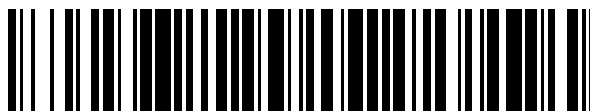


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 125**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08716640 .1**
96 Fecha de presentación: **19.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2130048**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.12.2009**

54 Título: **Apex como marcador de cáncer de pulmón**

30 Prioridad:
23.03.2007 EP 07006079

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.06.2012

73 Titular/es:
F. Hoffmann-La Roche AG
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel , CH

72 Inventor/es:
HAGMANN, Marie-Luise;
KARL, Johann;
KLOECKNER, Julia;
ROESSLER, Markus;
TACKE, Michael y
THIEROLF, Michael

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 384 125 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

Apex como marcador de cáncer de pulmón.

5 La presente invención se refiere a un método de ayuda a la evaluación del cáncer pulmonar o de pulmón (=LC) y en particular en la evaluación del carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). Da a conocer la utilización de la AP endonucleasa (=APEX) como marcador del LC, particularmente del NSCLC. Además, se refiere especialmente a un método para evaluar el cáncer de pulmón a partir de una muestra líquida, derivada de un individuo, mediante la medición de APEX en dicha muestra. La medición de APEX puede utilizarse, por ejemplo, en la detección precoz del
10 cáncer de pulmón o en la vigilancia de pacientes que se someten a cirugía.

El cancer sigue siendo un importante reto para la salud pública a pesar de los avances en la detección y terapia. Entre los diversos tipos de cáncer, el LC es un cáncer frecuente en el mundo occidental y se encuentra entre las causas más frecuentes de mortalidad relacionada con el cáncer. Ello se debe en gran parte a la brecha diagnóstica existente en la detección precoz de la enfermedad. El LC es mayoritariamente asintomático en sus primeros estadios. La mayoría de los cánceres de pulmón se detecta en un estadio tardío, cuando la enfermedad ya no es operable.
15

La mayoría de los tumores de LC puede clasificarse en carcinoma pulmonar de células pequeñas (SCLC) y carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). El SCLC supone aproximadamente 20% a 25% de todos los casos de cáncer de pulmón. El SCLC es un tipo neuroendocrino agresivo de LC y presenta un pronóstico muy pobre, incluso cuando se detecta en estadios tempranos. El SCLC raramente es susceptible de tratamiento curativo mediante resección. Debido a la velocidad a la que progresa la enfermedad, el SCLC generalmente se clasifica en dos estadios, limitada y extensiva, a diferencia del sistema de estadificación más complejo del TNM (ver posteriormente). Aproximadamente 75% a 80% de los casos de LC se agrupan en la clase de NSCLC, que incluye el carcinoma de células escamosas (carcinoma=CA), el adeno CA (que comprende las subclases de CA acinar, CA papilar, tumor broncoalveolar, tumor sólido y subtipos mixtos) y el carcinoma de células grandes (que comprende las subclases de tumor de células gigantes, CA de células claras, CA adenoescamoso y CA no diferenciado). El NSCLC, si se detecta en estadios tardíos, también presenta un pronóstico muy pobre. La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión, tipo celular y grado del tumor. Agrupa los pacientes de cáncer de manera que puedan realizarse generalizaciones sobre el pronóstico y la elección de terapia.
20
25
30

En la actualidad, el sistema TNM es el sistema de clasificación más ampliamente utilizado basado en la extensión anatómica del cáncer. Representa un sistema de estadificación uniforme e internacionalmente aceptado. Existen tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estado de los nódulos linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis distantes). Los criterios del TNM han sido publicados por el UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer), edición de 1997 (Sobin L.H. y Fleming I.D., TNM 80:1803-4, 1997).
35

La resección quirúrgica del tumor primario se acepta ampliamente como tratamiento de elección para el NSCLC de estadio temprano. Con la progresión del NSCLC y, más concretamente, la transición de estadio IIIa (T3N1M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N2M0) a IIIb (T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0), se produce un cambio significativo en el enfoque aplicado por el médico. Sin embargo, en el caso de que el cáncer se detecte durante los estadios más tempranos (Ia a IIIa, preferentemente hasta el estadio T3N1M0), la tasa de supervivencia a cinco años varía entre el 35% y el 80%. La detección en el estadio Ia ((T1N0M0), tamaño del tumor pequeño, sin metástasis) evidentemente presenta el mejor pronóstico, con una supervivencia a cinco años de hasta el 80%.
40
45

La cirugía raramente o nunca se utiliza en el control del estadio IIIb-IV del NSCLC. El estadio IV corresponde a metástasis distantes, es decir, la extensión de la enfermedad más allá de los pulmones y nódulos linfáticos regionales. La tasa de supervivencia a cinco años en los estadios tardíos III y IV cae hasta menos del 15% y 1%, respectivamente.
50

Lo que resulta especialmente importante es que el diagnóstico precoz del NSCLC se traduce en un pronóstico mucho mejor. Los pacientes diagnosticados ya en los estadios Ia (T1 N0M0), Ib (T2N0M0), IIa (T1N1M0), IIb (T3N0M0) e IIIa (T3N1M0), en el caso de que reciban el tratamiento correcto presentan una probabilidad de 80% de supervivencia a 5 años tras el diagnóstico. Lo anterior contrasta con una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 1% para los pacientes diagnosticados cuando ya se encuentran presentes metástasis distantes.
55

En el sentido de la presente invención, la evaluación precoz del LC se refiere a una evaluación en un estadio tumoral de entre Ia e IIIa, tal como se han definido anteriormente.
60

Resulta preferente que la evaluación del LC se realice en un estadio entre Ia e IIIa.

La mayoría de cánceres de pulmón se detectan cuando ya se han convertido en sintomáticos. Entre los métodos de

detección actuales se incluyen la radiografía torácica, la tomografía computerizada espiral, la citología del esputo y la bronquioscopia. Sin embargo, existe una controversia respecto a la conveniencia de utilizar dichas medidas para cribados masivos.

5 Se utilizan clínicamente varios marcadores tumorales séricos de cáncer de pulmón. El fragmento soluble de 30 kDa de la citoqueratina-19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembrionario (CEA), la enolasa específica neuronal (NSE) y el antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC) son los marcadores de LC más conocidos. Sin embargo, ninguno de ellos satisface los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos de una herramienta de cribado (Thomas L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, Alemania, 2000).

10 Con el fin de que resulte de utilidad, un nuevo marcador diagnóstico como marcador único debe ser comparable con otros marcadores conocidos de la técnica, o mejor. Alternativamente, un nuevo marcador debe conducir a un avance en la sensibilidad o especificidad diagnóstica, o ambas, tanto en el caso de que se utilice solo como en el caso de que se utilice en combinación con uno o más marcadores diferentes, respectivamente. La sensibilidad o especificidad diagnóstica, o ambas, de un ensayo se evalúan mejor a partir de sus características de funcionamiento de receptor, las cuales se describen en mayor detalle posteriormente.

15 La sangre completa, el suero o el plasma son las fuentes de muestra utilizadas más ampliamente en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral precoz de LC que ayudaría en la detección fiable del cáncer o que proporcionaría información pronóstica temprana podría conducir a un método que ayudaría mucho en el diagnóstico y en el control de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejorar la evaluación *in vitro* del LC. Resulta especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz del LC ya que para los pacientes diagnosticados precozmente las tasas de supervivencia son mucho más altas que para los diagnosticados en un estadio más avanzado de la enfermedad.

20 La utilidad clínica de los marcadores bioquímicos en el cáncer de pulmón ha sido revisada recientemente (Duffy M.J., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38:225-262, 2001).

25 En la actualidad CYFRA 21-1 se considera el mejor marcador tumoral conocido actualmente para el cáncer de pulmón. Aunque no es específico de un órgano se encuentra predominantemente en tejido pulmonar. La sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón está descrita en 46% a 61% a una especificidad de 95% hacia otras enfermedades pulmonares benignas. Los niveles séricos incrementados de CYFRA 21-1 también se asocian a enfermedad hepáticas benignas pronunciadas, a insuficiencia renal y a cáncer de vejiga invasivo. El ensayo para CYFRA 21-1 está recomendado para el control postoperatorio de la terapia.

