu Glu Leu Ile Gln Lys Gly
20 25 30

Lys Asp Ile Lys Gly Val Ser Glu Ile Val Gln Asn Gly Lys His Phe
35 40 45

Lys Phe Thr Ile Thr Ala Gly Ser Lys Val Ile Gln Asn Glu Phe Thr
50 55 60

Val
65

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

His Leu Ser Glu Tyr His Pro Trp His Pro Arg Ala
1 5 10

ES 2 735 330 T3

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 4
 Thr Glu Leu Asn Gly Asp Ile Ile Thr Asn Thr Met Thr Leu Gly Asp
 1 5 10 15
 Ile Val Phe Lys Arg Ile Ser Lys Arg Ile
 20 25
 10
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 5
 Ala Ile Gly Leu Pro Glu Glu Leu Ile Gln Lys
 1 5 10
 <210> 6
 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 25
 Gly Val Ser Glu Ile Val Gln Asn Gly Lys
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 10
 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 35
 Thr Val Val Gln Leu Glu Gly Asp Asn Lys
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de una lesión colorrectal no cancerosa susceptible de evolucionar en cáncer colorrectal invasivo, en un paciente que no tiene cáncer colorrectal invasivo,
5 mediante la determinación de la presencia de la Liver Fatty Acid-Binding Protein (LFABP), en una muestra biológica del paciente, estando dicha muestra seleccionada de entre la sangre entera, el suero y el plasma, y
10 mediante la puesta en evidencia de una variación de la expresión de la LFABP por comparación con una población de referencia denominada control.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la lesión colorrectal es un adenoma colorrectal.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que la lesión es un Tis T0.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se detecta la LFABP y/o por lo menos un trazador representativo de la LFABP y seleccionado de entre unos péptidos, unos ácidos nucleicos, unos anticuerpos y/o se mide por lo menos una actividad biológica, por ejemplo enzimática específica de la LFABP, en dicha muestra biológica.
20
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se pone en evidencia un aumento de la expresión de la LFABP.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se determina la presencia de la LFABP mediante una técnica de espectrometría de masa.
25
7. Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado por que se determina la presencia de la LFABP mediante la técnica LC-MRM-MS que combina la cromatografía líquida y la espectrometría de masa en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring).
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que se determina la presencia de la LFABP mediante una técnica inmunológica.
30
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que se determina la presencia de la LFABP mediante un método que combina técnica de espectrometría de masa y técnica inmunológica.
35
10. Procedimiento según la reivindicación 8 o 9, caracterizado por que se determina la presencia de la LFABP con unos anticuerpos que reconocen específicamente un péptido de secuencia seleccionada de entre SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, y SEC ID nº 4.
40
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que se determina la presencia de la LFABP mediante una técnica enzimática.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, caracterizado por que se detecta un péptido o una mezcla de péptidos seleccionados de entre SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 3, SEC ID nº 4, SEC ID nº 5, SEC ID NO 6 y SEC ID nº 7.
45
13. Procedimiento de detección, *in vitro*, de una susceptibilidad a un cáncer colorrectal en un paciente, caracterizado por que se realiza un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
50

