



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 271 892**

(51) Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/536** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04734663 .0**

(86) Fecha de presentación : **25.05.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1631826**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.03.2006**

(54) Título: **Uso de la proteína MASP como marcador para el cáncer colorrectal.**

(30) Prioridad: **26.05.2003 EP 03011158**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2007**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2007**

(73) Titular/es: **F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.**  
**Grenzacherstrasse 124**  
**4070 Basel, CH**

(72) Inventor/es: **Berndt, Peter;**  
**Hagmann, Marie-Luise;**  
**Langen, Hanno;**  
**Palme, Stefan;**  
**Roessler, Markus;**  
**Rollinger, Wolfgang;**  
**Tacke, Michael;**  
**Zolg, Werner y**  
**Karl, Johann**

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

**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

Uso de la proteína MASP como marcador para el cáncer colorrectal.

5 La presente invención está relacionada con el diagnóstico del cáncer colorrectal. Revela el uso de la proteína MASP (precursor maspin) en el diagnóstico del cáncer colorrectal. Además, está relacionada especialmente con un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de una muestra líquida, obtenida de un individuo por medición de MASP en dicha muestra. La medición de MASP puede, por ejemplo, ser utilizada en la detección o diagnóstico precoz del cáncer colorrectal.

10 El cáncer sigue siendo un gran reto para la salud pública a pesar del progreso en su detección y terapia. Entre los distintos tipos de cáncer, el cáncer colorrectal (CCR) es uno de los cánceres más frecuentes en el mundo occidental.

15 Cuando antes pueda ser detectado y diagnosticado el cáncer, mejor es la tasa global de supervivencia. Esto es especialmente cierto para el CCR. Los estadios avanzados del tumor tienen un mal pronóstico. Más de un tercio de los pacientes morirán por el progreso de la enfermedad durante los 5 años posteriores al diagnóstico, que corresponden a una tasa de supervivencia de aproximadamente un 40% para 5 años. El tratamiento habitual tan sólo cura a una proporción pequeña de los pacientes y claramente tiene los mejores efectos en aquellos pacientes diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad.

20 Al considerar al CCR como un problema de salud pública, es esencial que se desarrollen más medidas preventivas y de cribado efectivas para el cáncer colorrectal.

25 Los procedimientos de detección precoz disponibles actualmente para el cáncer colorrectal implican la utilización de pruebas para la detección de sangre en heces o procedimientos endoscópicos. Sin embargo, normalmente el tumor debe tener un tamaño considerable del tumor antes de que se detecte sangre fecal. La sensibilidad de las pruebas de detección de sangre oculta en las heces (prueba del guayaco) es aproximadamente del 26%, lo que significa que el 74% de los pacientes con lesiones malignas no se detectarán (Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 [1997] 41-55). La visualización de lesiones precancerosas y cancerosas representa la mejor estrategia para la detección precoz, pero la colonoscopia es invasiva y los costes, los riesgos y las complicaciones son significativos (Silvis, S.E., *et al.*, JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J.E., *et al.*, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F., *et al.*, J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133).

35 En los últimos años se ha informado de la existencia de una cantidad enorme de los llamados genes específicos del colon o incluso los llamados genes específicos del cáncer colorrectal. La inmensa mayoría de los correspondientes artículos de investigación o solicitud de patentes están basados en los datos obtenidos mediante análisis de pautas de expresión de RNA en tejido de colon (canceroso) frente a un tejido diferente o un tejido adyacente normal, respectivamente. Dichas estrategias se pueden englobar dentro las técnicas de detección de mRNA diferencial.

40 La patente WO 01/96390 debe ser mencionada y discutida como un ejemplo de los datos disponibles de técnicas de detección de mRNA. Esta solicitud describe y reivindica más de doscientos polinucleótidos aislados y los correspondientes polipéptidos como tales, así como su uso en la detección del CCR. Sin embargo, es de conocimiento general que las diferencias en las concentraciones de mRNA no se reflejan en las concentraciones de la correspondiente proteína. Un mRNA poco abundante puede codificar una proteína que se encuentra en grandes cantidades y un mRNA abundante puede codificar una proteína de detectar y encontrar. Esta falta de correlación entre el nivel de mRNA y el nivel de proteína se debe a motivos como: estabilidad del mRNA, eficiencia de traducción, estabilidad de la proteína, etc.

50 Asimismo, existen estrategias actuales que investigan diferencias en las pautas de expresión de proteínas entre diferentes tejidos o entre tejidos sanos y enfermos para identificar las moléculas marcadoras candidatas que se podrían utilizar para el diagnóstico del CCR. Brünagel, G., *et al.*, Cancer Research 62 (2002) 2437-2442 han identificado siete proteínas de la matriz nuclear que parecen ser más abundantes en tejido con CCR cuando se comparan con tejido adyacente normal. No se ha informado de la existencia de datos procedentes de muestras líquidas obtenidas de un solo individuo.

55 La patente WO 02/078636 informa sobre nueve spots asociados a cáncer colorrectal detectados mediante espectroscopía de desorción/ionización de láser superficie-realzada (SELDI). Estos spots se observan más frecuentemente en muestras de suero de pacientes con CCR cuando se comparan con sueros obtenidos de controles sanos. No obstante, se desconoce la identidad de la(s) molécula(s) incluidas en ese spot, como p. ej., su secuencia.

60 A pesar de la larga y creciente lista de marcadores de proteínas candidatas en el campo del CCR, hasta el momento se desconoce la utilidad clínica y diagnóstica de estas moléculas. Para que un nuevo marcador diagnóstico sea de utilidad clínica como un marcador único como mínimo debe ser tan bueno como el mejor marcador único ya conocido en su campo. O, un nuevo marcador debería suponer una mejora de la sensibilidad o la especificidad del diagnóstico ya sea utilizado solo o en combinación con uno o más marcadores, respectivamente. La sensibilidad o especificidad del diagnóstico de una prueba se valora mejor por sus características de funcionamiento del receptor, las cuales serán descritas en detalle a continuación.

En la actualidad, únicamente están disponibles análisis de sangre basados en la detección de antígeno carcinoembrionario (ACE), una glicoproteína asociada a tumores, para ayudar al diagnóstico en el campo del CCR. El ACE se encuentra elevado en el 95% de las muestras de tejidos obtenidas de pacientes con cáncer colorrectal, gástrico, y pancreático; y en la mayoría de carcinomas de pecho, pulmón, cabeza y cuello (Goldenberg, D.M., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22). También se han detectados niveles elevados de ACE en pacientes con enfermedad no cancerosa y muchos pacientes con cáncer colorrectal tienen niveles normales de ACE en el suero, especialmente, durante el estadio inicial de la enfermedad (Carriquiry, L.A., and Pineyro, A., Dis. Colon Rectum 42 (1999) 921-929; Herrera, M.A., *et al.*, Ann. Surg. 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J., *et al.*, N. Engl. J. Med. 299 (1978) 448-451). Según se ha informado, la utilidad de la medición del ACE en suero o plasma para la detección de recurrencias es un tema polémico y todavía debe ser aplicado ampliamente (Marteil, R. E., *et al.*, mt. J. Biol. Markers 13 (1998) 145-149; Moertel, C.G., *et al.*, JAMA 270 (1993) 943-947).