30 El CEA pertenece al grupo de los antígenos carcinofoetales, habitualmente producidos durante la embriogénesis. El CEA no es específico de un órgano y se utiliza predominantemente para el control del cáncer colorrectal. Aparte de las malignidades, también varias enfermedades benignas tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis y las enfermedades autoinmunitarias se asocian a niveles séricos de CEA incrementados. A una especificidad de 95% para las enfermedades pulmonares benignas, se informa de que su especificidad para el cáncer de pulmón es de entre 29% y 44%. Un uso preferente del CEA es el control de la terapia del cáncer de pulmón.

35 La NSE es un marcador tumoral del SCLC. Generalmente, los niveles séricos incrementados de NSE se observan asociados a tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. También se observan niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades pulmonares y cerebrales benignas, tales como meningitis u otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y en lesiones traumáticas de la cabeza. Aunque se informa de que la sensibilidad para SCLC a una especificidad de 95% es de entre 60% y 87%, el rendimiento del ensayo de NSE para el NSCLC es pobre (sensibilidad de entre 7% y 25%). La NSE está recomendada para el control de la terapia del SCLC.

40 ProGRP es un marcador tumoral que resulta útil en la detección y control del SCLC. También se observan niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades pulmonares/pleurales no malignas, tales como la fibrosis pulmonar idiopática o la sarcoidosis. Aunque se informa de que la sensibilidad para proGRP en el campo del SCLC (a una especificidad del 95%) es de entre 47% y 86%, el rendimiento del ensayo de proGRP en el campo de NSCLC es pobre, con una sensibilidad informada del 10%.

45 El SCC se identificó originalmente en el CA de células escamosas del cérvix. La sensibilidad de SCC para el LC en general es baja (entre 18% y 27%). Por lo tanto, se considera que el ensayo de SCC no resulta adecuado para el cribado. Sin embargo, debido a la sensibilidad más elevada para el CA de células escamosas, un uso preferente para el SCC es el control terapéutico, aunque CYFRA 21-1 generalmente funciona mejor.

50 Con respecto a los perfiles de los marcadores y con el fin de conseguir un diagnóstico mejorado del cáncer de pulmón, un método ha sido publicado (Schneider J. *et al.*, Int. J. Clin. Oncol. 7:145-151, 2002) utilizando algoritmos de clasificación basados en lógica difusa para combinar los niveles séricos de CYFRA 21-1, de la NSE y de la proteína C-reactiva (CRP), la cual es un marcador general de inflamación. Los autores informan de una sensibilidad

de 92% a una especificidad del 95%. Sin embargo, en dicho estudio, se informa de que la sensibilidad de CYFRA 21-1 como marcador tumoral único es del 72% a una especificidad del 95%, lo que es significativamente superior al valor proporcionado en muchos otros estudios informados. Duffy M.J., en: *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38:225-262, 2001, informa de una sensibilidad de entre 46% y 61%. Dicho inesperadamente alto rendimiento conseguido por Schneider *et al.* plantea algunas dudas y podría deberse a varios hechos. En primer lugar, el colectivo de pacientes de control aparentemente es más joven que el colectivo de pacientes, es decir, los grupos no han sido correctamente emparejados por edades, y el colectivo de pacientes comprende muchos estadios tardíos. En segundo lugar, y un punto todavía más crítico, el rendimiento del algoritmo se comprueba sobre las muestras del conjunto de entrenamiento que se utilizaron para la determinación de los calificadores de lógica difusa. Por lo tanto, dichos calificadores se "adaptan", en sentido estricto, a dicho conjunto y no se aplican a un conjunto independiente, de validación. En condiciones normales, debe esperarse que el mismo algoritmo aplicado a un conjunto de validación independiente, de mayor tamaño y bien balanceado conduzca un rendimiento global significativamente menor.

El objetivo de la presente invención es la identificación de un marcador bioquímico que pueda utilizarse en la evaluación del LC.

Inesperadamente se ha encontrado que la utilización del marcador APEX puede superar por lo menos parcialmente algunos de los problemas de los marcadores conocidos actualmente del estado de la técnica.

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer de pulmón *in vitro*, que comprende medir en una muestra la presencia o concentración o ambos de APEX en una muestra seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, y la utilización del resultado de la medición, particularmente la concentración determinada en la evaluación del cáncer de pulmón, en el que la detección de la presencia o concentración o ambas de APEX es indicativa, o son indicativas, de cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere además a un método para evaluar el LC *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la presencia o concentración o ambos de APEX en una muestra seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, y de otro u otros marcadores de LC, y la utilización de los resultados de las mediciones, particularmente las concentraciones determinadas en la evaluación del LC, en el que la detección de la presencia o concentración o ambas de APEX es indicativa, o son indicativas, de cáncer de pulmón. Resulta preferente que el otro u otros marcadores de LC se seleccionan de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC.

La presente invención, en una realización preferente, se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos APEX y CYFRA 21-1 en la evaluación *in vitro* del LC en una muestra seleccionada de entre extractos de tejidos y líquidos corporales, en el que la detección de niveles incrementados de presencia o concentración o ambos de APEX es indicativa de cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos APEX y CEA en la evaluación *in vitro* del LC en una muestra seleccionada de entre extractos de tejidos y líquidos corporales, en el que la detección de niveles incrementados de presencia o concentración o ambos de APEX es indicativa de cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos APEX y SCC en la evaluación *in vitro* del LC en una muestra seleccionada de entre extractos de tejidos y líquidos corporales, en el que la detección de niveles incrementados de presencia o concentración o ambos de APEX es indicativa de cáncer de pulmón.

La presente exposición también proporciona un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por los menos los reactivos necesarios para medir específicamente APEX y CYFRA 21-1, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.

La presente exposición también proporciona un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por los menos los reactivos necesarios para medir específicamente APEX y CEA, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.

La presente exposición también proporciona un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por los menos los reactivos necesarios para medir específicamente APEX y SCC, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer de pulmón *in vitro*, que comprende medir en una muestra la presencia o concentración o ambos de: a) APEX en una muestra

seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, y b) opcionalmente uno o más otros marcadores de cáncer de pulmón, y c) a partir de los resultados de las mediciones, particularmente las concentraciones determinadas en la etapa (a) y opcionalmente en la etapa (b) en la evaluación del cáncer de pulmón, en el que la detección de un nivel incrementado de presencia o concentración o ambos de APEX es indicativo de cáncer de pulmón.

El término "medición" comprende una medición cualitativa o cuantitativa de APEX en una muestra. En una realización preferente, la medición es una medición cualitativa o semicuantitativa, es decir, se determina si APEX se encuentra presente o ausente o se determina si la concentración de APEX es superior o inferior a un valor de corte. Tal como apreciará el experto en la materia, en un ensayo de Sí (presencia) o No (ausencia), la sensibilidad del ensayo habitualmente se establece en el valor de corte. Puede determinarse un valor de corte, por ejemplo, a partir del ensayo de un grupo de individuos sanos. Preferentemente, el valor de corte se establece de manera que resulte en una especificidad del 90%; también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una especificidad del 95%, o también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una especificidad del 98%. La presencia o un valor superior al valor de corte puede ser, por ejemplo, indicativo de la presencia de cáncer de pulmón. En una realización preferente adicional, la medición es una medición cuantitativa. En dicha realización, se correlaciona la concentración de APEX con una pregunta diagnóstica subyacente, tal como, por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

La AP endonucleasa APEX (Swiss-Prot. nº P27695) se caracteriza por la secuencia proporcionada en SEC ID nº 1. La molécula precursora no procesada consiste de 318 aminoácidos y presenta un peso molecular de 35,6 kDa. APEX participa en la reparación del ADN y corta los sitiosapurínicos o apirimidínicos de las cadenas de ADN. Dichos sitios abásicos son generados con relativa frecuencia de modo espontáneo o por agentes químicos o por ADN glucosilasas que eliminan bases anormales específicas.

