

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 817**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2016 PCT/EP2016/069453**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2017 WO17029300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2016 E 16756993 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3337821**

54 Título: **Inmunoensayo para secuencias de colágeno tipo VIII**

30 Prioridad:

**18.08.2015 GB 201514658**

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

**24.11.2020**

73 Titular/es:

**NORDIC BIOSCIENCE A/S (100.0%)  
Herlev Hovedgade 207  
2730 Herlev, DK**

72 Inventor/es:

**HANSEN, NIELS, ULRİK, BRANDT;  
LEEMING, DIANA, JULIE, OERSNES y  
KARSDAL, MORTEN, ASSER**

74 Agente/Representante:

**FERNÁNDEZ POU, Felipe**

ES 2 795 817 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

Inmunoensayo para secuencias de colágeno tipo VIII

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a un epítipo presente en el extremo C terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII y a inmunoensayos que detectan dicho epítipo.

10 El colágeno tipo VIII es un producto de células endoteliales, queratinocitos, mastocitos, células endoteliales microvasculares y algunas células tumorales. También está presente en una variedad de matrices extracelulares tan diversas como la esclera, la piel y el glomérulo. Aunque la función del colágeno tipo VIII es incierta, los trabajos recientes ha puesto de relieve la importancia de este colágeno en la vasculatura. Puede ser particularmente significativa su regulación por incremento en la migración de las células del músculo liso y el papel potencial en el mantenimiento del fenotipo de las células del músculo liso. Es interesante especular que este colágeno puede proporcionar un sustrato para una variedad de células y facilitar el movimiento de las células endoteliales en la angiogénesis, las células del músculo liso en la invasión intimal y los miofibroblastos en condiciones fibróticas [1].

15 El colágeno tipo VIII es un colágeno no fibrilar de cadena corta y es el componente principal de la membrana de Descemet (membrana basal que separa las células endoteliales corneales del estroma corneal) de las células endoteliales corneales. Es parte del endotelio de los vasos sanguíneos y está presente en las arteriolas y vénulas, y por tanto se encuentra en el corazón, el cerebro, el hígado, los pulmones, los músculos, etc., mientras que se encuentra alrededor de los condrocitos en el cartílago [1]. El gen del procolágeno  $\alpha 1$  humano se localiza en el cromosoma 3, mientras que el gen del procolágeno  $\alpha 2$  humano se localiza en el cromosoma 1. Cada cadena  $\alpha$  tiene un peso molecular de aproximadamente 60 kDa [2]. Anteriormente, el colágeno tipo VIII se había descrito como un heterotrímero compuesto por dos cadenas  $\alpha 1$  y una cadena  $\alpha 2$  [3], pero los estudios in vitro han demostrado que también pueden formarse homotrímeros de  $\alpha 1$  o  $\alpha 2$  [4]. Además estos homotrímeros son resistentes a la pepsina y un estudio inmunohistoquímico demostró que no se colocan siempre en la córnea, el nervio óptico, la aorta y el cordón umbilical [5].

20 El colágeno tipo VIII es sintetizado por las células endoteliales aórticas y corneales, así como por las células endoteliales de la arteria pulmonar y las células endoteliales microvasculares. No todas las células endoteliales expresan colágeno tipo VIII, y como tal el colágeno puede estar ausente de los vasos grandes y pequeños [6]. También se ha demostrado que los mastocitos humanos producen colágeno tipo VIII en condiciones normales y patológicas, y se ha especulado que esto contribuye a la angiogénesis, la remodelación de los tejidos y la fibrosis [7].

30 La angiogénesis, la remodelación de los tejidos y la fibrosis son partes importantes del desarrollo y la progresión tumoral [8]. Los pulmones tienen un área de superficie grande con una membrana basal asociada y una matriz intersticial, y es bien sabido que las proteínas de la matriz como el colágeno y la elastina tipo I, III, IV y VI están elevadas en pacientes con una enfermedad pulmonar [9-13]. El colágeno tipo VIII puede estar relacionado con el cáncer ya que la angiogénesis tumoral se encuentra en la mayoría de los tumores malignos. Está indirectamente implicado en eventos tumorigénicos como la proliferación celular y metástasis debido a la dependencia del intercambio de oxígeno y nutrientes con productos de desecho tumoral [14]. Durante la angiogénesis, las células endoteliales son inducidas a proliferar y migrar, así como a activar vías de señalización que a su vez impulsan los cambios en la forma de las células y el brote angiogénico [15]. Además, los vasos sanguíneos tumorales a menudo no se vuelven inactivos debido a una remodelación alterada del tejido que lleva a angiogénesis esporádica y a la formación de vasos sanguíneos con fugas. Como con la angiogénesis, la fibrosis es un fenómeno que puede observarse en muchos tumores malignos. En el cáncer, la fibrosis también es conocida como desmoplasia. En la desmoplasia, se observa una acumulación de fibroblastos asociados a cáncer (CAF) perpetuamente activados que muestran una expresión aumentada y alterada de proteínas de la matriz extracelular (ECM), incluyendo los colágenos [16]. La desmoplasia está emergiendo como un proceso importante y activo involucrado en la iniciación y progresión tumoral y puede, entre otras cosas, promover la migración de las células cancerosas [17].

35 Korsching et al, [34] divulga un anticuerpo dirigido contra los aminoácidos 100-111 de *COL8A1* humano con un kDa de aproximadamente 1.3.nM.

55 Como tal, un objetivo de la presente invención es cuantificar el colágeno tipo VIII en muestras de suero de pacientes diagnosticados con enfermedades asociadas con remodelación vascular y angiogénesis, como la fibrosis y el cáncer.

60 La secuencia del colágeno humano alfa-1 (VIII) se expone en la SEQ ID NO. 1. Un péptido señal 1-27 (MAVLPGPLQL LGVLLTISLS SIRLIQA) se escinde para producir la cadena de proteína alfa-1 madura 28-744. La secuencia del extremo N-terminal de la cadena de proteína alfa-1 madura es, por lo tanto, NH<sub>2</sub>-GAYYGKPLP ..y la secuencia del extremo C-terminal es ..SFSGYLLYPM-COOH.