Si se consideran los datos disponibles, la determinación en suero del ACE no posee sensibilidad ni especificidad suficiente para permitir su uso como una prueba de cribado para cáncer colorrectal en la población asintomática. (Reynoso, G., *et al.*, JAMA 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., Clinical Chemistry 48 (2002) 1151-1159).

La sangre total, el suero o el plasma son las fuentes de muestras más ampliamente utilizadas en la práctica clínica rutinaria. La identificación de un marcador de tumor de CCR inicial que permitiese la detección fiable del cáncer o aportase información sobre el pronóstico inicial podría significar el desarrollo de una prueba diagnóstica que podría ayudar enormemente en el diagnóstico y en el tratamiento de esta enfermedad. Por tanto, existe una necesidad clínica urgente para mejorar el diagnóstico del CCR a partir de las muestras de sangre. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico temprano del CCR, ya que las posibilidades de sobrevivir son mucho mayores para aquellos pacientes diagnosticados en los estadios iniciales de la enfermedad que para los diagnosticados en estadios avanzados.

El objetivo de la presente invención era investigar si se puede identificar un nuevo marcador y que éste pueda ayudar en el diagnóstico del CCR.

Sorprendentemente, se ha averiguado que el uso de la proteína MASP puede al menos superar parcialmente los problemas conocidos hasta el momento.

La presente invención, por tanto, se refiere a un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que consta de los siguientes pasos: a) aportar una muestra líquida obtenida de un individuo; b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específico para MASP bajo las condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de unión y MASP; y c) correlacionar la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico de cáncer colorrectal. Un método preferido utiliza una muestra líquida obtenida de un individuo.

Otra realización preferida de la invención es un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que consta de los siguientes pasos: a) poner en contacto una muestra líquida obtenida de un individuo con un agente de unión específico para MASP bajo las condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de unión y MASP; y b) correlacionar la cantidad de complejo formado en a) con el diagnóstico de cáncer colorrectal.

Como el experto en la materia puede apreciar, cualquier diagnóstico de este tipo se hace *in vitro*. La muestra del paciente se descarta posteriormente. La muestra del paciente únicamente se utiliza para el método de diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de nuevo al cuerpo del paciente. Normalmente, la muestra es líquida.

La proteína MASP (precursor maspin; Swiss-PROT: P36952) se caracteriza por la secuencia dada en SEQ ID NO: 1. El cDNA maspin humano clonado codifica una proteína de 42 kDa que homóloga a la superfamilia serpin de inhibidores de proteasa. Estudios de inmunotinción demuestran que maspin se encuentra en la matriz extracelular y en la membrana plasmática (Zou, Z., *et al.*, Science 263 (1994) 526-529).

El gen MASP humano (SERPINB5 de PI5) se aisló originalmente del epitelio mamario normal mediante hibridación sustractiva en base a su expresión a nivel de mRNA (Zou *et al.*, *supra*). Maspin se expresaba en células epiteliales mamarias normales pero no en la mayoría de líneas celulares de carcinoma mamario. Zou *et al.* (*supra*) mostró que su expresión reduce la capacidad de las células transformadas de inducir la formación de tumores y metástasis, sugiriendo que el gen maspin codifica un supresor tumoral.

Bass, R., *et al.* (J. Biol. Chem. 277 (2002) 46845-46848) caracterizó el maspin eucariótico y descubrió que no presentaba un efecto inhibidor de proteasa frente a ninguno de los sistemas proteolíticos analizados. Sin embargo, inhibió la migración tanto de tumores como de células del músculo liso vascular.

Song, S.Y., *et al.* (Digestive Diseases and Sciences 47 (2002) 1831-1835) estudió la expresión de maspin en cánceres de colon mediante tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido de adenomas, adenocarcinomas y adenocarcinomas metastáticos. La inmunorreactividad de maspin descubierta por Song *et al.* (*supra*) era citoplasmática, con algo de tinción nuclear. Más del 90% de cortes histológicos de tejidos de adenomas, el 75% de adenocarcinomas y el 47% de carcinomas metastáticos presentaron tinción positiva para maspin. Este estudio presentaba la limitación de no utilizar ningún sistema de ensayo cuantitativo, como el análisis de transferencia western (western blot). No se valoró el nivel de expresión en comparación con tejido de colon normal adyacente.

Como es obvio para el experto en la materia, la presente invención no se debe considerarse limitada a la longitud completa de la proteína MASP de SEQ ID NO: 1. La presente invención también abarca fragmentos de MASP fisiológicos o artificiales, modificaciones secundarias de MASP, así como variantes alélicas de MASP. Los fragmentos artificiales preferentemente abarcan un péptido producido sintéticamente o por técnicas recombinantes, que constan de al menos un epítipo de interés diagnóstico consistente en al menos 6 aminoácidos contiguos que se obtienen de la secuencia presentada en SEQ ID NO: 1. Tal fragmento puede ser utilizado ventajosamente para la generación de anticuerpos o como un estándar en un inmunoensayo. Es aún más preferible que el fragmento artificial conste de al menos dos epítipos de interés apropiados para diseñar un inmunoensayo de tipo sándwich.

En realizaciones preferidas, el marcador novedoso MASP se puede utilizar para monitorizar así como para el cribado.

Cuando el método diagnóstico de acuerdo con la presente invención se utiliza en monitorización de pacientes puede ayudar a valorar la carga tumoral, la eficacia del tratamiento y la recurrencia del tumor en el seguimiento de los pacientes. Niveles elevados de MASP están directamente relacionados con la carga tumoral. Después de la quimioterapia un incremento de MASP a corto plazo (desde unas pocas horas hasta 14 días) puede servir como un indicador de la muerte de las células tumorales. En el seguimiento de los pacientes (desde 3 meses hasta 10 años) se puede utilizar un incremento de MASP como indicador de recurrencia tumoral.

En una realización preferida el método de diagnóstico de acuerdo con la presente invención se utiliza para la realización de cribados. P. ej. se utiliza para evaluar individuos sin un diagnóstico previo de CCR mediante la medición del nivel de MASP y la correlación del nivel medido con la presencia o ausencia de CCR.

El cáncer colorrectal con mucha frecuencia evoluciona de adenomas (pólipos) a carcinomas malignos. Los diferentes estadios del CCR normalmente se clasificaban de acuerdo con la clasificación de Duke de los estadios A a D.

El estadiaje del cáncer consiste en la clasificación de la enfermedad en función de la extensión, la progresión y la gravedad. Agrupa a los pacientes con cáncer de manera que se pueden hacer generalizaciones sobre el pronóstico y la selección del tratamiento.

Actualmente, el sistema TNM es la clasificación más ampliamente utilizada de la extensión anatómica de cáncer. Representa un sistema uniforme de estadiaje aceptado internacionalmente. Hay tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estado de los nódulos linfáticos regionales) y M (presencia o ausencia de metástasis distantes). Los criterios TNM están publicados por la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer), Sobin, LH., Wittekind, Ch. (eds): TNM Classification of Malignant Tumours, fifth edition, 1997).