Los sitios de AP son lesiones premutagénicas que impiden la replicación normal del ADN de manera que la célula contenga sistemas para identificar y reparar dichos sitios (Gil Barzilay, Ian D. Hickson, *Bioessays* 17(18):713-719, 1995). La estructura 3D ha sido elucidada y los aminoácidos implicados en la actividad de endonucleasa han sido identificados (Barzilay G. *et al.*, *Nature structural biology* 2(7):561-567, 1995; Gorman M.A. *et al.*, *EMBO Journal* 16(21):6548-58, 1997; Beernink P. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 307:1023-1034, 2001). APEX también es un regulador redox de diversos factores de transcripción, tales como c-Fos, c-Jun, NF-KB e HIF-1. Esta actividad aparentemente es independiente de la actividad de endonucleasa. Ambas funciones se encuentran localizadas en diferentes dominios de la proteína (Gil Barzilay, Ian D. Hickson, *Bioessays* 17(18):713-719, 1995). La fosforilación de APEX por parte de la proteína quinasa C incrementa la actividad redox, mientras que la forma no fosforilada participa en la reparación del ADN (Yacoub A. *et al.* (*Cancer Res.* 57:5457-59, 1997). Un sitio de fosforilación, Y 261 (según la secuencia de Swissprot) ha sido identificada por Rush J. *et al.*, (*Nature Biotech.* 23(1):94-101, 2005).

También se ha observado que APEX activa la actividad de unión a ADN de p53 (Jayaraman L. *et al.*, *Genes Dev.* 11(5):558-70, 1997). La regulación *in vivo* de p53 por parte de APEX ha sido estudiada por Gaiddon *et al.* (*EMBO Journal* 18(20):5606-5621, 1999). El papel de p53 en la tumorigénesis ha sido bien establecido.

La patente WO nº 97/47971 da a conocer la utilización de endonucleasasapurínicas/apirimidínicas como marcadores para identificar una condición premaligna o maligna. Los ejemplos describen la tinción de APEX en el tejido de cáncer cervical y de cáncer de próstata. No se describe una determinación de APEX en extractos de tejido o en líquidos corporales. Además, el documento no contiene ningún dato que indique que APEX pueda ser un marcador asociado al cáncer de pulmón.

La patente WO nº 02/076280 da a conocer un método para determinar el riesgo de que un sujeto desarrolle cáncer, en el que se determina un parámetro indicativo de un nivel de actividad de un enzima de reparación/prevenición de daños del ADN en un tejido del sujeto y, según dicho nivel, se determina el riesgo que presenta el sujeto de desarrollar cáncer. El enzima que impide los daños al ADN puede ser APEX. La determinación implica un ensayo de reparación del ADN con actividad de OGG, en el que se somete a ensayo la actividad de reparación del ADN utilizando un sustrato oligonucleótido sintético. La muestra es un extracto de proteína preparado a partir de linfocitos de sangre periférica humana. Debido a que la reparación del ADN es un proceso complejo, la actividad de la OGG no puede correlacionarse estrictamente con APEX. Se encontró que una actividad baja de OGG era un factor de riesgo de cáncer de pulmón. Sin embargo, no se ha descrito una asociación directa entre APEX y cáncer de pulmón. La patente WO nº 2006/091734 describe la utilización de micromatrices de péptidos en la detección de un perfil de autoanticuerpos y la utilización de dicho perfil de autoanticuerpos para derivar información diagnóstica o pronóstica. En total se listan 1.480 epítomos, incluyendo 4 secuencias peptídicas de APEX. El documento no describe ninguna asociación entre APEX y el cáncer de pulmón.

Duguid *et al.* (*Cancer Res.* 55:6097-6102, 1995) describen una determinación de la expresión celular y subcelular diferencial de APEX humana mediante inmunotinción, tinción citoplasmática y nuclear de APEX en varios tejidos, por

ejemplo en el cerebro o en el hígado.

Tanner *et al.* (Gynecologic Oncol. 92:568-577, 2004) describen un incremento de la expresión nuclear de APEX a medida que progresa el carcinoma ovárico.

Kakolyris *et al.* (J. Pathol. 189:351-357, 1999) describen que la localización nuclear de la APEX humana se asocia al pronóstico del NSCLC operable temprano. En el pulmón normal, se ha encontrado que la tinción para APEX es tanto nuclear como citoplasmática en los neumocitos de los alvéolos. Las células ciliadas superficiales del epitelio bronquial mostraban tinción citoplasmática, mientras que la tinción de las células basales era principalmente nuclear. Las células glandulares bronquiales mostraban tinción mixta nuclear y citoplasmática. Todos los carcinomas pulmonares mostraban patrones de expresión de APEX. En los carcinomas escamosos, se observó una correlación indirecta significativa, es decir, la tinción nuclear incrementada (positiva) para APEX se producía en paralelo con una menor tinción (negativa) para p53. Los autores concluyeron que la localización nuclear de APEX podría ser relevante para su papel como proteína de reparación del ADN o como activador de p53 de tipo salvaje, o para ambos, y de esta manera para el mejor resultado clínico observado en un subgrupo de pacientes.

Puglisi *et al.* (Anticancer Res. 21:4041-4050, 2001) describen un papel potencial de la localización subcelular de APEX como indicador pronóstico en pacientes con NSCLC. En particular, la localización citoplasmática de la proteína aparentemente se asocia a un pronóstico puro en subgrupos de pacientes.

Resulta interesante que ninguno de los documentos anteriormente indicados sugiere que una determinación de APEX en extractos de tejido y en líquidos corporales permita la evaluación de cáncer de pulmón. Según la técnica anterior, sólo una tinción subcelular de APEX permitiría la evaluación de cáncer. Inesperadamente, se ha encontrado en la presente invención que una determinación de la presencia y/o cantidad de APEX en una muestra tisular de tejido y/o de líquido corporal sin análisis subcelular, particularmente sin determinar la localización subcelular, permite la evaluación del cáncer de pulmón. Todavía más inesperadamente, se ha encontrado que la presencia o una concentración de APEX, o ambas, se asocia a cáncer de pulmón.

Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado respectivamente en la presente sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un marcador" se refiere a un marcador o a más de un marcador. El término "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente puede encontrarse presente uno o más objetos adicionales. A título de ejemplo, un panel de marcadores que comprenda por lo menos (los marcadores) APEX y CYFRA 21-1 opcionalmente puede comprender otro u otros marcadores.

La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente 1 a 20, resultando preferentes también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.

El término "marcador" o la expresión "marcador bioquímico" se utilizan en la presente memoria para referirse a una molécula que debe utilizarse como diana para el análisis de una muestra de ensayo de un paciente. En una realización, son ejemplos de dichas dianas moleculares las proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contempla que incluyan variantes naturales de dichas proteínas, así como fragmentos de dichas proteínas o de dichas variantes, en particular fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables preferentemente comprenden por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. El experto en la materia reconocerá que las proteínas liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo durante la inflamación, y que podrían resultar degradadas o cortadas formando dichos fragmentos. Determinados marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que puede ser activada posteriormente mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, también pueden encontrarse presentes proteínas o fragmentos de las mismas como parte de un complejo. Dicho complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador se encuentran codificadas por el mismo gen, aunque pueden diferir en su punto isoeléctrico (=PI) o peso molecular (=PM), o ambos, por ejemplo como resultado del procesamiento alternativo de ARNm o de pre-ARNm. La secuencia de aminoácidos de una variante es 95% o más idéntica a la secuencia marcadora correspondiente. Además, o alternativamente, un polipéptido marcador o una variante del mismo puede portar una modificación post-traducciona. Las modificaciones post-traduccionales preferentes son la glucosilación, la acilación y/o la fosforilación. Preferentemente, el marcador APEX se mide específicamente de una muestra mediante la utilización de un agente de unión específica.