Figura 1

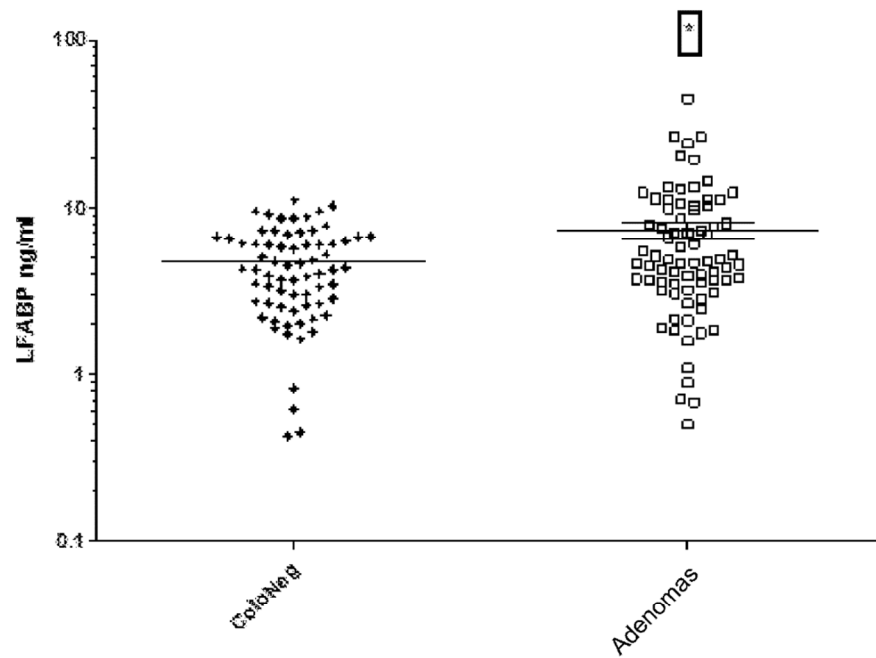


Figura 2

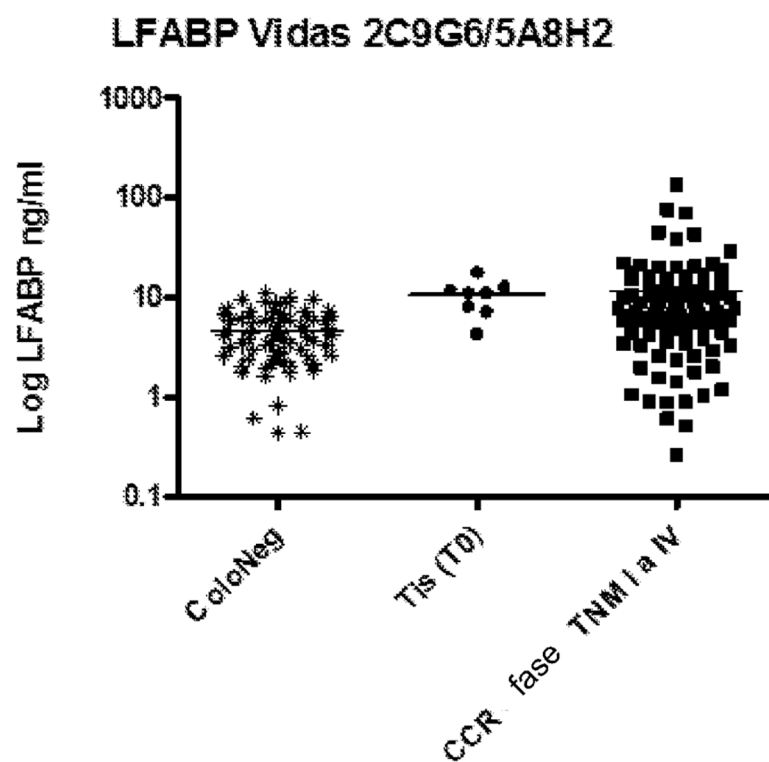


Figura 3

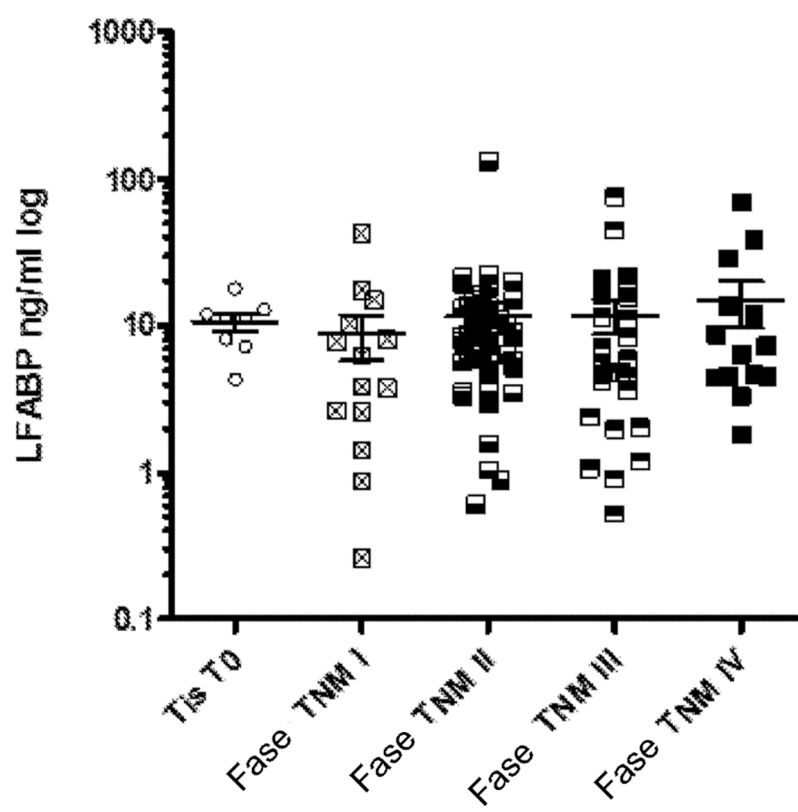


Figura 4

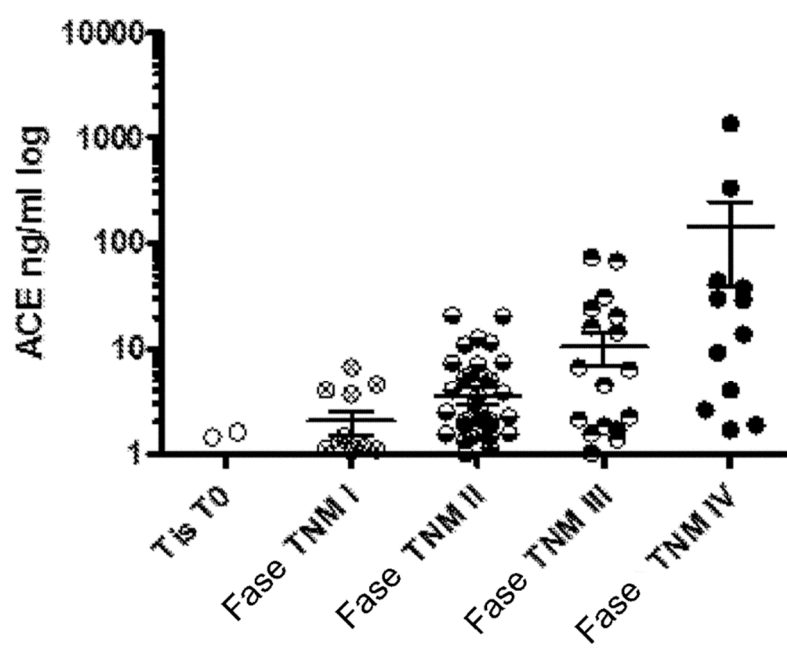


Figura 5