65 Ahora hemos desarrollado un anticuerpo monoclonal y un kit de ELISA dirigido al extremo C-terminal de la cadena madura Tipo VIII- $\alpha 1$ . Nos referimos a este kit y a la reactividad medida con él aquí como 'C8-C'.

Hemos establecido que los niveles de C8-C son elevados en comparación con los controles en la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el carcinoma de células escamosas de pulmón junto con varios tipos de cáncer.

5 La presente invención utiliza un anticuerpo reactivo con un epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  del colágeno Tipo VIII, que se une específicamente a dicho epítipo C-terminal comprendido en una secuencia de aminoácidos C-terminal. SSFGYLLYPM-COOH.

10 El término "anticuerpo" como se usa en la presente incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y también fragmentos de unión específicos de anticuerpos como Fab o F(ab')<sub>2</sub>. Por tanto, dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión específica.

15 Preferiblemente, dicho anticuerpo no reconoce ni se une a una versión alargada de dicha secuencia de aminoácidos C-terminal que es ..SSFSGYLLYPM-COOH.

Preferiblemente, dicho anticuerpo no reconoce ni se une (o tampoco reconoce ni se une) a una versión truncada de dicha secuencia de aminoácidos C-terminal que es ..SSFSGYLLYP-COOH.

20 Preferiblemente, la relación de la afinidad de dicho anticuerpo por la secuencia de aminoácidos ..SSFSGYLLYPM-COOH con la afinidad de dicho anticuerpo por la secuencia de aminoácidos alargada ..SSFSGYLLYPM-COOH, y/o la secuencia de aminoácidos truncada ..SSFSGYLLYP-COOH, es mayor que 10 a 1.

25 De manera más general, la relación de la afinidad de dicho anticuerpo por la secuencia de aminoácidos ..SSFSGYLLYPM-COOH con la afinidad de dicho anticuerpo por dicha secuencia de aminoácidos alargada es preferiblemente mayor que 10 a 1, preferiblemente mayor que 50 a 1, preferiblemente mayor que 100 a 1, preferiblemente mayor que 500 a 1, preferiblemente mayor que 1000 a 1, y lo más preferible mayor que 10.000 a 1.

30 También preferiblemente, la relación de la afinidad de dicho anticuerpo por la secuencia de aminoácidos ..SSFSGYLLYPM-COOH con la afinidad de dicho anticuerpo por dicha secuencia de aminoácidos truncada es mayor que 10 a 1, preferiblemente mayor que 50 a 1, preferiblemente mayor que 100 a 1, preferiblemente mayor que 500 a 1, preferiblemente mayor que 1000 a 1, y lo más preferible mayor que 10.000 a 1.

35 La invención incluye un método de inmunoensayo para detectar o cuantificar en una muestra un epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  madura de colágeno tipo VIII, en donde dicho método comprende poner en contacto una muestra que comprende dicho epítipo terminal con un anticuerpo como se ha descrito anteriormente, y determinar el cantidad de unión de dicho anticuerpo.

40 La presente invención proporciona un método de inmunoensayo para detectar o cuantificar en una muestra de biofluido un epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII comprendido en la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal SFGYLLYPM-COOH, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra que comprende dicho epítipo C-terminal con un anticuerpo específicamente reactivo con un epítipo comprendido en la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal SFGYLLYPM-COOH, y determinar la cantidad de unión de dicho anticuerpo, en donde dicho biofluido es suero o plasma.

45 Dicho inmunoensayo puede ser un ensayo de competición o un ensayo tipo sándwich como un radioinmunoensayo o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

50 Dicho método puede comprender además correlacionar la cantidad de dicho epítipo C-terminal o N-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII determinada por dicho método con los valores normales estándar de dicho extremo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII para evaluar un cambio la misma a partir de los niveles normales.

55 Este biomarcador puede usarse para ayudar en el diagnóstico de estados de enfermedad o para proporcionar un pronóstico sobre los pacientes que probablemente sufran un deterioro más rápido de su condición, lo que puede hacer que sean pacientes más relevantes para participar en un ensayo clínico de un tratamiento relevante. Tales estados de enfermedad y/o afecciones incluyen fibrosis y cáncer. Las afecciones fibróticas incluyen (pero no están limitadas a) fibrosis pulmonar idiopática (FPI) y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), y los cánceres incluyen (pero no están limitados a) cáncer de mama, cáncer de colon, melanoma, carcinoma de células no escamosas del pulmón (NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, y carcinoma de pulmón de células escamosas (SCLC).

60 Un aspecto adicional de la divulgación proporciona un kit de ensayo para determinar la cantidad de un epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno Tipo VIII, que comprende un compañero de unión inmunológica de la invención y por lo menos uno de:

65

- una placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina
- un péptido que es reactivo con dicho compañero de unión inmunológica, que puede ser un péptido biotinilado Biotin-L-SFSGYLLYPM-COOH, en el que L es un conector opcional
- un anticuerpo secundario opcionalmente biotinilado para usar en un inmunoensayo sándwich
- un péptido calibrador que comprende la secuencia C-terminal ..SSFSGYLLYPM-COOH
- un kit de marcado de anticuerpos HRP
- un kit de radiomarcado de anticuerpos
- un kit de visualización de ensayo

10 La invención se describirá e ilustrará adicionalmente con referencia a los dibujos acompañantes en los que:

La Figura 1 muestra resultados de una prueba de especificidad peptídica de dos anticuerpos monoclonales;

15 La Figura 2 muestra resultados de una prueba de reactividad del anticuerpo monoclonal 13G5 en suero humano;

La Figura 3 muestra resultados de una prueba adicional de la reactividad del anticuerpo monoclonal 13G5 en suero humano; y

20 La Figura 4 muestra resultados de una prueba adicional de la reactividad del anticuerpo monoclonal 13G5 en suero humano.