Un agente de unión específica es, por ejemplo, un receptor de APEX, una lectina de unión a APEX o un anticuerpo de APEX. Un agente de unión específica presenta una afinidad de por lo menos 10^7 l/mol para su molécula diana

- correspondiente. El agente de unión específica preferentemente presenta una afinidad de 10^8 l/mol, o también preferentemente, 10^9 l/mol, para su molécula diana. El experto en la materia apreciará que el término "específico" se utiliza para indicar que otras moléculas biológicas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específica para APEX. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula biológica diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es, como máximo, de sólo 10% o inferior, de sólo 5% o inferior, de sólo 2% o inferior o de sólo 1% o inferior de la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica preferente satisfará los criterios de mínimo anteriormente indicados tanto para la afinidad como para la especificidad.
- 5
- 10 Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo reactivo con APEX. El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo policlonal, a un anticuerpo monoclonal, a fragmentos de unión a anticuerpo de dichos anticuerpos, a anticuerpos de una cadena, así como a constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.
- 15 Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que satisfaga los criterios anteriormente indicados para un agente de unión específica. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo tal como se describen en Tijssen (Tijssen P., Practice and theory of enzyme immunoassays 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, la totalidad de la obra, especialmente las páginas 43 a 78). Además, el experto en la materia conoce perfectamente los métodos basados en inmutosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante dichos métodos puede mejorarse la calidad de los anticuerpos policlonales y por lo tanto su rendimiento en inmunoensayos (Tijssen P., *supra*, páginas 108 a 115).
- 20
- 25 Para obtener los resultados dados a conocer en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos policlonales cultivados en conejos. Sin embargo, claramente también pueden utilizarse anticuerpos policlonales procedentes de especies diferentes, por ejemplo ratas o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Debido a que pueden producirse anticuerpos monoclonales en cualquier cantidad necesaria que presenten propiedades constantes, representan herramientas ideales para desarrollar un ensayo para la utilización clínica rutinaria. La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales contra APEX en un método según la presente invención representan todavía otras realizaciones preferentes.
- 30
- 35 Tal como apreciará el experto en la materia ahora que APEX ha sido identificado como marcador útil en la evaluación del cáncer de pulmón, pueden utilizarse diversos procedimientos inmunodiagnósticos para conseguir un resultado comparable a los resultados de la presente invención. Por ejemplo, pueden utilizarse estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden, entre otros, la utilización de péptidos sintéticos, los cuales representan un epítipo de APEX para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con ADN, también conocida como vacunación de ADN.
- 40
- 45 Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específica para APEX bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión-APEX. Dichas condiciones no necesitan especificarse ya que el experto en la materia sin esfuerzo inventivo podrá identificar fácilmente dichas condiciones de incubación apropiadas. Se mide la cantidad de complejo de agente de unión-APEX y se utiliza en la evaluación del cáncer de pulmón. Tal como apreciará el experto en la materia, existen numerosos métodos para medir la cantidad de complejo de agente de unión específica-APEX, la totalidad de los cuales se describe en libros de texto relevantes (ver, por ejemplo, Tijssen P., *supra*, o Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores), Immunoassay, Academic Press, Boston, 1996).
- 50
- 55 Preferentemente, APEX se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich. En dicho ensayo, se utiliza un primer agente de unión específica para capturar APEX en una cara y se utiliza un segundo agente de unión específica, que se marca para que resulte directa o indirectamente detectable, en la otra cara.
- 60 Un "marcador de cáncer de pulmón" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que, en caso de combinarse con el marcador APEX, añade información relevante en la evaluación del LC. La información se considera relevante o de valor aditivo en el caso de que, a una especificidad dada, la sensibilidad, o la especificidad a una sensibilidad dada, respectivamente, en la evaluación del LC, pueda mejorarse mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador APEX. Preferentemente, la mejora de la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de $p=0,05$, $0,02$, $0,01$ ó inferior. Preferentemente, el otro u otros marcadores de LC se seleccionan de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC.
- El término "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de la evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra, o muestra procedente de un paciente, comprende cualquier líquido corporal o un extracto de tejido. Entre las muestras de ensayo preferentes se incluyen sangre, suero, plasma, esputo y lavado bronquial. Las muestras preferentes son sangre completa, suero,

plasma, lavado bronquial o esputo, siendo el plasma o el suero las más preferentes.

5 La expresión "evaluación del cáncer de pulmón" se utiliza para indicar que el método según la presente invención (solo o combinado con otros marcadores o variables, por ejemplo los criterios establecidos por el UICC (ver anteriormente)), por ejemplo ayuda al médico a establecer o a confirmar la ausencia o presencia de LC o ayuda al médico en el pronóstico, en la detección de la recurrencia (durante el seguimiento postquirúrgico de los pacientes) y/o en el seguimiento del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

10 Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza *in vitro*. Posteriormente se descarta la muestra del paciente. La muestra del paciente se utiliza únicamente para el método diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere nuevamente al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo sangre completa, suero o plasma.

15 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el LC *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de APEX en una muestra seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, y mediante la utilización de la concentración determinada en la evaluación del LC, en el que la detección de un incremento de la presencia o concentración, o ambos, de APEX es indicativo de cáncer de pulmón.

20 Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido detectar el marcador APEX en un porcentaje significativo de muestras derivadas de pacientes con LC. Todavía más inesperado es que han podido demostrar que la presencia o concentración, o ambos, de APEX en dicha muestra obtenida de un individuo puede utilizarse en la evaluación del cáncer de pulmón.

25 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un suceso o un proceso individual causaría la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente en el caso de que la etiología de la enfermedad no se comprenda completamente, tal como es el caso en el LC. Tal como apreciará el experto en la materia, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad de 100% y simultáneamente con una sensibilidad de 30 100% para una enfermedad multifactorial dada, por ejemplo el LC. Por el contrario, los marcadores bioquímicos, por ejemplo CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP, SCC o, tal como se muestra en la presente memoria, APEX, pueden utilizarse para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, ausencia o severidad de una enfermedad. Por lo tanto, en el diagnóstico clínico rutinario, generalmente se consideran diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos conjuntamente en el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad 35 subyacente.

Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o, en una realización preferente de la invención, pueden medirse simultáneamente utilizando un chip o una tecnología de matrices basada en perlas. Las 40 concentraciones de los marcadores biológicos seguidamente se interpretan de modo independiente, por ejemplo utilizando un valor de corte individual para cada marcador, o se combinan para la interpretación.

En una realización preferente adicional, la evaluación del LC según la presente invención se lleva a cabo en un método que comprende medir en una muestra la presencia o concentración o ambos de: a) APEX en una muestra 45 seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, y b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer de pulmón, y c) a partir de los resultados de las mediciones, particularmente las concentraciones determinadas en la etapa (a) y opcionalmente en la etapa (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer de pulmón, en el que la detección de un nivel incrementado de presencia o concentración o ambos de APEX es indicativo de cáncer de pulmón.

50 En la evaluación del LC, el marcador APEX resultará ventajoso en uno o más de los aspectos siguientes: cribado, ayuda diagnóstica, pronóstico, seguimiento de la terapia, tal como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

Cribado:

55 Se define "cribado" como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar individuos, por ejemplo individuos de riesgo, para indicadores de una enfermedad, por ejemplo la presencia de cáncer de pulmón. Preferentemente, la población de cribado está compuesta de individuos que es conocido que presentan un riesgo mayor que el medio de presentar cáncer de pulmón, tales como fumadores, ex-fumadores y trabajadores expuestos a uranio, cuarzo o 60 amianto. En una realización preferente se utiliza esputo como muestra en el cribado para cáncer de pulmón.

Para muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico individual presente en la circulación sanguínea satisface los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos con fines de cribado. Lo anterior aparentemente también es cierto para el cáncer de pulmón. Debe esperarse que resultará necesario utilizar para el cribado del LC un panel de

marcadores que comprenda una pluralidad de marcadores. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador APEX formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado para los fines del cribado. Por lo tanto, la presente invención se refiere a la utilización de APEX como un marcador de un panel de marcadores de LC, es decir, un panel de marcadores que comprende 30 APEX y uno o más marcadores adicionales con fines de cribado de LC. Los presentes datos indican además que determinadas combinaciones de marcadores resultarán ventajosas en el cribado del LC. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la utilización de un panel de marcadores que comprende APEX y CYFRA 21-1, o de un panel de marcadores que comprende APEX y CEA, o de un panel de marcadores que comprende APEX y NSE, o de un panel de marcadores que comprende APEX y SCC, o de un panel de marcadores que comprende APEX y proGRP, o de un panel de marcadores que comprende APEX y dos o más marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC, para el propósito del cribado para LC.

Ayuda diagnóstica:

Los marcadores pueden ayudar en el diagnóstico diferencial de enfermedades benignas y malignas en un órgano particular, ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o a establecer valores de línea base de un marcador antes de una cirugía.

En la actualidad, son métodos importantes utilizados en la detección del cáncer de pulmón la radiología y/o los análisis de tomografía computerizada (TC). Pueden visualizarse nódulos pequeños, es decir, pequeñas regiones de tejido sospechoso, mediante dichos métodos. Sin embargo, muchos de dichos nódulos (más de 90% en la TC) representan cambios benignos de los tejidos, y sólo una minoría de los nódulos representan tejido canceroso. La utilización del marcador APEX podría ayudar en la diferenciación de los nódulos benignos y malignos.