Lo realmente importante es que el diagnóstico precoz del CCR supone un pronóstico mucho mejor. Los tumores malignos colorrectales surgen de tumores benignos, p. ej. de adenomas. Por tanto, el mejor pronóstico lo tienen aquellos pacientes diagnosticados en el estadio de adenoma. Los pacientes diagnosticados en estadios tan iniciales como T<sub>is</sub>, N0, M0 o T1-3; N0; M0, si se tratan apropiadamente tienen más del 90% de probabilidad de supervivencia 5 años después del diagnóstico en comparación con la tasa de supervivencia a 5 años de sólo el 10% para los pacientes diagnosticados cuando las metástasis distantes ya están presentes.

En el sentido de la presente invención el diagnóstico precoz del CCR se refiere al diagnóstico en un estadio pre-maligno (adenoma) o en un estadio tumoral en el que no hay ninguna metástasis (ni proximal ni distal), p. ej., adenoma, T<sub>is</sub>, N0, M0 o T1-4; N0; M0 están presentes. T<sub>is</sub> indica carcinoma *in situ*.

En una realización preferida la detección de MASP se utiliza para diagnosticar el CCR tan temprano como en el estadio de adenoma.

Es aún más preferido que el CCR se diagnostique cuando todavía no ha crecido completamente a través de la pared intestinal y de este modo ni el peritoneo visceral está perforado ni otros órganos o estructuras son invadidos, p. ej., que el diagnóstico se haga en cualquier estadio desde T<sub>is</sub>; N0; M0 a T3; N0; M0 (=T<sub>is</sub>-3; N0; M0).

El método de diagnóstico de acuerdo con la presente invención se basa en una muestra líquida que se ha obtenido de un individuo. A diferencia de los métodos conocidos en este ámbito, MASP se mide específicamente en esta muestra líquida mediante el uso de un agente de unión específico.

Un agente de unión específico es, p. ej., un receptor para MASP, una lectina unida a MASP o un anticuerpo unido a MASP. Un agente de unión específico debe tener al menos una afinidad de 10<sup>7</sup> l/mol por su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico preferiblemente tiene una afinidad de 10<sup>8</sup> l/mol o, es incluso más preferible, 10<sup>9</sup> l/mol por su molécula diana. Como el experto en la materia apreciará, el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unirán de manera significativa con el agente de unión específico para MASP. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula diferente a la molécula diana da como resultado una afinidad de unión de solo un 10%, más preferiblemente el 5% de la afinidad de la molécula diana o menos. Un agente de unión específico más preferido cumplirá los dos criterios mínimos anteriores para la afinidad así como para la especificidad.

Un agente de unión específico es preferiblemente un anticuerpo reactivo con MASP. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como a construcciones genéticas que consten del dominio de unión de un anticuerpo.

5 El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de dichos anticuerpos, así como a construcciones genéticas que consten del dominio de unión de un anticuerpo. Se puede utilizar cualquier fragmento de anticuerpo que cumpla los criterios anteriores de un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan por procedimientos novedosos en el ámbito, p. ej., como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990) el libro completo, sobretudo las páginas 43-78; Elsevier, Amsterdam).  
 10 Además, el experto en la materia es bien consciente de que los métodos basados en inmunosorbentes pueden ser utilizados para el aislamiento específico de anticuerpos. De esa manera, la calidad de los anticuerpos policlonales y, por tanto, su función en inmunoensayos puede mejorarse. (Tijssen, P., *supra*, págs. 108-115).

15 Para los logros que se presentan en la presente invención se utilizaron anticuerpos policlonales producidos en conejos. Sin embargo, claramente se pueden utilizar también los anticuerpos policlonales de diferentes especies, p. ej. ratas o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales se pueden obtener en cualquier cantidad que se necesite con propiedades constantes, representan las herramientas ideales para el desarrollo de un ensayo clínico rutinario. La producción y el uso de anticuerpos monoclonales para MASP en un método de acuerdo con la presente invención es otra realización preferida más.

20 Como el experto en la materia apreciará ahora que MASP ha sido identificada como un marcador útil en el diagnóstico de CCR, se pueden utilizar maneras alternativas para conseguir un resultado comparable a los logros de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias incluyen, entre otras, el uso de péptidos sintéticos que representen un epítipo de MASP para la inmunización.  
 25 Alternativamente, se puede utilizar la inmunización genética también conocida como vacuna de DNA.

Para la medición, la muestra líquida obtenida de un individuo se incuba con el agente específico de unión a MASP bajo las condiciones apropiadas para la formación del complejo MASP-agente de unión. Tales condiciones no necesitan ser especificadas, ya que el experto en la materia sin ningún esfuerzo imaginativo puede identificar fácilmente dichas condiciones apropiadas de incubación.

30 Como paso final, de acuerdo con el método presentado en la presente invención, la cantidad de complejo se mide y correlaciona con el diagnóstico de CCR. Como el experto en la materia apreciará hay numerosos métodos para medir la cantidad de complejo MASP-agente específico de unión todos descritos en detalle en libros de texto relevantes (cf., p. ej., Tijssen P., *supra*, or Diamandis, *et al.*, eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston).

Preferiblemente, MASP se detecta con un ensayo tipo sándwich. En dicho ensayo, un primer agente de unión específico se utiliza para capturar MASP por un lado y un segundo agente de unión específico, que está marcado para ser detectado directa o indirectamente, se utiliza por el otro lado.

40 Como se menciona anteriormente, sorprendentemente se ha descubierto que se puede medir MASP a partir de una muestra líquida obtenida de una muestra individual. Para la aplicación del marcador MASP en el diagnóstico del CCR, no son necesarias muestras de tejido ni biopsia.

45 En una realización preferida el método de acuerdo con la presente invención se pone en práctica con suero como muestra líquida.

En una realización más preferida el método de acuerdo con la presente invención se pone en práctica con plasma como muestra líquida.

50 En una realización aún más preferida el método de acuerdo con la presente invención se pone en práctica con sangre total como muestra líquida.

Además las deposiciones pueden prepararse de varias maneras conocidas por el experto en la materia para dar como resultado también una muestra líquida. Dicha muestra líquida derivada de las deposiciones también representa una realización preferida de acuerdo con la presente invención.

60 Mientras que la aplicación de métodos proteómicos rutinarios a las muestras de tejido conduce a la identificación de muchos candidatos marcadores potenciales para el tejido seleccionado, los creadores de la presente invención han sido capaces, sorprendentemente, de detectar proteína MASP en una muestra de fluido corporal. Es incluso más sorprendentemente el hecho de que ellos han sido capaces de demostrar que la presencia de MASP en dicha muestra líquida obtenida de un individuo puede ser correlacionada con el diagnóstico de cáncer colorrectal.

Se pueden utilizar, con enormes ventajas, anticuerpos para MASP en procedimientos establecidos, p. ej., para la detección de células de cáncer colorrectal *in situ*, en biopsias o en procedimientos inmunohistológicos.