### Ejemplos

25 Ejemplo 1: Desarrollo de anticuerpos para el ensayo de C8-C, clon 13G5;

Usamos los últimos 10 aminoácidos de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII (<sup>735</sup>SFSGYLLYPM<sup>744</sup>) como un péptido inmunogénico para generar anticuerpos monoclonales de epítomos específicos. Los métodos usados para el desarrollo de anticuerpos monoclonales fueron como los descritos anteriormente [18]. Brevemente, se inmunizaron ratones Balb/C de 4 a 6 semanas de edad por vía subcutánea con 200  $\mu$ l de antígeno emulsionado con 50  $\mu$ g del péptido inmunogénico. Se realizaron inmunizaciones consecutivas a intervalos de 2 semanas en adyuvante incompleto de Freund, hasta que se alcanzaron niveles estables de titulación de suero, y se sangraron los ratones a partir de la segunda inmunización. En cada sangrado, se detectó el título de suero y se seleccionó el ratón con el título de antisuero más alto y la mejor reactividad nativa para la fusión. El ratón seleccionado se dejó descansar durante 1 mes seguido de refuerzo intravenoso con 50  $\mu$ g de péptido inmunogénico en 100  $\mu$ l de solución de cloruro de sodio al 0,9% 3 días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

El procedimiento de fusión se ha descrito en otra parte [19]. Brevemente, las células de bazo de ratón se fusionaron con células compañeras de fusión de mieloma SP2/0. Las células de fusión se criaron en placas de 96 pocillos y se incubaron en la incubadora de CO<sub>2</sub>. Aquí se usó una dilución limitada estándar para promover el crecimiento monoclonal. Se seleccionaron y subclonaron líneas celulares específicas para el péptido de selección y sin reactividad cruzada con el péptido alargado (SFSGYLLYPM, Chinese Peptide Company, China). Finalmente, los anticuerpos se purificaron usando una columna de IgG.

45 Protocolo de ensayo de C8-C:

Las placas ELISA usadas para el desarrollo del ensayo fueron recubiertas con estreptavidina de Roche (cat.: 11940279). Todas las placas ELISA se analizaron con el lector ELISA de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA, USA). Marcamos el anticuerpo monoclonal seleccionado con peroxidasa de rábano picante (HRP) usando el kit de marcado Lightning link HRP de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Innovabioscience, Babraham, Cambridge, Reino Unido). Se recubrió una placa de estreptavidina de 96 pocillos con péptido sintético biotinilado biotina-KKKSFSFGYLLYPM (Chinese Peptide Company, China) disuelto en tampón de ensayo (Trizma 50 mM, Tween 20 0,46 mM, Rojo fenol 0,08 mM, NaCl 34 mM, Bronidox L5 al 0,36%, BSA al 1%, pH 7,4) y se incubó 30 minutos a 20° C. Se añadieron 20  $\mu$ l de péptido estándar o muestras diluidas en tampón de ensayo a los pocillos apropiados. seguido de 100  $\mu$ l de anticuerpo monoclonal conjugado HRP 13G5, y se incubó 20 horas a 4° C. Finalmente, se añadieron 100  $\mu$ l de tetrametilbenzidina (TMB) (Kem-En-Tec cat.4380H) y la placa se incubó 15 minutos a 20° C en la oscuridad. Todos los pasos de incubación anteriores incluyeron agitación a 300 rpm. Después de cada paso de incubación, la placa se lavó cinco veces en tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 50 mM). La reacción de TMB se detuvo añadiendo 100  $\mu$ l de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 1%) y se midió a 450 nm con 650 nm como referencia.

Evaluación técnica de C8-C:

65 El límite más bajo de detección (LLOD) se determinó a partir de 21 muestras cero (es decir, tampón) y se calculó como la media + 3x desviación estándar. La variación dentro del ensayo y las variaciones entre ensayos se

determinaron mediante 12 ejecuciones independientes de 8 muestras QC, y cada ejecución consistió de determinaciones dobles de las muestras. La recuperación de la dilución se determinó en 4 muestras de suero y 4 muestras de plasma EDTA y se calculó como un porcentaje de recuperación de muestras diluidas de la muestra al 100%. Los datos para la validación técnica se ven en la Tabla 1.

5

**Tabla 1.** Validación técnica del ensayo C8-C

Intervalo de detección	0.37 nM - 111 nM
Límite inferior de cuantificación	3.4 nM
Variación intraensayo	6%
Variación entre ensayos	12.70%
Intervalo de dilución de muestras de suero	1:2 (recomendado)
Intervalo de dilución de muestras de plasma (EDTA)	1:2 (recomendado)
Recuperación por dilución en suero	97.50%
Recuperación por dilución en plasma (EDTA)	91%
Estabilidad de analito suero (24 h, 4C/20C)	94%/67.3%
Estabilidad de analito plasma (EDTA) (24 h, 4C/20C)	83.3%/74.4%

10

15

20

25 **Ejemplo 2**

Usando el anticuerpo monoclonal 13G5 se midió C8-C en muestras de suero de pacientes diagnosticados con EPOC (n = 13), FPI (n = 10) y cáncer de pulmón de carcinoma de células escamosas (n = 10) obtenidas de Proteogenex (Culver City, CA) y se comparó con los controles no enfermos. Los resultados se muestran en la Figura 2.

30

Los resultados se muestran como media ± error estándar de la media (SEM). Las diferencias entre los valores medios se compararon mediante la prueba ANOVA de una vía de Kruskal-Wallis no paramétrica. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el software GraphPad Prism v.6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los valores de P menores de 0,05 se consideraron significativos.

35

Se descubrió que los niveles de C8-C eran elevados en todas estas afecciones clínicas.