En una realización preferente, se utiliza el marcador APEX en un método inmunohistológico con el fin de establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de LC.

Debido a que APEX como marcador único podría ser superior a otros marcadores de LC, tales como CEA o NSE, debe esperarse que APEX se utilice como ayuda diagnóstica, especialmente en el establecimiento de un valor de línea base previo a la cirugía. De esta manera, la presente invención también se refiere a la utilización de APEX para establecer un valor de línea base antes de la cirugía para el LC.

Pronóstico:

Los indicadores pronósticos pueden definirse como características clínicas, patológicas o bioquímicas de los pacientes de cáncer y de sus tumores que predicen con una determinada probabilidad el resultado de una enfermedad. Su utilización principal es en la ayuda a la planificación racional del control de un paciente, es decir, para evitar el infratratamiento de una enfermedad agresiva o el sobretatamiento de una enfermedad indolente, respectivamente. Molina R. *et al.*, Tumor Biol. 24:209-218, 2003, han evaluado el valor pronóstico de CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SSC y NSE en el NSCLC. En su estudio, unos niveles en suero anormales de los marcadores NSE, CEA y LDH (lactato deshidrogenasa) aparentemente indicaban un tiempo de supervivencia más corto.

Debido a que APEX por sí solo contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes de LC respecto de los controles sanos, debe esperarse que ayudará en la evaluación del pronóstico de los pacientes que sufren de LC. El nivel de APEX preoperatorio muy probablemente se combinará con otro u otros marcadores de LC y/o en el sistema de estadificación de TNM. En una realización preferente se utiliza APEX en el pronóstico de los pacientes con LC.

Seguimiento de la quimioterapia:

Merle P. *et al.*, Int. J. of Biological Markers 19:310-315, 2004, han evaluado las variaciones del nivel sérico de CYFRA 21-1 en pacientes con NSCLC localmente avanzado bajo tratamiento con quimioterapia de inducción. Concluyeron que el seguimiento temprano de los niveles séricos de CYFRA 21-1 podría ser una herramienta pronóstica útil para la respuesta tumoral y la supervivencia en pacientes de NSCLC de estadio III. Además, algunos informes han descrito la utilización de CEA en el seguimiento del tratamiento de pacientes con LC (Fukasawa T. *et al.*, Cancer & Chemotherapy 13:1862-1867, 1986). La mayoría de dichos estudios eran retrospectivos, no aleatorizados y contenían un número reducido de pacientes. Tal como en el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios de CEA sugieren: a) que los pacientes con una reducción de los niveles de CEA observada durante el tratamiento de quimioterapia generalmente presentaron un mejor resultado que los pacientes cuyos niveles de CEA no habían bajado, y (b) que prácticamente para todos los pacientes, el incremento del nivel de CEA se asoció a progresión de la enfermedad.

Se espera que APEX será un marcador por lo menos tan bueno para el seguimiento de la quimioterapia como

CYFRA 21-1 ó CEA, respectivamente. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a la utilización de APEX en el seguimiento de los pacientes de LC bajo quimioterapia.

Seguimiento:

5 Una gran parte de los pacientes de LC sometidos a resección quirúrgica destinada a la eliminación completa del tejido canceroso desarrollaron posteriormente una enfermedad recurrente o metastásica (Wagner H., Chest 117:110-118, 2000; Buccheri G. *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 75:973-980, 2003). La mayoría de dichas recaídas se produjeron en los primeros 2-3 años posteriores a la cirugía. Debido a que la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente fatal en el caso de que se detecte tarde, se ha dedicado un considerable esfuerzo de investigación a la recaída del LC en un estadio precoz y, de esta manera, potencialmente tratable.

15 En consecuencia, muchos pacientes de LC se someten a un programa de vigilancia postoperatoria que frecuentemente incluye el seguimiento periódico del CEA. El seguimiento seriado del CEA un año después de la resección quirúrgica se ha demostrado que detecta una enfermedad recurrente/metastásica postoperatoria temprana con una sensibilidad de aproximadamente 29%, a una especificidad de aproximadamente 97%, incluso en ausencia de síntomas o signos sospechosos (Buccheri G. *et al.*, Ann. Thorac. Surg. 75:973-980, 2003). De esta manera, el seguimiento de los pacientes con LC tras la cirugía es uno de los campos más importantes de utilización de un marcador bioquímico apropiado. Debido a la elevada sensibilidad de APEX en los pacientes de LC investigados, es probable que APEX solo o en combinación con otro u otros marcadores resultará de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes de LC, especialmente en el caso de pacientes de LC después de la cirugía. La utilización de un panel de marcadores que comprende APEX y otro u otros marcadores de LC en el seguimiento de los pacientes de LC representa una realización preferente adicional de la presente invención.

25 La presente invención en una realización preferente se refiere a la utilización de APEX en el campo diagnóstico del LC o en la evaluación del LC, respectivamente.

30 En todavía una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de APEX como molécula marcadora del cáncer de pulmón en combinación con una o más moléculas marcadoras de cáncer de pulmón en la evaluación del cáncer de pulmón a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo. Son otros marcadores de LC seleccionados preferentes con los que puede combinarse la medición de APEX, CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y/o SCC. Todavía más preferentemente, el panel de marcadores utilizado en la evaluación de LC comprende APEX y por lo menos otra molécula marcadora seleccionada de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1 y CEA.

35 Tal como apreciará el experto en la materia, existen muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la respuesta a la cuestión diagnóstica investigada. En un enfoque bastante simple, aunque con frecuencia efectivo, se considera que el resultado es positivo si una muestra obtiene un resultado positivo en por lo menos uno de los marcadores investigados. Éste puede ser el caso, por ejemplo, al diagnosticar una enfermedad infecciosa, por ejemplo el SIDA.

45 Sin embargo, con frecuencia se evalúa la combinación de marcadores. Preferentemente, los valores medidos de los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo de APEX y CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Pueden combinarse valores de marcadores mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Algunos métodos matemáticos bien conocidos de correlación de una combinación de marcadores con una enfermedad aplican métodos tales como el análisis discriminante (AD) (por ejemplo el AD lineal, cuadrático o regularizado), los métodos de núcleo (por ejemplo SVM), los métodos no paramétricos (por ejemplo los clasificadores del vecino k más próximo), PLS (es decir, los cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (por ejemplo la regresión lógica, CART, los métodos Random Forest y los métodos de boosting/bagging), los modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística), los métodos basados en los componentes principales (por ejemplo el SIMCA), los modelos aditivos generalizados, los métodos basados en lógica difusa, y los métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Resultará fácil para el experto en la materia seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo con la ausencia o presencia de LC se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático o regularizado), métodos de núcleo (es decir, SVM), métodos no paramétricos (por ejemplo clasificadores del vecino k más próximo), PLC (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (por ejemplo regresión lógica, CART, métodos Random Forest, métodos Boosting) o modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística). Pueden encontrarse detalles referentes a dichos métodos estadísticos en las referencias siguientes: Ruczinski, I. et al, J. of Computational and Graphical Statistics, 12:475-511, 2003; Friedman J. H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman L., Friedman J. H., Olshen R. A., Stone C. J., Classification and

regression trees, California: Wadsworth, 1984; Breiman L., Random Forests, Machine Learning, 45:5-32, 2001; Pepe M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, 2003; y Duda R. O., Hart P. E., Stork D. G., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2a edición, 2001.