Preferiblemente, un anticuerpo para MASP se utiliza en un inmunoensayo cualitativo (presencia o ausencia de MASP) o cuantitativo (cantidad de MASP determinada).

Se ha demostrado que la medición del nivel de proteína MASP es muy ventajosa para el campo del CCR. Por tanto, en una realización más preferida, la presente invención se refiere al uso de la proteína MASP como una molécula marcadora en el diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

- 5 El término molécula marcadora se utiliza para indicar que un nivel elevado del analito MASP, cuando se mide en el fluido corporal de un individuo, marca la presencia de CCR.

Es especialmente preferido utilizar el marcador novedoso MASP en el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal.

- 10 El uso de MASP en sí mismo representa un progreso significativo en el desafiante campo del diagnóstico del CCR. Combinar la medida de MASP con otros marcadores conocidos, como ACE, o con otros marcadores de CCR todavía por descubrir, lleva a más mejoras. Por tanto, en una realización más preferida la presente invención se refiere al uso de MASP como una molécula marcadora para cáncer colorrectal en combinación con una o más moléculas marcadoras para cáncer colorrectal en el diagnóstico de esta enfermedad a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.
- 15 En ese sentido, la expresión “una o más” indica de 1 a 10, preferiblemente de 1 a 5, más preferiblemente 3. Otros marcadores preferidos de CCR seleccionados con los cuales se puede combinar la medida de MASP son ACE, CA 19-9, CA 72-4 y CA 242. De este modo, una realización mucho más preferida de la presente invención es el uso de la proteína MASP como una molécula marcadora para el cáncer colorrectal en combinación con una o más moléculas marcadoras para el cáncer colorrectal en el diagnóstico de cáncer colorrectal a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo, en la que al menos la otra molécula marcadora se selecciona del grupo compuesto por ACE, CA 19-9, CA 72-4, y CA 242.

- Los reactivos para el diagnóstico en el campo de los ensayos de unión específica, como los inmunoensayos, normalmente se proporcionan mejor en forma de kit, el cual consta del agente de unión específico y los reactivos auxiliares necesarios para realizar el ensayo. La presente invención, por tanto, también hace referencia a un equipo inmunológico que consta de al menos un agente de unión específico para MASP y reactivos auxiliares para la medida de MASP.

- La exactitud de una prueba se describe mejor por las características de su curva ROC (del inglés, *receiver-operating characteristics*) (ver especialmente Zweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577).

- 30 El gráfico ROC es un diagrama de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo de todo el rango de datos observados.

- La utilidad clínica de una prueba analítica depende de su precisión en el diagnóstico o de su capacidad para clasificar correctamente a los individuos en subgrupos clínicos relevantes. La precisión en el diagnóstico mide la capacidad de la prueba para distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Tales condiciones son, por ejemplo, la salud frente a la enfermedad o la enfermedad benigna frente a la maligna.

- En cada caso, la curva ROC representa la superposición entre las dos distribuciones mediante la representación de la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el rango completo del umbral de decisión. En el eje Y se observa la sensibilidad, o la fracción verdadero-positivo [definida como (número de resultados de prueba verdadero-positivo)/(número de resultados de prueba verdadero-positivo + número de resultados de prueba falso-negativo)]. Esto también puede expresarse como positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente para el subgrupo afectado. En el eje X está la fracción falso-positivo, o 1 - especificidad [definida como (número de resultados falso-positivo)/(número de verdadero-negativo + número de resultados falso-positivo)]. Se trata de un índice de especificidad y se calcula únicamente a partir del subgrupo no afectado. Dado que las fracciones verdadero-positivo y falso-positivo se calculan totalmente por separado mediante la utilización de resultados de pruebas de dos subgrupos diferentes, la curva ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en la curva ROC representa un par de sensibilidad/especificidad correspondiente a un umbral de decisión concreto. Una prueba con discriminación perfecta (no superposición en las dos distribuciones de resultados) presenta una curva ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde la fracción verdadero positivo es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción falso positivo es 0 (especificidad perfecta). El diagrama teórico para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos) es una línea en diagonal de 45° que discurre desde la esquina inferior izquierda hasta la esquina superior derecha. La mayoría de trazos se encuentran entre estos dos extremos. (Si el trazo ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, se puede resolver fácilmente por reversión del criterio para “positividad” de “mayor que” a “menor que” o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cerca está el trazo de la esquina superior izquierda, más elevada será la precisión de la prueba.

- Para cuantificar la precisión del diagnóstico de una prueba analítica, es una meta oportuna la expresión de sus resultados mediante un único número. La medida global más común es el área bajo la curva ROC. Por convenio, esta área es siempre  $\geq 0,5$  (si no lo es, se puede revertir la regla de decisión para que lo sea). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de las pruebas de los dos grupos) y 0,5 (no hay diferencia de distribución aparente entre los valores de las pruebas de los dos grupos). El área no depende de una parte concreta del trazo únicamente como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90% de especificidad, sino del trazo completo. Esto es una expresión cuantitativa y descriptiva de como es de cercano la curva ROC al trazo perfecto (área=1,0).

Se ha evaluado la utilidad clínica del marcador novedoso MASP en comparación con el marcador establecido ACE y en combinación con él utilizando un análisis de la curva ROC (ROC; Zweig, M. H., and Campbell, G., Clin. Chem.

39 (1993) 561-577). Este análisis se ha basado en cohortes de pacientes bien definidas consistentes en 50 muestras cada una de pacientes T1-3; N0; M0, tumores más avanzados, p. ej., T4 y/o metástasis de diversa gravedad (N+ y/o M+), y controles sanos, respectivamente.

- 5 El método de diagnóstico basado en la medida de MASP solo en comparación con el marcador establecido ACE ha resultado tener al menos una precisión de diagnóstico tan buena (perfil de sensibilidad/especificidad) como se ha demostrado mediante el área bajo la curva.

10 Se presentan los siguientes ejemplos, referencias, listado de secuencias y figuras para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de aplicación de la cual se establece posteriormente en las reivindicaciones adjuntas. Se entiende que las modificaciones se pueden realizar en los procedimientos establecidos posteriormente sin desviarse del espíritu de la invención.

### Descripción de las Figuras

15 Figura 1

La figura 1 muestra un ejemplo típico de gel en 2D, cargado con una muestra de tumor (lado izquierdo), y un gel, cargado con una muestra control emparejada (lado derecho) obtenida de mucosa sana adyacente. El peso molecular aparente y el punto isoeléctrico de MASP corresponden a los valores teóricos aproximados de 40 kDa y 5,98, respectivamente. El círculo en la sección engrandecida de estos geles indica la posición para la proteína MASP. Esta proteína no se detectó mediante el mismo método en mucosa sana.