40 **Ejemplo 3**

Se evaluó C8-C en una cohorte de EPOC más grande. Las concentraciones de C8-C se midieron en muestras de suero de pacientes diagnosticados con EPOC (n = 68) obtenidas del Hospital Hvidovre (Hospital Hvidovre, Dinamarca) y se compararon con los controles no enfermos (n = 20).

40

La Figura 3 muestra que la concentración de C8-C fue significativamente elevada en los pacientes diagnosticados con EPOC en comparación con los controles (p <0,0001).

45

50 **Ejemplo 4**

Usando el anticuerpo monoclonal 13G5 se midieron los niveles de C8-C en muestras de suero de pacientes diagnosticadas con cáncer de mama (n = 13), de colon (n = 7), gástrico (n = 9), melanoma (n = 7), NSCLS (n = 12), de ovario (n = 10), de páncreas (n = 5), de próstata (n = 14) y SCLC (n = 8) obtenidas de Asterand (Detroit, MI) y se compararon con controles no enfermos (n = 43). Las muestras se diluyeron 1:2 en el ensayo C8-C. Los resultados se muestran en la Figura 4.

50

55

Se descubrió que los niveles de C8-C eran elevados en todas estas afecciones clínicas.

**Exposición**

Hasta donde sabemos, esta es la primera divulgación que describe el desarrollo y la validación de un nuevo ELISA competitivo para la evaluación de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el extremo C-terminal del colágeno tipo VIII. Se demostró que el ensayo era técnicamente robusto, mostrando valores bajos de LLOD, variación intra- e inter-ensayo e interferencia con una recuperación de dilución aceptable y estabilidad del analito. La alineación de secuencia del extremo C-terminal humano, de rata, de ratón y bovino de colágeno tipo VIII muestra un 100% de homología entre las especies. El anticuerpo monoclonal 13G5 es específico hacia la secuencia C-terminal

60

65

SFSGYLLYPM. El ensayo no detectó el péptido alargado (un aminoácido adicional) o sin sentido indicando que el anticuerpo monoclonal es específico hacia el extremo C-terminal del colágeno tipo VIII. El ELISA competitivo de C8-C funciona para evaluaciones en matrices tanto humanas como de roedores, lo que permite una buena ciencia traslacional.

El ensayo de C8-C descrito actualmente es diferente de otros ensayos disponibles comercialmente, ya que otros ensayos comerciales de colágeno tipo VIII disponibles utilizan anticuerpos o monoclonales o policlonales para los que no se conoce el epitopo preciso. Kapoor y col. planteó anticuerpos tanto policlonales como monoclonales hacia dominios triple-helicoidales de colágeno tipo VIII a partir de fragmentos de 50 kD derivados de la membrana de Descemet [20,21]. Los fragmentos usados para la inmunización son resistentes a la pepsina pero no resistentes a las colagenasas [21]. Dentro de los tejidos hay una remodelación en curso constante, con un fino equilibrio entre la formación y la degradación de las proteínas. En enfermedades, como la fibrosis o el cáncer, hay un aumento en el recambio de tejidos y el equilibrio se desplaza hacia la formación, lo que lleva a un aumento neto de proteínas de la matriz, pero es importante tener en cuenta que la degradación de las proteínas de la matriz también aumenta. Dado esto, es altamente plausible que el colágeno de tipo VIII sea escindido por colagenasas durante la remodelación del tejido. El anticuerpo NB683-13G5 desplegado en el ensayo de C8-C tiene la ventaja de que es específico de una secuencia pequeña que consiste de solo diez aminoácidos, lo que garantiza que detecta incluso los fragmentos pequeños generados por la degradación de la proteasa. Los anticuerpos generados por Kapoor et al. y Sawada et al. reconocen un péptido bastante grande que es probable que se degrade [21,22], por lo tanto, se detecta un grupo más pequeño de colágeno tipo VIII.

Se ha demostrado que el colágeno tipo VIII está elevado después de una lesión vascular y es parte de la remodelación del tejido que tiene lugar después de la lesión [23]. Además, el colágeno tipo VIII se ha localizado en las células endoteliales durante la proliferación y cuando las células endoteliales están expuestas a factores angiogénicos puede observarse un aumento de 4-6 veces del colágeno tipo VIII [24]. Se sabe que la expresión génica del colágeno tipo VIII es elevada en el estroma asociado al tumor y se ha demostrado que es elevada en las células de carcinoma hepatocelular [25]. Hasta donde sabemos, somos los primeros en mostrar que las concentraciones de colágeno tipo VIII están elevadas en la circulación de pacientes diagnosticados con EPOC y cáncer de pulmón SCC. Está generalmente aceptado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) está regulado por incremento en la EPOC, mientras que es bien sabido que tiene lugar una remodelación vascular. Recientemente, se ha aceptado que la angiogénesis aumenta en pacientes con EPOC [26,27]. Para confirmar las concentraciones elevadas de C8-C observadas en pacientes con EPOC, se evaluó una cohorte más grande de pacientes con EPOC. Se descubrió que pueden verse concentraciones significativamente aumentadas de C8-C en suero de pacientes con EPOC en comparación con los controles ( $p < 0,0001$ ). Con más precisión, se observó un aumento de 7 veces de las concentraciones de C8-C en el suero de pacientes con EPOC en comparación con los controles.