- 5 Es una realización preferente de la invención utilizar un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo pacientes enfermos de pacientes sanos. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que forman un panel de marcadores.
- 10 La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor a partir de sus características operativas del receptor (ROC) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de ROC es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados.
- 15 El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de un ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad benigna frente a maligna.
- 20 En cada caso, el gráfico de ROC ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones a partir de un gráfico de la sensibilidad frente a: 1- la especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de positivos verdaderos + números de resultados de ensayo falsos negativos)]. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción falsa positiva, o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de la especificidad y se calcula por completo a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico de ROC representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de los resultados) presenta un gráfico de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, mientras que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentra entre ambos extremos (en el caso de que el gráfico de ROC se encuentre completamente debajo de la diagonal a 45°, se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo.
- 30 Un modo preferente de cuantificar la exactitud diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. Dicho parámetro global se denomina, por ejemplo, "error total" o, alternativamente, "área bajo la curva = AUC". La medida global más común es el área bajo el gráfico de ROC. Convencionalmente este área en todos los casos es $\geq 0,5$ (en el caso de que no se cumpla esta condición, puede revertirse la regla de decisión para que sí se cumpla). Los valores comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin ninguna diferencia aparente entre las distribuciones de los dos grupos de valores de ensayo). El área no sólo depende de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a una especificidad del 90%, sino del gráfico completo. Ésta es una expresión descriptiva cuantitativa de la proximidad del gráfico de ROC a un gráfico perfecto (área = 1,0).
- 35 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para mejorar la exactitud diagnóstica de LC frente a los controles sanos mediante la medición en una muestra de la concentración de por lo menos APEX y CYFRA 21-1, y opcionalmente de CEA, proGRP, NSE y/o SCC, respectivamente, y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de LC, resultando la mejora en la clasificación correcta de un mayor número de pacientes con LC frente a los controles sanos en comparación con la clasificación basada en un único marcador cualquiera investigado solo.
- 40 En un método preferente según la presente invención se determina por lo menos la concentración de los marcadores biológicos APEX y CYFRA 21-1, respectivamente, y se utiliza la combinación de marcadores en la evaluación del LC.
- 45 En un método preferente según la presente invención se determina por lo menos la concentración de los marcadores biológicos APEX y CYFRA 21-1, respectivamente, y se utiliza la combinación de marcadores en la

evaluación del LC.

En un método preferente adicional según la presente invención se determina por lo menos la concentración de los marcadores biológicos APEX, CYFRA 21-1 y CEA, respectivamente, y se utiliza la combinación de marcadores en la evaluación del LC. En un método preferente adicional según la presente invención se determina por lo menos la concentración de los marcadores biológicos APEX, CYFRA 21-1 y proGRP, respectivamente, y se utiliza la combinación de marcadores en la evaluación del LC.

En todavía otro método preferente adicional según la presente invención se determina por lo menos la concentración de los marcadores biológicos APEX, CYFRA 21-1 y SCC, respectivamente, y se utiliza la combinación de marcadores en la evaluación del LC.

Los ejemplos y figuras siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

Figura 1 La figura 1 muestra un gráfico de las características operativas del receptor (ROC) para la evaluación de 60 muestras obtenidas de pacientes con LC en comparación con 60 muestras de control obtenidas de 30 individuos evidentemente sanos y 30 fumadores aparentemente sanos.

Figura 2 La figura 2 muestra un análisis de transferencia western de lisados de tejido de cáncer pulmonar. Se analizaron tal como se describe en el Ejemplo 5, 5 µg de proteína total procedentes de 20 lisados de tejido de cáncer pulmonar (10 adenoCA y 10 CA de células escamosas) y lisados de los tejidos de control correspondientes.

M = marcador de peso molecular; T = lisado de tejido tumoral; N = lisado de tejido de control correspondiente
PP = grupo de plasmas derivado de donantes sanos (la banda en aproximadamente 60 kD presumiblemente se debe a una reacción de fondo no específica) rec. AG = APEX producido recombinantemente (10, 3 ó 1 ng en cada carril); las flechas indican la posición de APEX.

Ejemplo 1

Identificación de APEX como marcador de cáncer de pulmón

Fuentes del tejido:

Con el fin de identificar proteínas específicas de tumor como marcadores diagnósticos del cáncer de pulmón, se llevó a cabo el análisis de dos tipos diferentes de tejido utilizando métodos proteómicos.

Se analizaron especímenes de tejido procedentes de un total de 11 pacientes que sufrían de cáncer de pulmón. De cada paciente se recogieron dos tipos de tejido diferentes mediante resecciones terapéuticas: tejido tumoral (>80% tumor) (T) y tejido sano contiguo (N). Éste último sirvió como la correspondiente muestra sana de control. Los tejidos inmediatamente se sometieron a congelación instantánea tras la resección y se almacenaron a -80°C antes del procesamiento. Los tumores se diagnosticaron utilizando criterios histopatológicos.

Preparación del tejido:

Se cortaron 0,8 a 1,2 g de tejido congelado en trozos pequeños, se transfirieron al recipiente de molienda frío de un molino mezclador de bolas y se congelaron por completo con nitrógeno líquido. Se pulverizó el tejido en el molino de bolas, se disolvió en un volumen de 10 veces (p/v) de tampón de lisis (citrate de Na 40 mM, MgCl₂ 5 mM, Genapol X-080 al 1%, azida de Na al 0,02%, Complete[®] sin EDTA [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, n° de cat. 1 873 580]) y posteriormente se homogeneizó en un homogeneizador de vidrio Wheaton[®] (20 x poco ajustado, 20 x muy ajustado). El homogenizado se sometió a centrifugación (10' a 5.000 x g), el sobrenadante se transfirió a otro vial y se sometió nuevamente a centrifugación (15' a 20.000 x g). El sobrenadante resultante contenía las proteínas solubles y se utilizó para el análisis posterior.

Preparación de muestras para el análisis de LC-ESI-MSMS:

La concentración de proteínas de la fracción proteica soluble se determinó utilizando un ensayo de proteínas de Bio-Rad[®] (n° de cat. 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual del proveedor. A un volumen correspondiente a 200 µg de proteína se añadieron 4 ml de tampón de reducción (urea 9 M, DTT 2 mM, KH₂PO₄ 100 mM, NaOH, pH 8,2) y se incubó durante 1 hora. Esta solución se concentró a 50 µl en

un dispositivo de ultracentrifugación Amicon® (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y para la alquilación se transfirió a 0,5 ml de tampón para muestras (urea 9 M, yodoacetamida 4 mM, KH₂PO₄ 100 mM, NaOH, pH 8,2) y se incubó durante 6 horas. Tras la alquilación, la solución se concentró en un dispositivo de ultrafiltración Amicon® hasta 50 µl y se añadieron 0,5 ml de urea 9 M, KH₂PO₄ 10 mM, NaOH, pH 8,2, y la solución se concentró nuevamente a 50 µl. Se repitió este procedimiento dos veces. A continuación, se diluyeron los 50 µl finales hasta 990 µl con 4 µg de tripsina (grado Proteomics, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en agua y se digirieron durante la noche.

Análisis de LC-ESI-MSMS:

El digerido triptico (100 µl) se separó mediante HPLC bidimensional (MudPIT) en un sistema Nano-LC (Ultimate, Famos, Switchos; LC Packings, Idstein, Alemania). La separación se llevó a cabo utilizando columnas bidimensionales autoempaquetadas (sílice fusionada: PicoFrit 75 µm, New Objective; RP: ProntoSil 120-5-C18 AQ+, Bischoff; SCX: Partisil 10, Whatman). Se generaron 11 fracciones de SCX mediante elución por etapas con cantidades sucesivamente crecientes de NH₄Ac (0 a 1.500 mM). Se separaron adicionalmente en la parte RP de la columna y se analizaron en línea utilizando barridos dependientes de los datos con una trampa de iones ESIMS (LCQ deca XP; Thermo Electron, Massachusetts, USA; ver la Tabla 1 para los parámetros). Para cada muestra se llevaron a cabo tres análisis. Los datos crudos se procesaron con un sistema de gestión de los datos no comercial propio de Roche utilizando Sequest como algoritmo base (ver los parámetros en la Tabla 1). Las listas resultantes de péptidos y proteínas identificados a partir de repeticiones de análisis se combinaron.

Se identificó la proteína APEX mediante la ayuda de las secuencias identificadas y proporcionadas en la Tabla 2.

Detección de APEX como marcador de cáncer de pulmón:

Para cada paciente se compararon las proteínas identificadas y el número respectivo de péptidos de la muestra tumoral con los resultados correspondientes del tejido normal circundante. De esta manera se encontró que la proteína APEX se encontraba específicamente presente o era muy abundante en el tejido tumoral y no era detectable o prácticamente indetectable en el tejido de control sano.