25 Figura 2

La figura 2 muestra un ejemplo típico de transferencia Western. El gel se cargó con lisados de tejido de tumor colorrectal y tejido control sano adyacente de 4 pacientes (sujeto 36: carcinoma de recto, Dukes B; sujeto 37: carcinoma de recto, Dukes A; sujeto 39: carcinoma de colon, Dukes A; y sujeto 40: carcinoma de colon, Dukes B). La presencia de MASP en las muestras se analizó utilizando un suero anti-MASP policlonal de conejo. Los carriles que contienen lisados de tumor se indican como "T", los carriles que contienen tejido control normal se indican como "N". El carril marcador que contiene un estándar de pesos moleculares de proteína se indica como "Ma". Los carriles que contienen MASP recombinante a diferentes concentraciones se indican como "300", "1000" y "3000". La flecha indica la posición en el gel de la banda MASP. Todas las muestras de tumor dan como resultado una fuerte señal en la posición de MASP, mientras que sólo se detecta una señal débil en los lisados de tejido control normal adyacente. Esta sobreexpresión tan fuerte de MASP en tejido tumoral de pacientes con cáncer colorrectal se encuentra en 13 de los 13 sujetos examinados.

### Abreviaciones

|    |       |                                                                  |
|----|-------|------------------------------------------------------------------|
| 40 | ABTS  | sal de diamonio 2,2'-Azino-di-[3-etilbenztiazolina sulfonato(6)] |
|    | BSA   | albúmina sérica bovina                                           |
|    | cDNA  | DNA complementario                                               |
| 45 | CHAPS | (3-[(3-Colamidopropil)-dimetilamonio]-1-propan-sulfonato)        |
|    | DMSO  | dimetil sulfóxido                                                |
| 50 | DO    | densidad óptica                                                  |
|    | DTT   | ditiotreititol                                                   |
|    | EDTA  | ácido etileno diamino tetracético                                |
| 55 | ELISA | inmunoensayo enzimático sobre fase sólida                        |
|    | HRP   | peroxidasa de rábano picante                                     |
| 60 | IAA   | iodacetamida                                                     |
|    | IgG   | inmunoglobulina G                                                |
|    | IEF   | enfoque isoeléctrico                                             |
| 65 | IPG   | gradiente de pH inmovilizado                                     |

## ES 2 271 892 T3

|           |                                                                                                                                 |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| LDS       | dodecil sulfato de litio                                                                                                        |
| MALDI-TOF | espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo |
| 5 MES     | mesitol,2,4,6-trimetilfenil                                                                                                     |
| PAGE      | electroforesis en gel de poliacrilamida                                                                                         |
| 10 PBS    | tampón fosfato salino                                                                                                           |
| PI        | punto isoeléctrico                                                                                                              |
| RTS       | sistema rápido de traducción                                                                                                    |
| 15 SDS    | dodecil sulfato sódico                                                                                                          |

### Ejemplo 1

#### 20 *Identificación de MASP como un marcador potencial de cáncer colorrectal*

##### *Fuentes de tejido*

Para identificar las proteínas específicas de tumores como marcadores diagnósticos potenciales para el cáncer colorrectal, se realiza el análisis de tres tipos diferentes de tejido utilizando métodos proteómicos.

En total, se analizan muestras de tejido de 10 pacientes que padecen cáncer colorrectal. De cada paciente se recogen tres tipos de tejido diferentes de resecciones terapéuticas: tejido tumoral (>80% de tumor) (T), tejido sano adyacente (N) y mucosa extraída de zonas sanas adyacentes (M). Los dos últimos tipos de tejido sirven como muestras control sanas emparejadas. Los tejidos son inmediatamente congelados de forma rápida después de la resección y almacenados a -80°C antes del procesamiento. Los tumores se diagnostican mediante criterios histopatológicos.

##### *Preparación del tejido*

Se ponen en un mortero 0,8-1,2 g de tejido congelado y se congelan completamente con nitrógeno líquido. El tejido se pulveriza en el mortero, se disuelve 10 veces en un volumen (p/v) de tampón de lisis (40 mM Na-citrato, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Genapol X-080, 0,02% Na-azida, Complete® EDTA-free [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Núm. Cat. 1 873 580]) y posteriormente se homogeneiza en un homogeneizador de vidrio Wheaton® (20 x ajuste amplio, 20 ajuste estrecho). Se someten 3 ml del homogeneizado a una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa (10-60% sacarosa) durante 1 hora a 4.500 x g. Después de esta centrifugación se obtienen tres fracciones. La fracción superior del gradiente contiene las proteínas solubles y se utiliza para análisis posteriores.

##### *Enfoque isoeléctrico (IEF) y SDS-PAGE*

Para IEF, se mezclan 3 ml de la suspensión con 12 ml de tampón de muestra (7 M urea, 2 M tiourea, 2% CHAPS, 0,4% tampón IPG pH 4-7, 0,5% DTT) y se incuban durante 1 hora. Las muestras se concentran en un dispositivo Amicon® Ultra-15 (Mifflipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y la concentración de proteína se determina utilizando el ensayo de proteínas BioRad® (Núm. Cat. 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual del distribuidor. Se añade tampón a un volumen correspondiente a 1,5 mg de muestra de proteína hasta un volumen final de 350 µl. Esta solución se utiliza para rehidratar las tiras IPG a pH 4-7 (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) durante toda la noche. La IEF se realiza utilizando el siguiente protocolo de gradiente: 1.) 1 minuto a 500 V; 2.) 2 horas a 3.500 V; 3.) 22 horas a 3.500 V constantes hasta llegar a 82 kVh. Después de la IEF, las tiras se almacenan a -80°C o se utilizan directamente para la SDS-PAGE.

Antes del SDS-PAGE, se incuban las tiras en tampón de equilibrio (6 M urea, 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 30% glicerol, 2% SDS), para reducción se añade DTT (15 minutos, + 50 mg DTT/10 ml), y para alquilación se añade IAA (15 minutos, + 235 mg iodacetamida/10 ml). Las tiras se introducen en un gel de poliacrilamida al 12,5% y se someten a electroforesis a 1 W/gel durante 1 hora y entonces a 17 W/gel. Posteriormente, los geles se fijan (50% metanol, 10% acetato) y se tiñen durante la noche con un kit Novex™ Coloidal Blue Staining (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, Núm. Cat. LC6025, 45-15 7101).

##### *Detección de MASP como un marcador potencial para el cáncer colorrectal*

Cada paciente se analiza por separado por análisis de imagen con el software ProteomeWeaver® (Definiens AG, Alemania, München). Además, todas las bandas del gel se extraen con un robot que las selecciona y las proteínas presentes en las bandas se identifican mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente, se comparan 4 geles de la muestra de tumor con 4 geles



cada uno de tejido adyacente normal y tejido extraído de mucosa y se analizan para distintas bandas correspondientes a proteínas expresadas de manera distinta. Con esto, quiere decir que se ha descubierto que la proteína MASP se expresa específicamente o se sobreexpresa fuertemente en tejido tumoral y no se detecta o se expresa en menor medida en tejido control sano. Por tanto - entre muchas otras proteínas - se considera como un marcador candidato para su uso en el diagnóstico del cáncer colorrectal.