Además, las concentraciones de colágeno tipo VIII fueron significativamente elevadas en pacientes diagnosticadas con cáncer de mama, colon, melanoma, NSCLC, ovario, páncreas, próstata y SCLC, pero no cáncer gástrico. En resumen, se observaron aumentos entre 5 y 12 veces dentro de varios tipos de cáncer, excepto el cáncer gástrico. Se ha demostrado anteriormente que la expresión de colágeno tipo VIII es elevada en los vasos sanguíneos de algunos tipos de tumores cerebrales y varios carcinomas [28]. Además, el colágeno tipo VIII es expresado por las células endoteliales y las células del músculo liso, especialmente después de una lesión vascular, y por las células tumorales. La integrina  $\alpha 2\beta 1$  es un receptor conocido para el colágeno tipo I-VIII [29], que según los estudios ha aumentado en las células metastásicas en comparación con las células en el tumor primario [30]. El receptor está asociado con la progresión e invasión tumoral en varios tipos de cáncer. El colágeno tipo VIII es capaz de regular la migración de las células musculares lisas (SMC) a través del receptor  $\beta 1$  [29], las SMC siendo actores importantes en las enfermedades fibróticas y el microambiente tumoral [31]. El cáncer gástrico fue la única forma de cáncer que no mostraba concentraciones aumentadas de C8-C en suero. La bibliografía indica que hay una remodelación de ECM en curso en el tejido gástrico de cáncer [32], pero estos datos se basan en el metabolismo de colágeno no especificado o colágeno de tipo I, III y IV. Los inventores de la presente invención no pudieron encontrar ninguna bibliografía que confirmara la presencia de colágeno tipo VIII en cánceres relacionados con el estómago o gástricos, lo que podría explicar las bajas concentraciones de C8-C en el suero de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico.

En conclusión, los inventores de la presente invención son los primeros en desarrollar un ensayo de colágeno tipo VIII técnicamente robusto y muestran que las concentraciones de colágeno tipo VIII están significativamente elevadas en suero de pacientes diagnosticados con EPOC y varios tipos de cáncer. El anticuerpo NB683-13G5 se generó e implementó en el ELISA competitivo de C8-C y se descubrió que era específico para la parte C-terminal del colágeno tipo VIII.

En esta especificación, a menos que se indique expresamente lo contrario, la palabra 'o' se usa en el sentido de un operador que devuelve un valor verdadero cuando se cumpla una o ambas de las condiciones establecidas, en oposición al operador 'exclusivo o' que requiere que solo se cumpla una de las condiciones. La palabra 'comprende' se usa en el sentido de 'incluye' en lugar de significar 'consiste de'.

## Referencias

- 5 1. Kittelberger, R., Davis, P. F., Flynn, D. W. & Greenhill, N. S. Distribution of type VIII collagen in tissues: an immunohistochemical study. *Connect. Tissue Res.* 24, 303-318 (1990).
2. Ma, Z.-H., Ma, J.-H., Jia, L. & Zhao, Y.-F. Effect of enhanced expression of COL8A1 on lymphatic metastasis of hepatocellular carcinoma in mice. *Exp. Ther. Med.* 4, 621-626 (2012).
- 10 3. Jander, R., Korsching, E. & Rauterberg, J. Characteristics and in vivo occurrence of type VIII collagen. *Eur. J. Biochem.* 189, 601-607 (1990).
4. Illidge, C., Kielty, C. & Shuttleworth, A. The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) chains of type VIII collagen can form stable homotrimeric molecules. *J. Biol. Chem.* 273, 22091-5 (1998).
- 15 5. Greenhill, N. S., Rüger, B. M., Hasan, Q. & Davis, P. F. The alpha1(VIII) and alpha2(VIII) collagen chains form two distinct homotrimeric proteins in vivo. *Matrix Biol.* 19, 19-28 (2000).
6. Sage H, Balian G, Vogel AM, Bornstein P. Type VIII collagen. Synthesis by normal and malignant cells in culture. *Lab Invest* 1984;50:219-31.
- 20 7. Rüger B, Dunbar PR, Hasan Q, Sawada H, Kittelberger R, Greenhill N, et al. Human mast cells produce type VIII collagen in vivo. *Int J Exp Pathol* 1994;75:397-404.
8. Lu P. Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
- 25 9. Sand JMB, Knox AJ, Lange P, Sun S, Kristensen JH, Leeming DJ, et al. Accelerated extracellular matrix turnover during exacerbations of COPD. *Respir Res* 2015;16:69. doi:10.1186/sl2931-015-0225-3.
- 30 10. Ricard-Blum S, Dublet B, Rest M van der. *Unconventional Collagens: Types VI, VII, VIII, IX, X, XII, XIV, XVI, and XIX.* Oxford University Press; 2000.
- 35 11. Sand JM, Genovese F, Martinez F, Han M, Hogaboam C, Karsdal MA, et al. Serum levels of a MMP-12 generated type IV collagen fragment is elevated in COPD and IPF patients. *Eur Respir J* 2013;42:P838 - .
12. Willumsen N, Bager CL, Leeming DJ, Smith V, Christiansen C, Karsdal MA, et al. Serum biomarkers reflecting specific tumor tissue remodeling processes are valuable diagnostic tools for lung cancer. *Cancer Med* 2014;3:1136-45. doi:10.1002/cam4.303.
- 40 13. Kristensen JH, Larsen L, Dasgupta B, Brodmerkel C, Curran M, Karsdal MA, et al. Levels of circulating MMP-7 degraded elastin are elevated in pulmonary disorders. *Clin Biochem* 2015. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.07.009.
- 45 14. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2006;2:213-9. 15. Chung, AS. FN. *The Extracellular Matrix & Angiogenesis: Role of the Extracellular Matrix in Developing Vessels and Tumor Angiogenesis.* Pathways 2010:2-5.
16. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:392-401. doi:10.1038/nrc1877.
- 50 17. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM. Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22:697-706. doi:10.1016/j.ceb.2010.08.015.
18. Barascuk, N. et al. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin. Biochem.* 43, 899-904 (2010).
- 55 19. Geffer, M. L., Margulies, D. H. & Scharff, M. D. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet.* 3, 231-6 (1977).
- 60 20. Kapoor R, Bornstein P, Sage EH. Type VIII collagen from bovine Descemet's membrane: structural characterization of a triple-helical domain. *Biochemistry* 1986;25:3930-7.
21. Kapoor R, Sakai LY, Funk S, Roux E, Bornstein P, Sage EH. Type VIII collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices. *J Cell Biol* 1988;107:721-30. doi:10.1083/jcb.107.2.721.
- 65 22. Sawada H, Konomi H, Hirose K. Characterization of the collagen in the hexagonal lattice of Descemet's

membrane: Its relation to type VIII collagen. *J Cell Biol* 1990;110:219-27. doi:10.1083/jcb.110.1.219.