Tabla 1: Recogida de datos de MSMS y parámetros de búsqueda en base de datos

Recogida de datos de MSMS	Exclusión de MS	350 a 2.000 Da para iones precursores
	Número de repeticiones	2
	Duración de las repeticiones	0,25 min
	Tamaño de la lista de exclusión	50
	Duración de la exclusión	5 min
	Anchura del pico de masas de exclusión	límite inferior 0,5 Da, límite superior 1,5 Da
Sequest	Número de iones	30
	Intensidad iónica mínima	10.000 pulsos
	Tolerancia para masa de precursores	1,5 Da
	Tolerancia para masa de fragmentos	1,0 Da
	Xcorr	>1,8; 2,3, 2,8 (z=1;2;3)
	dCn	> 0,1
	Sp	> 500
Bases de datos		Humangp (compilada por Roche Bioinformatics)

La proteína APEX se encuentra fuertemente sobrerrepresentada en el tejido tumoral de los pacientes que sufren de cáncer de pulmón. Las secuencias peptídicas siguientes de la proteína APEX se identificaron mediante una búsqueda en base de datos a partir de los datos de LCQ-MS² de tejido tumoral: Se identificaron las secuencias siguientes derivadas de APEX, utilizando el método anteriormente descrito.

Tabla 2: Secuencias identificadas mediante ESI-MSMS

Secuencia	Tramo de aminoácidos de APEX
GAVAEDGDEL RTEPEAK	7-23
GLDWVKEEAPDILCLQETK	79-97
KPLVLCGDLNVAHEEIDLR	202-220
QGFGELLQAVPLADSFRR	237-253
VSYGIGDEEHDQEGR	241-255
LDYFLLSHSLLPALCDSK	281-298
ALGSDHCPITLYLAL	303-317/ extremo C-terminal

5 Pudo identificarse APEX en muestras de lisado de tejido tumoral en 5 de 8 pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En lisados de tejido normal no pudo identificarse APEX.

Ejemplo 2

10 Generación de anticuerpos contra la proteína marcadora de cáncer de pulmón APEX

Se generó anticuerpo policlonal contra la proteína APEX marcadora de cáncer pulmonar para la utilización posterior del anticuerpo en la medición de los niveles en suero, plasma y sangre de APEX mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo mediante transferencia western y ELISA.

15 Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*:

Con el fin de generar anticuerpos contra APEX, se produjo el antígeno recombinante en *E. coli*: Por lo tanto, se amplificó por PCR la región codificante de APEX a partir del clon de ADNc de longitud completa IRAT p970H075D obtenido del German Resource Center for Genome Research (RZPD, Berlín, Alemania) utilizando los cebadores siguientes:

Cebador directo LC38for-EcoRI:

5' ACGTACGTGA ATTCATTA AAA GAGGAGAAAT TAACTATGAG AGGATCGCAT CACCATCACC ATCACATTGA
AGGCCGTCCG AAGCGTGGGA AAAAGG (SEC ID nº 2 / sitio EcoRI subrayado y codón de inicio subrayado),

25 Cebador inverso LC38rev-BamHI:

5' CGTACGTGGA TCCTCATTAC AGTGCTAGGT ATAGGGTGAT AGG (SEC ID nº 3 / sitio BamHI subrayado).

30 El cebador directo muestra (aparte de los sitios EcoRI de clonación y de unión ribosómica) los oligonucleótidos codificantes de una extensión peptídica N-terminal MRGSHHHHHHIEGR (SEC ID nº 4) insertados en el marco de lectura del polipéptido APEX. El fragmento de PCR digerido con EcoRI/BamHI se ligó en el fragmento correspondiente del vector pQE-30 (Qiagen, Hilden, Alemania), que posteriormente se transformó en células *E. coli* XL1-blue competentes. Tras el análisis de secuencias, el plásmido se transformó en células *E. coli* BL21 competentes para la expresión bajo el promotor de T5 inducible con IPTG de la serie de vectores pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

35 Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-APEX, se peletizó mediante centrifugación 1 litro de un cultivo bacteriano inducido durante la noche y el pellet celular se resuspendió en tampón de fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, pH 7,4, que contenía 1 mg/ml de lisozima y tabletas de inhibidor de proteasa sin EDTA Complete™. Las células se rompieron mediante ultrasonificación y se peletizó el material insoluble mediante centrifugación y el sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad a metales con Ni-nitrilo-ácido triacético (Ni-NTA): Se lavó la columna con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis, seguido de lavados con tampón de fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM e imidazol 20 mM, pH 7,4. Finalmente, el antígeno unido se eluyó con un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM en tampón de fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, pH 7,4, y se almacenó en tampón HEPES 75 mM, pH 7,5, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM, sacarosa al 6,5% a 4°C.

45 Generación de anticuerpos policlonales:

a) Inmunización

Para la inmunización, se preparó una emulsión fresca de la solución de proteína (100 µl/ml de proteína APEX) y

adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1. Se inmunizó cada conejo con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrajo sangre y el suero anti-APEX resultante se utilizó tal como se describe a continuación.

5 b) Purificación de IgG (inmunoglobulina G) procedente de suero de conejo mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico

10 Se diluyó un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). Se ajustó el pH a 4,5 con base Tris 2 M. Se añadió gota a gota ácido caprílico (25 µl/ml de muestra diluida) bajo agitación vigorosa. Tras 30 minutos, la muestra se centrifugó (13.000 x g, 30 minutos, 4°C), se descartó el pellet y se recogió el sobrenadante. Se ajustó el pH del sobrenadante a 7,5 mediante la adición de base Tris 2 M.

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

Se descartó el sobrenadante. Se disolvió el pellet en NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializó exhaustivamente. Se centrifugó el dializado (13.000 x g, 15 minutos, 4°C) y se filtró (0,2 µm).

20 c) Biotinilación de IgG policlonal de conejo:

25 Se llevó la IgG policlonal de conejo a 10 mg/ml en NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de biotín-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografió en Superdex 200 (NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG biotinilada.

25 d) Inmunsorción de IgG policlonal de conejo:

30 Para el inmunsorbente de APEX se acoplaron 10 mg de APEX recombinante purificado a 1 ml de Sepharose™ 4B activado con CNBr (GE Healthcare, Alemania, nº de catálogo 17-04-30-01) según el protocolo del fabricante. En esta columna de afinidad se cargaron 100 mg de IgG policlonal de conejo en PBS, Tween-20 al 0,05%, seguido de lavado con: a) PBS, b) cloruro sódico 0,5 M, Tween-20 al 0,05%, c) cloruro sódico 30 mM. La fracción unida se eluyó con glicina 0,5 M, cloruro sódico 150 mM ajustado a pH 2,1 con ácido hidrocórico e inmediatamente se llevó a pH neutro mediante la adición de base Tris 1 M. El eluido se concentró a 10 mg/ml y se cromatografió en una columna de filtración en gel TSK-Gel® G3000SW (Sigma-Aldrich, Alemania, nº de catálogo 815103) en PBS. Se recogieron las fracciones que contenían monómeros de IgG.

Ejemplo 3

40 ELISA para la medición de APEX en muestras humanas de suero y plasma.

Para la detección de APEX en suero o plasma humano, se reveló un ELISA de tipo sándwich. Para la captura del antígeno, se inmuoabsorbió anticuerpo policlonal anti-APEX (ver el Ejemplo 2), y para la detección del antígeno se conjugó con biotina el anticuerpo policlonal anti-APEX.

45 Se incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-APEX inmuoabsorbido, durante 60 minutos a razón de 5 µg/ml en carbonato disódico 150 mM, hidrogenocarbonato sódico 350 mM. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS y Tween-20 al 0,05%. Seguidamente los pocillos se incubaron durante 2 horas con una dilución en serie de la proteína recombinante (ver el Ejemplo 2) a modo de antígeno estándar o con muestras de plasma diluido procedentes de pacientes, conjuntamente con 5 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-APEX biotinilado. La incubación se llevó a cabo en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween-20 al 0,1%. A continuación, las placas se lavaron tres veces para eliminar los componentes no unidos. En la siguiente etapa, los pocillos se incubaron con 20 mU/ml de conjugado anti-biotina-POD durante 60 minutos en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween-20 al 0,1%. A continuación, las placas se lavaron tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos de antígeno-anticuerpo unidos, los pocillos se incubaron con 100 µl de solución de ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11685767) y se midió la DO tras 30 a 60 minutos a 405 nm con un lector de ELISA.

Ejemplo 4

60 Población de estudio

Se utilizaron muestras derivadas de 60 pacientes de NSCLC bien caracterizados (30 de adeno-CA y 30 de CA de células escamosas) con la clasificación de la UICC, proporcionada en la Tabla 3.