## Ejemplo 2

### *Generación de anticuerpos para la proteína marcadora en cáncer colorrectal MASP*

El anticuerpo policlonal para la proteína marcadora en cáncer colorrectal MASP se genera para el uso posterior del anticuerpo en la medida de niveles de MASP en suero y plasma y sangre mediante ensayos de inmunodetección, p. ej. Western Blotting y ELISA.

### *Expresión de proteína recombinante en *E. coli**

Para generar anticuerpos para MASP, la expresión recombinante de la proteína tiene lugar para obtener inmunogenes. La expresión se realiza aplicando una combinación del sistema de expresión RTS 100 y *E. coli*. En un primer paso, se analiza la secuencia de DNA y se obtienen recomendaciones para producir de manera elevada variantes de mutaciones silenciosas de cDNA y las respectivas secuencias PCR-cebador utilizando el sistema "ProteoExpert RTS *E. coli* HY". Esto es un servicio basado en una web comercial ([www.proteoexpert.com](http://www.proteoexpert.com)). Utilizando los primeros pares recomendados, el sistema "RTS 100 *E. coli* Linear Template Generation Set, His-tag" (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Cat. No. 3186237) para generar moldes lineales para PCR a partir del cDNA y se utiliza para la transcripción *in vitro* y la expresión de la secuencia codificante del nucleótido para la proteína MASP. Para la detección Western-blot y posterior purificación, la proteína expresada contiene una etiqueta de His. La mejor variante de expresión se identifica. Todos los pasos desde la PCR hasta la expresión y detección tienen lugar de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El respectivo producto de PCR, que contiene todas las regiones reguladoras T7 necesarias (promotor, sitio de unión ribosomal y terminador T7) se clona en el vector pBAD TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, CaL No. K 4300/01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la expresión utilizando las secuencias reguladoras T7, la construcción se transforma en *E. coli* BL 21 (DE 3) (Studier, F.W., *et al.*, Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89) y las bacterias transformadas se cultivan en un fermentador de 1 l para la expresión de proteínas.

La purificación de la proteína de fusión His-MASP se realiza siguiendo procedimientos estándar en una columna de Ni-quelante. En resumen, 1 l de cultivo de bacterias que contienen el vector de expresión para la proteína de fusión His-MASP es sedimentado por centrifugación. El sedimento celular se resuspende en tampón de lisis, conteniendo fosfato, pH 8,0, cloruro de guanidio 7 M, imidazol y tioglicerol, seguido de homogeneización utilizando un UltraTurrax®. El material insoluble se sedimenta por centrifugación de alta velocidad y el sobrenadante se introduce en una columna cromatográfica de Ni-quelante. La columna se lava con varios volúmenes de tampón de lisis seguido por lavados con tampón, que contiene fosfato, pH 8,0 y Urea. Finalmente, el antígeno unido se diluye utilizando un tampón de fosfato que contiene SDS bajo condiciones ácidas.

### *Producción de anticuerpos monoclonales contra MASP*

#### *a) Inmunización de ratones*

Ratones A/J de 12 semanas de edad son inicialmente inmunizados intraperitonealmente con 100 µg de MASP. Al cabo de 6 semanas se hacen dos inmunizaciones intraperitoneales más en intervalos mensuales. En este proceso a cada ratón se le administran 100 µg de MASP adsorbida a hidróxido de aluminio y 10<sup>9</sup> gérmenes de *Bordetella pertussis*. Posteriormente las dos últimas inmunizaciones se realizan por vía intravenosa en el 3º y 2º día antes de la fusión utilizando 100 µg de MASP en tampón PBS para cada una.

#### *b) Fusión y clonación*

Las células esplénicas de los ratones inmunizados de acuerdo con a) se funden con células de mieloma de acuerdo con Gaifre, G., and Milstein, C., Methods in Enzymology 73 (1981) 3-46. En este proceso alrededor de 1\*10<sup>8</sup> células esplénicas del ratón inmunizado se mezclan con 2x10<sup>7</sup> células de mieloma (P3X63-Ag8-653, ATCC CR11580) y se centrifugan (10 minutos a 300 g y 4°C). Entonces las células se lavan una vez con medio RPMI 1640 sin suero fetal bovino (FCS) y se centrifugan de nuevo a 400 g en un tubo cónico de 50 ml. El sobrenadante se descarta, el sedimento de células se libera con cuidado mediante golpes suaves, se añade 1 ml de PEG (peso molecular 4000, Merck, Darmstadt) y se mezcla mediante pipeteo. Después de 1 minuto en un baño de agua a 37°C, se añaden gota a gota 5 ml de RPMI 1640 sin FCS a temperatura ambiente durante un período de 4-5 minutos. Posteriormente se añaden gota a gota 5 ml de RPMI 1640 que contienen un 10% de FCS durante alrededor de 1 minuto, se mezcla generosamente, se llena hasta 50 ml con medio (RPMI 1640 + 10% FCS) y posteriormente se centrifuga durante 10 minutos a 400 x g y 4°C. Las células sedimentadas se recogen en medio RPMI 1640 que contiene un 10% de FCS y se siembran en un medio de selección hipoxantina-azaserina (100 mmol/l hipoxantina, 1 µg/ml azaserina en RPMI 1640 + 10% FCS). Se añade interleucina 6 a 100 U/ml al medio como factor de crecimiento.

## ES 2 271 892 T3

Después de alrededor de 10 días los cultivos primarios se analizan para anticuerpos específicos. Los cultivos primarios positivos de MASP se clonan en placas de cultivo de células de 96 pocillos por medio de un clasificador de células activado por fluorescencia. En este proceso de nuevo se añade interleucina 6 a 100 U/ml al medio como un aditivo de crecimiento.

### c) Aislamiento de inmunoglobulinas del sobrenadante del cultivo celular

Las células de hibridoma obtenidas se siembran en una densidad de  $1 \times 10^5$  células por ml en medio RPMI 1640 que contiene 10% de FCS y proliferaron durante 7 días en un fermentador. (Thermodux Co., Wertheim/Main, Model MCS-104XL, Order No. 144-050). A concentraciones promedio de 100  $\mu\text{g}$  por ml se obtienen anticuerpos monoclonales en el sobrenadante del cultivo. La purificación de estos anticuerpos del sobrenadante del cultivo se lleva a cabo mediante métodos convencionales en química de proteínas (p. ej. de acuerdo con Bruck, C., *et al.*, Methods in Enzymology 121 (1986) 587-695).

### Generación de anticuerpos policlonales

#### a) Inmunización

Para la inmunización, se prepara una emulsión fresca de la solución de proteínas (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína MASP) y el adyuvante de Freund completo a la proporción de 1:1. Cada conejo se inmuniza con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrae sangre y el suero anti-MASP resultante se utiliza para posteriores experimentos como se describe en los ejemplos 3 y 4.