23. Leena Karttunen, Ute Felbor, Miikka Vikkula BRO. Vascular Matrix and Disorders. In: Zon LI, editor. *Hematop. A Dev. Approach*, New York: Oxford University Press, USA; 2001, p. 784-95.

24. Israel Vlodavsky GC. Fibroblast Growth Factors in Tumor Progression and Angiogenesis. In: Teicher BA, editor. *Antiangiogenic Agents Cancer Ther.*, New York: Springer Science & Business Media; 1998, p. 93-119.

25. Wang W, Xu G, Ding C-L, Zhao L-J, Zhao P, Ren H, et al. All-trans retinoic acid protects hepatocellular carcinoma cells against serum-starvation-induced cell death by upregulating collagen 8A2. *FEBS J* 2013;280:1308-19. doi:10.1111/febs.12122.

26. Matarese A, Santulli G. Angiogenesis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease 2012. doi:10.1038/npre.2012.7112.1.

27. Harkness LM, Kanabar V, Sharma HS, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt A-K. Pulmonary vascular changes in asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2014;29:144-55. doi:10.1016/j.pupt.2014.09.003.

28. Paulus W, Sage EH, Jellinger K, Roggendorf W. Type VIII collagen in the normal and diseased human brain. *Acta Histochem Suppl* 1992;42:195-9.

29. Adiguzel E, Hou G, Sabatini PJB, Bendeck MP. Type VIII collagen signals via  $\beta 1$  integrin and RhoA to regulate MMP-2 expression and smooth muscle cell migration. *Matrix Biol* 2013;32:332-41. doi:10.1016/j.matbio. 2013.03.004.

30. Klein CE, Dressel D, Steinmayer T, Mauch C, Eckes B, Krieg T, et al. Integrin alpha 2 beta 1 is upregulated in fibroblasts and highly aggressive melanoma cells in three-dimensional collagen lattices and mediates the reorganization of collagen I fibrils. *J Cell Biol* 1991;115:1427-36.

31. Sridhara SU, Choudaha N, Kasetty S, Joshi PS, Kallianpur S, Tijare M. Stromal myofibroblasts in nonmetastatic and metastatic oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol* 2013;17:190-4. doi:10.4103/0973-029X.119758.

32. Yamaguchi H, Yoshida N, Takanashi M, Ito Y, Fukami K, Yanagihara K, et al. Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhou gastric carcinoma cells. *PLoS One* 2014;9:e85485. doi:10.1371/journal.pone.0085485.

33. Korsching E and Rauterberg J. Generation of type VIII collagen specific antibodies. *J. Immunological Methods*, 1995; 188: 521-62.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Nordic Bioscience A/S

<120> Inmunoensayo para Secuencias de Colágeno Tipo VIII

<130> P19112WO

<150> GB1514658.2

<151> 2015-08-18

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 744

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 795 817 T3

5 Met Ala Val Leu Pro Gly Pro Leu Gln Leu Leu Gly Val Leu Leu Thr  
1 5 10 15

10 Ile Ser Leu Ser Ser Ile Arg Leu Ile Gln Ala Gly Ala Tyr Tyr Gly  
20 25 30

15 Ile Lys Pro Leu Pro Pro Gln Ile Pro Pro Gln Met Pro Pro Gln Ile  
35 40 45

20 Pro Gln Tyr Gln Pro Leu Gly Gln Gln Val Pro His Met Pro Leu Ala  
50 55 60

25 Lys Asp Gly Leu Ala Met Gly Lys Glu Met Pro His Leu Gln Tyr Gly  
65 70 75 80

30 Lys Glu Tyr Pro His Leu Pro Gln Tyr Met Lys Glu Ile Gln Pro Ala  
85 90 95

35 Pro Arg Met Gly Lys Glu Ala Val Pro Lys Lys Gly Lys Glu Ile Pro  
100 105 110

40 Leu Ala Ser Leu Arg Gly Glu Gln Gly Pro Arg Gly Glu Pro Gly Pro  
115 120 125

45 Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Leu Pro Gly His Gly Ile Pro Gly  
130 135 140

50 Ile Lys Gly Lys Pro Gly Pro Gln Gly Tyr Pro Gly Val Gly Lys Pro  
145 150 155 160

55 Gly Met Pro Gly Met Pro Gly Lys Pro Gly Ala Met Gly Met Pro Gly

ES 2 795 817 T3

					165					170					175		
5	Ala	Lys	Gly	Glu	Ile	Gly	Gln	Lys	Gly	Glu	Ile	Gly	Pro	Met	Gly	Ile	
				180					185					190			
10	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	His	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	
			195					200					205				
15	Lys	Pro	Gly	Gly	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	
		210					215					220					
20	Arg	Gly	Pro	Lys	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Leu	Arg	Gly	Pro	Lys	
		225				230					235					240	
25	Gly	Asp	Lys	Gly	Phe	Gly	Met	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Val	Lys	Gly	Pro	
					245					250					255		
30	Pro	Gly	Met	His	Gly	Pro	Pro	Gly	Pro	Val	Gly	Leu	Pro	Gly	Val	Gly	
				260					265					270			
35	Lys	Pro	Gly	Val	Thr	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Lys	
			275					280					285				
40	Pro	Gly	Ala	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Pro	Gln	Gly	Pro	Ile	Gly	Val	Pro	
		290					295					300					
45	Gly	Val	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Ile	Gly	Lys	Pro	Gly	Gln	
		305				310					315					320	
50	Asp	Gly	Ile	Pro	Gly	Gln	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Gly	Lys	Gly	Glu	Gln	
					325				330						335		
55	Gly	Leu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Pro	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	Gly	Lys	
				340				345						350			
60	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Asp	Arg	Gly	Met	Gly	Gly	Val	Pro	
			355					360				365					
65	Gly	Ala	Leu	Gly	Pro	Arg	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Ile	Gly	Ala	Pro	Gly	
		370					375					380					
70	Ile	Gly	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Pro	Gly	Leu	Pro	Gly	Ile	Pro	Gly	Pro	
		385				390					395					400	
75	Met	Gly	Pro	Pro	Gly	Ala	Ile	Gly	Phe	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Glu	Gly	
				405						410					415		