#### b) Purificación de IgG (inmunoglobulina G) de suero de conejo mediante purificación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio

Un volumen de suero de conejo se diluye con 4 volúmenes de tampón de acetato (60 mM, pH 4,0). Se ajusta el pH a 4,5 con 2 M de Tris base. Se añade ácido caprílico gota a gota (25  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de muestra diluida) bajo agitación vigorosa. Después de 30 minutos la muestra se centrifuga (13.000 x g, 30 minutos, 4°C), el sedimento se descarta y se recoge el sobrenadante. El pH del sobrenadante se ajusta a 7,5 mediante la adición de 2 M de Tris base y se filtra (0,2  $\mu\text{m}$ ).

La inmunoglobulina en el sobrenadante se precipita bajo agitación vigorosa mediante la adición gota a gota de una solución de sulfato de amonio 4 M hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogen mediante centrifugación (8.000 x g, 15 minutos, 4°C).

Se descarta el sobrenadante. El sedimento se disuelve en 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,5, 30 mM NaCl y se dializa exhaustivamente. El dializado se centrifuga (13.000 x g, 15 minutos, 4°C) y se filtra (0,2  $\mu\text{m}$ ).

#### Biotinilación de IgG policlona de conejo

La IgG policlona de conejo se lleva a 10 mg/ml en 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,5, 30 mM NaCl. Por cada ml de solución de IgG se añaden 50  $\mu\text{l}$  de Biotin-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex 200 (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,5, 30 mM NaCl). La fracción que contiene las IgG biotiniladas se recoge. Los anticuerpos monoclonales se biotinilan de acuerdo con el mismo procedimiento.

#### Digoxigenilación de IgG policlona de conejo

La IgG policlona de conejo se lleva a 10 mg/ml en 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , 30 mM NaCl, pH 7,5. Por ml de solución de IgG se añaden 50  $\mu\text{l}$  de éster N-hidroxisuccinimida de ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil- $\epsilon$ -aminocaproico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, Cat. No. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex<sup>®</sup> 200 (10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,5, 30 mM NaCl). Se recogen las fracciones que contienen IgG digoxigeniladas. Los anticuerpos monoclonales se marcan con digoxigenina de acuerdo con el mismo procedimiento.

### Ejemplo 3

#### Aplicación de Western Blot para la detección de MASP en tejido humano de cáncer colorrectal utilizando anticuerpos policlonales como los generados en el Ejemplo 2

Los lisados de tejido de muestras de tumor y muestras control sanas se preparan como se describe en el Ejemplo 1, "Preparación del Tejido".

SDS-PAGE y Western-Blotting se llevan a cabo utilizando reactivos y equipamiento de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido analizada, se diluyen 10  $\mu\text{g}$  de lisado de tejido en el NuPAGE<sup>®</sup> reductor (Invitrogen) tampón de muestra SDS y se calienta durante 10 minutos a 95°C. Las muestras se desplazan en un gel 4-12% NuPAGE<sup>®</sup> (Tris-Glicina) en el sistema tampón de desplazamiento MES. La mezcla de proteínas separadas en el gel se transfieren a membranas de nitrocelulosa utilizando el Invitrogen XCell II Blot Module (Invitrogen) y el

sistema tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas se lavan 3 veces en PBS/O,05% Tween-20 y se bloquean con tampón de bloqueo Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 horas. El anticuerpo primario, suero anti-MASP policlonal de conejo (generación descrita en el Ejemplo 2), se diluye a 1:10.000 en tampón de bloqueo Roti®-Block y se incuban durante 1 hora con la membrana. Las membranas se lavan 6 veces en PBS/O,05% Tween-20. El anticuerpo primario de conejo unido de manera específica se marca con un anticuerpo policlonal de oveja POD-conjugado anti IgG de conejo, se diluye a 10 mU/ml en 0,5 x tampón de bloqueo Roti®-Block. Después de la incubación durante 1 hora, las membranas se lavan 6 veces en PBS/O,05% Tween 20. Para la detección del anticuerpo POD-conjugado anti conejo unido, la membrana se incuba con el sustrato de Western-Blotting Lumi-Light<sup>PLUS</sup> (Núm. orden 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expone a una capa autoradiográfica.

#### Ejemplo 4

##### *ELISA para la medida de MASP en muestras humanas de suero y plasma*

Para la detección de MASP en suero y plasma humanos, se desarrolla una técnica ELISA en sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugan alícuotas de anticuerpo anti-MASP (ver Ejemplo 2) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Las placas de 96 pocillos cubiertas de estreptavidina se incuban con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-MASP biotinilado durante 60 minutos a 10 µg/ml en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween-20. Después de la incubación, las placas se lavan tres veces con 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20. Los pocillos se incuban entonces durante 2 horas o bien con una dilución en serie de la proteína recombinante (ver Ejemplo 2) como antígeno estándar o con muestras de plasma diluido de los pacientes. Después de la unión de MASP, las placas se lavan tres veces con 0,9% NaCl, 0,1% Tween-20. Para la detección específica de MASP unido, los pocillos se incuban con 100 µl de anticuerpo policlonal anti MASP digoxigenilado durante 60 minutos a 10 µg/ml en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween-20. Entonces, las placas se lavan tres veces para eliminar al anticuerpo no unido. En un paso posterior, los pocillos se incuban con 20 mU/ml de conjugados POD anti-digoxigenina (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catalog No. 1633716) durante 60 minutos en 10 mM fosfato, pH 7,4, 1% BSA, 0,9% NaCl y 0,1% Tween-20. Las placas son posteriormente lavadas tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incuban con 100 µl de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, Catalog No. 1 1685767) y DO se mide después de 30-60 minutos con un lector ELISA.

#### Ejemplo 5

##### *Análisis ROC para evaluar la utilidad clínica en términos de la precisión diagnóstica*

La precisión se evalúa mediante el análisis de las muestras líquidas individuales obtenidas de cohortes de pacientes bien caracterizados, p. ej., 50 pacientes a los que se les ha realizado una colonoscopia y han resultado no tener adenoma o CCR, 50 pacientes diagnosticados y clasificados en el estadio T<sub>is</sub>-3, N0, M0 de CCR, y 50 pacientes diagnosticados con CCR avanzado, teniendo al menos infiltraciones del tumor en al menos un nódulo linfático proximal o formas más severas de metástasis, respectivamente. CEA medida mediante un ensayo disponible comercialmente (Roche Diagnostics, CEA-assay (Cat. No. 1 173 1629 for Elecsys® Systems immunoassay analyzer) y medida MASP como se describe anteriormente se cuantifican en un suero obtenido de cada uno de esos individuos. El análisis ROC tiene lugar de acuerdo con Zweig, M. H., y Campbell, *supra*. El poder discriminatorio para diferenciar los pacientes en el grupo T<sub>is</sub>-3, N0, M0 de los individuos sanos como se ha medido por el área bajo la curva ha resultado ser tan bueno para MASP como en comparación con el marcador establecido CEA.

Los datos preliminares indican que MASP puede también ser de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes después de la cirugía.

#### Lista de Referencias

Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55

Anderson, W.F., et al., J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133

Bass, R., et al., J. Biol. Chem. 277 (2002) 46845-46848

Bruck, C., et al., Methods Enzymol. 121 (1986) 587-695

Brünagel, G., et al., Cancer Research 62 (2002) 2437-2442

Carriquiry, L.A., and Pineyro, A., Dis. Colon Rectum 42 (1999) 921-929

Diamandis, et al., eds. (1996) Immunoassay, Academic Press, Boston.