ES 2 795 817 T3

Gly Ile Val Gly Pro Gln Gly Pro Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly  
 420 425 430  
 5 Leu Gln Gly Phe Pro Gly Lys Pro Gly Phe Leu Gly Glu Val Gly Pro  
 435 440 445  
 10 Pro Gly Met Arg Gly Leu Pro Gly Pro Ile Gly Pro Lys Gly Glu Ala  
 450 455 460  
 15 Gly Gln Lys Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Val Pro Gly Leu Leu Gly  
 465 470 475 480  
 20 Pro Lys Gly Glu Pro Gly Ile Pro Gly Asp Gln Gly Leu Gln Gly Pro  
 485 490 495  
 25 Pro Gly Ile Pro Gly Ile Gly Gly Pro Ser Gly Pro Ile Gly Pro Pro  
 500 505 510  
 30 Gly Ile Pro Gly Pro Lys Gly Glu Pro Gly Leu Pro Gly Pro Pro Gly  
 515 520 525  
 35 Phe Pro Gly Ile Gly Lys Pro Gly Val Ala Gly Leu His Gly Pro Pro  
 530 535 540  
 40 Gly Lys Pro Gly Ala Leu Gly Pro Gln Gly Gln Pro Gly Leu Pro Gly  
 545 550 555 560  
 45 Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Ala Val Met Pro Pro  
 565 570 575  
 50 Thr Pro Pro Pro Gln Gly Glu Tyr Leu Pro Asp Met Gly Leu Gly Ile  
 580 585 590  
 55 Asp Gly Val Lys Pro Pro His Ala Tyr Gly Ala Lys Lys Gly Lys Asn  
 595 600 605  
 60 Gly Gly Pro Ala Tyr Glu Met Pro Ala Phe Thr Ala Glu Leu Thr Ala  
 610 615 620  
 65 Pro Phe Pro Pro Val Gly Ala Pro Val Lys Phe Asn Lys Leu Leu Tyr  
 625 630 635 640  
 60 Asn Gly Arg Gln Asn Tyr Asn Pro Gln Thr Gly Ile Phe Thr Cys Glu  
 645 650 655  
 65 Val Pro Gly Val Tyr Tyr Phe Ala Tyr His Val His Cys Lys Gly Gly  
 660 665 670

ES 2 795 817 T3

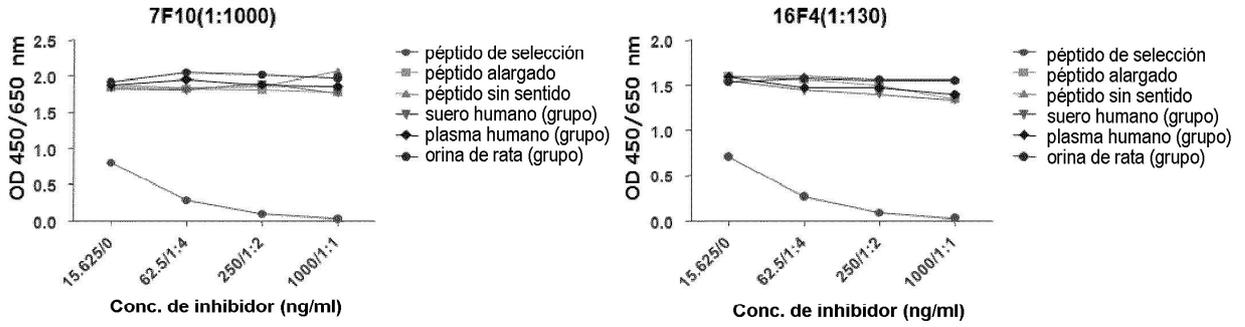
	Asn	Val	Trp	Val	Ala	Leu	Phe	Lys	Asn	Asn	Glu	Pro	Val	Met	Tyr	Thr
			675					680					685			
5	Tyr	Asp	Glu	Tyr	Lys	Lys	Gly	Phe	Leu	Asp	Gln	Ala	Ser	Gly	Ser	Ala
		690					695					700				
10	Val	Leu	Leu	Leu	Arg	Pro	Gly	Asp	Arg	Val	Phe	Leu	Gln	Met	Pro	Ser
	705					710					715					720
15	Glu	Gln	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Ala	Gly	Gln	Tyr	Val	His	Ser	Ser	Phe
					725					730					735	
20	Ser	Gly	Tyr	Leu	Leu	Tyr	Pro	Met								
				740												
25																
30																
35																
40																
45																
50																
55																
60																
65																

**REIVINDICACIONES**

- 5      **1.** Un método de inmunoensayo para detectar o cuantificar en una muestra de biofluido un epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII comprendido en la secuencia de aminoácidos C-terminal SFSGYLLYPM-COOH, en donde dicho método comprende poner en contacto dicha muestra que comprende dicho epítipo C-terminal con un anticuerpo específicamente reactivo con un epítipo comprendido en la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal SFSGYLLYPM-COOH, y determinar la cantidad de unión de dicho anticuerpo, en donde dicho biofluido es suero o plasma.
- 10     **2.** Un método como se reivindica en la reivindicación 1, en donde dicho inmunoensayo es un ensayo de competición o un ensayo tipo sándwich.
- 15     **3.** Un método como se reivindica en la reivindicación 2, en donde dicho inmunoensayo es un radioinmunoensayo o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.
- 20     **4.** Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además correlacionar la cantidad de dicho epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII determinada por dicho método con los valores de control no enfermos de dicho epítipo C-terminal de la cadena  $\alpha 1$  de colágeno tipo VIII para evaluar un cambio de la masa a partir de los niveles no enfermos.
- 25     **5.** Un método como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**Figura 1**

**Colágeno tipo VIII, clones 7F10 y 16F4 N-terminales**



**Colágeno tipo VIII, clones 13G5 y 16A5 C-terminales**

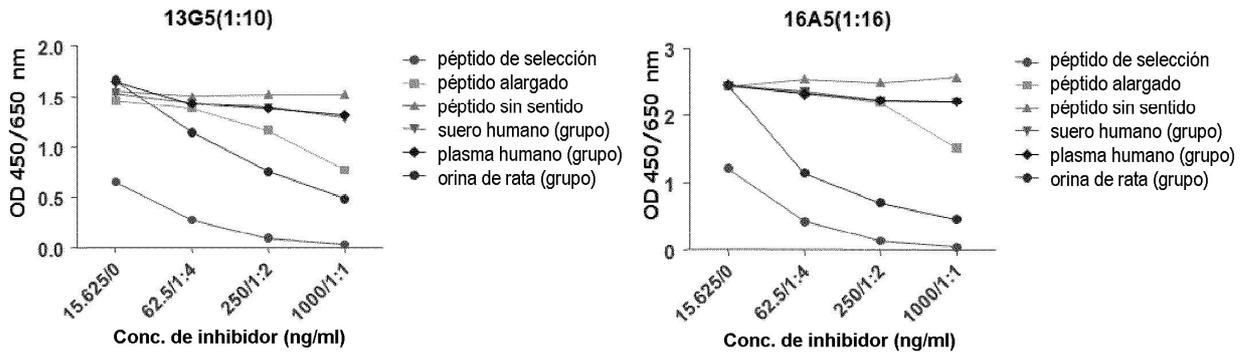


Figura 2

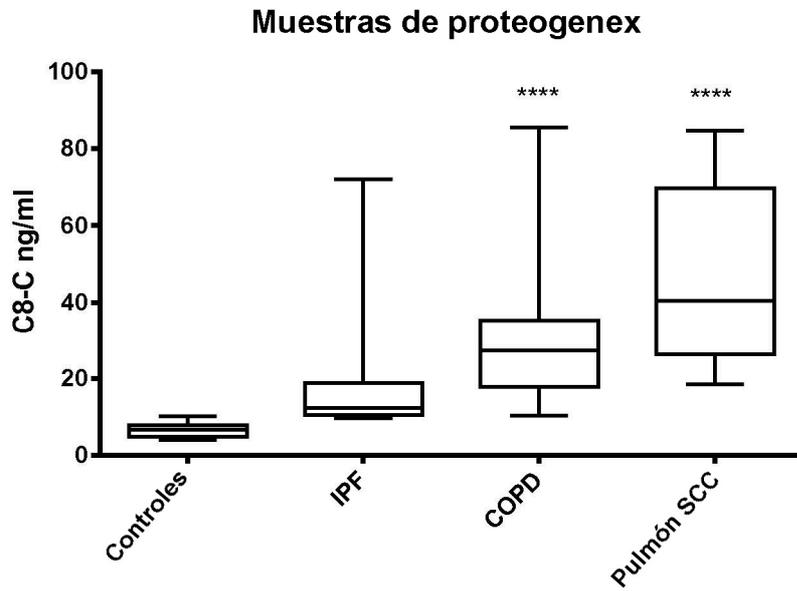


Figura 3

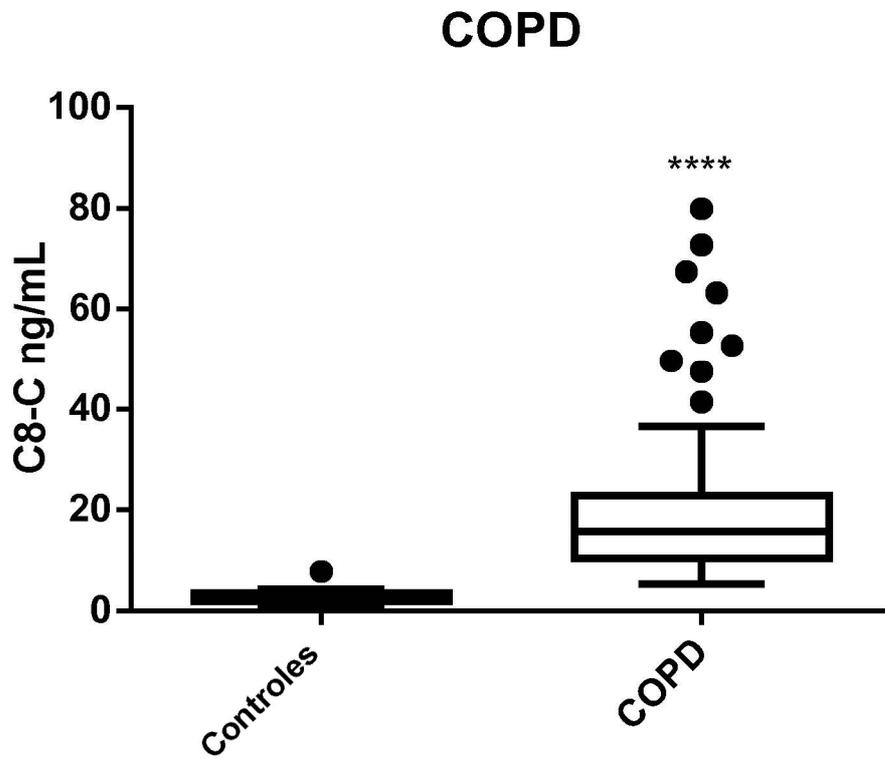


Figura 4