Gaifre, G., and Milstein, C., Methods Enzymol. 73 (1981) 3-46

**Geenen, JE., et al.,** *Am. J. Dig. Dis.* 20 (1975) 231-235

**Goldenberg, D.M., et al.,** *J. Natl. Cancer Inst.* (Bethesda) 57 (1976) 11-22

**Herrera, M.A., et al.,** *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9

**Martell, R.E., et al.,** *mt. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149

**Moertel, C.G., et al.,** *JAMA* 270 (1993) 943-947

**Reynoso, G., et al.,** *JAMA* 220 (1972) 361-365

**Silvis, S.E., et al.,** *JAMA* 235 (1976) 928-930

Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), *TNM Classification of Malignant Tumours*, fifth edition, 1997

**Song, S.Y., et al.,** *Digestive Diseases and Sciences* 47 (2002) 183 1-1835

**Studier, F.W., et al.,** *Methods Enzymol.* 185 (1990) 60-89

**Sturgeon, C.,** *Clinical Chemistry* 48 (2002) 1151-1159

**Tijssen, P.,** Practice and theory of enzyme immunoassays 11 (1990) the whole book, especially pages 43-78; Elsevier, Amsterdam

UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds), *25 TNM Classification of Malignant Tumours*, fifth edition, 1997

**Wanebo, H.J., et al.,** *N. Engi. J. Med.* 299 (1978) 448-451

WO 01/96390

WO 02/078636

**Zou, Z., et al.,** *Science* 263 (1994) 526-529

**Zweig, M. H., and Campbell, G.,** *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico del cáncer colorrectal que incluya los pasos de:

a) aportar una muestra líquida obtenida de un individuo,

b) poner en contacto dicha muestra con un agente de unión específico para el precursor maspin (MASP) bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo entre dicho agente de unión y MASP, y

c) correlacionar la cantidad de complejo formado en (b) con el diagnóstico del cáncer colorrectal.

2. El método de la reivindicación 1, **caracterizado** además porque esa muestra es suero.

3. El método de la reivindicación 1, **caracterizado** además porque esa muestra es plasma.

4. El método de la reivindicación 1, **caracterizado** además porque esa muestra es sangre total.

5. El uso de la proteína MASP como molécula marcadora en el diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

6. El uso de la proteína MASP como molécula marcadora en el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el diagnóstico precoz se realiza con una muestra obtenida de pacientes con CCR en el estadio de adenoma.

8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el diagnóstico precoz se realiza con una muestra obtenida de pacientes con CCR en el estadio T<sub>is</sub>-3; N0; M0.

9. El uso de la proteína MASP como molécula marcadora para cáncer colorrectal en combinación con otra molécula marcadora para cáncer colorrectal en el diagnóstico del cáncer colorrectal a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

10. Un equipo inmunológico que incluya al menos un agente de unión específico para MASP y reactivos auxiliares para la medida de MASP.

# ES 2 271 892 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Diagnósticos Roche GmbH.  
 F. Hoffmann-La Roche AG  
 5 <120> Uso de la proteína MASP como marcador para el cáncer colorrectal  
 <130> 21767  
 <150> Patente Europea N° 03011158.7  
 10 <151> 26-05-2003  
 <160> 1  
 <170> Versión de Patente 3,2  
 <210> 1  
 15 <211> 375  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <220>  
 20 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> precursor maspin; Swiss-PROT: P36952  
 <400> 1  
 25 Met Asp Ala Leu Gln Leu Ala Asn Ser Ala Phe Ala Val Asp Leu Phe  
 1 5 10 15  
 30 Lys Gln Leu Cys Glu Lys Glu Pro Leu Gly Asn Val Leu Phe Ser Pro  
 20 25 30  
 Ile Cys Leu Ser Thr Ser Leu Ser Leu Ala Gln Val Gly Ala Lys Gly  
 35 35 40 45  
 35 Asp Thr Ala Asn Glu Ile Gly Gln Val Leu His Phe Glu Asn Val Lys  
 50 55 60  
 40 Asp Ile Pro Phe Gly Phe Gln Thr Val Thr Ser Asp Val Asn Lys Leu  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Phe Tyr Ser Leu Lys Leu Ile Lys Arg Leu Tyr Val Asp Lys  
 45 85 90 95  
 Ser Leu Asn Leu Ser Thr Glu Phe Ile Ser Ser Thr Lys Arg Pro Tyr  
 100 105 110  
 50 Ala Lys Glu Leu Glu Thr Val Asp Phe Lys Asp Lys Leu Glu Glu Thr  
 115 120 125  
 55 Lys Gly Gln Ile Asn Asn Ser Ile Lys Asp Leu Thr Asp Gly His Phe  
 130 135 140  
 Glu Asn Ile Leu Ala Asp Asn Ser Val Asn Asp Gln Thr Lys Ile Leu  
 145 150 155 160  
 60 Val Val Asn Ala Ala Tyr Phe Val Gly Lys Trp Met Lys Lys Phe Pro  
 165 170 175  
 65 Glu Ser Glu Thr Lys Glu Cys Pro Phe Arg Leu Asn Lys Thr Asp Thr  
 180 185 190

# ES 2 271 892 T3

Lys Pro Val Gln Met Met Asn Met Glu Ala Thr Phe Cys Met Gly Asn  
 195 200 205  
 5  
 Ile Asp Ser Ile Asn Cys Lys Ile Ile Glu Leu Pro Phe Gln Asn Lys  
 210 215 220  
 10  
 His Leu Ser Met Phe Ile Leu Leu Pro Lys Asp Val Glu Asp Glu Ser  
 225 230 235 240  
 15  
 Thr Gly Leu Glu Lys Ile Glu Lys Gln Leu Asn Ser Glu Ser Leu Ser  
 245 250 255  
 20  
 Gln Trp Thr Asn Pro Ser Thr Met Ala Asn Ala Lys Val Lys Leu Ser  
 260 265 270  
 25  
 Ile Pro Lys Phe Lys Val Glu Lys Met Ile Asp Pro Lys Ala Cys Leu  
 275 280 285  
 30  
 Glu Asn Leu Gly Leu Lys His Ile Phe Ser Glu Asp Thr Ser Asp Phe  
 290 295 300  
 35  
 Ser Gly Met Ser Glu Thr Lys Gly Val Ala Leu Ser Asn Val Ile His  
 305 310 315 320  
 40  
 Lys Val Cys Leu Glu Ile Thr Glu Asp Gly Gly Asp Ser Ile Glu Val  
 325 330 335  
 45  
 Pro Gly Ala Arg Ile Leu Gln His Lys Asp Glu Leu Asn Ala Asp His  
 340 345 350  
 50  
 Pro Phe Ile Tyr Ile Ile Arg His Asn Lys Thr Arg Asn Ile Ile Phe  
 355 360 365  
 55  
 Phe Gly Lys Phe Cys Ser Pro  
 370 375