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	24
UICC III	17
UICC IV	19
donantes de sangre evidentemente sanos	30
Fumadores aparentemente sanos	30

5 Se evaluó el nivel de APEX en las muestras de LC de la Tabla 3 en comparación con 60 muestras de control obtenidas de 30 individuos evidentemente sanos y 30 fumadores aparentemente sanos sin ninguna enfermedad pulmonar maligna conocida (=cohorte de control).

El nivel de APEX en las muestras de LC de la Tabla 3 se encontraba incrementado en comparación con el nivel de APEX en las muestras de control.

10 Se llevó a cabo un análisis ROC según Zweig M.H. y Campbell, *supra*. El poder discriminante de diferenciación de pacientes en el grupo de LC respecto de los individuos sanos medido a partir del área bajo la curva se encontró que era de 92% para LC vs. los controles sanos (figura 1).

15 A una especificidad de 95%, la sensibilidad para todas las muestras de LC era de 70%; para los adenocarcinomas, de 67%, y para el carcinoma de células escamosas, de 73%, respectivamente

Ejemplo 5

20 Transferencia western para la detección de APEX en tejido de cáncer de pulmón humano utilizando anticuerpo policlonal tal como el generado en el Ejemplo 2.

Se prepararon listados de tejido procedente de muestras de tumor y de muestras de controles sanos tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, "Preparación de tejidos".

25 Se llevaron a cabo el SDS-PAGE y la transferencia western utilizando reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido sometida a ensayo, se diluyeron 15 µg de lisado de tejido en tampón SDS reductor para muestras NuPAGE® (Invitrogen) y se calentaron durante 10 minutos a 95°C. Las muestras se corrieron en geles de NuPAGE® al 4-12% (Tris-glicina) en el sistema tampón de migración MES. La mezcla de proteínas separada en gel se transfirió a membranas de nitrocelulosa utilizando el módulo de transferencia Invitrogen XCell II® (Invitrogen) y el sistema tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas se lavaron 3 veces en PBS/Tween-20 al 0,05% y se bloquearon con tampón de bloqueo Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 horas. El anticuerpo primario, suero anti-APEX policlonal de conejo (se describe la generación en el Ejemplo 2) se diluyó 1:10.000 en tampón de bloqueo Roti®-Block y se incubó con la membrana durante 1 hora. Las membranas se lavaron 6 veces en PBS/Tween-20 al 0,05%. El anticuerpo primario de conejo unido específicamente se marcó con un anticuerpo de oveja anti-IgG de conejo policlonal conjugado con POD, diluido a 10 mU/ml en 0,5x tampón de bloqueo Roti®-Block. Tras la incubación durante 1 hora, las membranas se lavaron 6 veces en PBS/Tween-20 al 0,05%. Para la detección del anticuerpo anti-conejo conjugado con POD ligado, la membrana se incubó con el sustrato de transferencia western Lumi-Light^{PLUS} (n° de pedido 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expuso a una película autorradiográfica.

40 Se incrementó la intensidad de la señal de APEX en 16 de 20 lisados de tejido tumoral obtenidos de 20 pacientes de LC diferentes (fig. 2). El nivel de expresión era >600 ng/mg. De esta manera, la abundancia incrementada de APEX en tejido de cáncer de pulmón detectada mediante MALDI en el Ejemplo 1 se confirmó mediante análisis de transferencia western.

45

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

5 <120> Apex como marcador de cáncer de pulmón

<130> 39943P EP

10 <160> 4

<170> PatentIn versión 3.3

15 <210> 1
<211> 318
<212> PRT
<213> Homo sapiens

20 <220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(318)
<223> APEX

25 <400> 1

ES 2 384 125 T3

Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val Ala Glu Asp Gly Asp Glu
1 5 10 15

Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ala Lys Lys
20 25 30

Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu Tyr Glu Asp Pro
35 40 45

Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys Pro Ala Thr Leu Lys Ile
50 55 60

Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala Trp Ile Lys Lys Lys Gly
65 70 75 80

Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp Ile Leu Cys Leu Gln Glu
85 90 95

Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala Glu Leu Gln Glu Leu Pro
100 105 110

Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Ser Asp Lys Glu Gly Tyr
115 120 125

Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys Pro Leu Lys Val Ser Tyr
130 135 140

Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu Gly Arg Val Ile Val Ala
145 150 155 160

Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala Tyr Val Pro Asn Ala Gly

ES 2 384 125 T3

					165					170						175
Arg	Gly	Leu	Val	Arg	Leu	Glu	Tyr	Arg	Gln	Arg	Trp	Asp	Glu	Ala	Phe	
			180					185					190			
Arg	Lys	Phe	Leu	Lys	Gly	Leu	Ala	Ser	Arg	Lys	Pro	Leu	Val	Leu	Cys	
		195					200					205				
Gly	Asp	Leu	Asn	Val	Ala	His	Glu	Glu	Ile	Asp	Leu	Arg	Asn	Pro	Lys	
	210					215					220					
Gly	Asn	Lys	Lys	Asn	Ala	Gly	Phe	Thr	Pro	Gln	Glu	Arg	Gln	Gly	Phe	
225					230					235					240	
Gly	Glu	Leu	Leu	Gln	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Asp	Ser	Phe	Arg	His	Leu	
				245					250					255		
Tyr	Pro	Asn	Thr	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Phe	Trp	Thr	Tyr	Met	Met	Asn	
			260					265					270			
Ala	Arg	Ser	Lys	Asn	Val	Gly	Trp	Arg	Leu	Asp	Tyr	Phe	Leu	Leu	Ser	
		275					280					285				
His	Ser	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Cys	Asp	Ser	Lys	Ile	Arg	Ser	Lys	Ala	
	290					295					300					
Leu	Gly	Ser	Asp	His	Cys	Pro	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Ala	Leu			
305					310					315						

<210> 2
 <211> 96
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> cebador directo LC38for-EcoRI

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(96)

15 <400> 2
 acgtacgtga attcattaa gaggagaaat taactatgag aggatcgcac caccatcacc 60
 atcacattga aggccgtccg aagcgtggga aaaagg 96

<210> 3

<211> 43
<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> cebador inverso LC38rev-BamHI
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(43)

10 <400> 3

cgtacgtgga tcctcattac agtgctaggt ataggggat agg 43

<210> 4
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> extensión peptídica

<220>
<221> PÉPTIDO
<222> (1)..(14)

<400> 4

Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar el cáncer de pulmón *in vitro*, que comprende medir en una muestra la presencia o la concentración, o ambos, de:
- 5 (a) AP endonucleasa (APEX) en una muestra seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales,
(b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer de pulmón, y
(c) utilizando el resultado de la medición de la etapa (a), y opcionalmente de la etapa (b), en la evaluación del cáncer de pulmón, en el que la detección del incremento de la presencia o concentración, o ambos, de APEX, es indicativo de cáncer de pulmón.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que el otro o los otros marcadores anteriormente indicados se seleccionan de entre el grupo que consiste del fragmento soluble de 30 kDa de la citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembrionario (CEA), la enolasa específica de las neuronas (NSE), proGRP y el antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC).
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que el otro u otros marcadores anteriormente indicados son CYFRA 21-1.
- 20 4. Método según la reivindicación 2, en el que el otro u otros marcadores anteriormente indicados son CEA.
5. Método según la reivindicación 2, en el que el otro u otros marcadores anteriormente indicados son SCC.
- 25 6. Utilización de APEX en la evaluación *in vitro* del cáncer de pulmón en una muestra seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, en la que la detección del incremento de la presencia o concentración, o ambos, de APEX, es indicativo de cáncer de pulmón.
- 30 7. Utilización de un panel de marcadores que comprende APEX y otro u otros marcadores de cáncer de pulmón en la evaluación *in vitro* del cáncer de pulmón, en una muestra seleccionada de entre extractos de tejido y líquidos corporales, en la que la detección del incremento de la presencia o concentración, o ambos, de APEX, es indicativo de cáncer de pulmón.
8. Utilización del panel de marcadores según la reivindicación 7, en la que se selecciona otro u otros marcadores de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, CEA, NSE y SCC.
- 35 9. Utilización de un panel de marcadores según la reivindicación 8, que comprende por lo menos APEX y CYFRA 21-1.

Figura 1

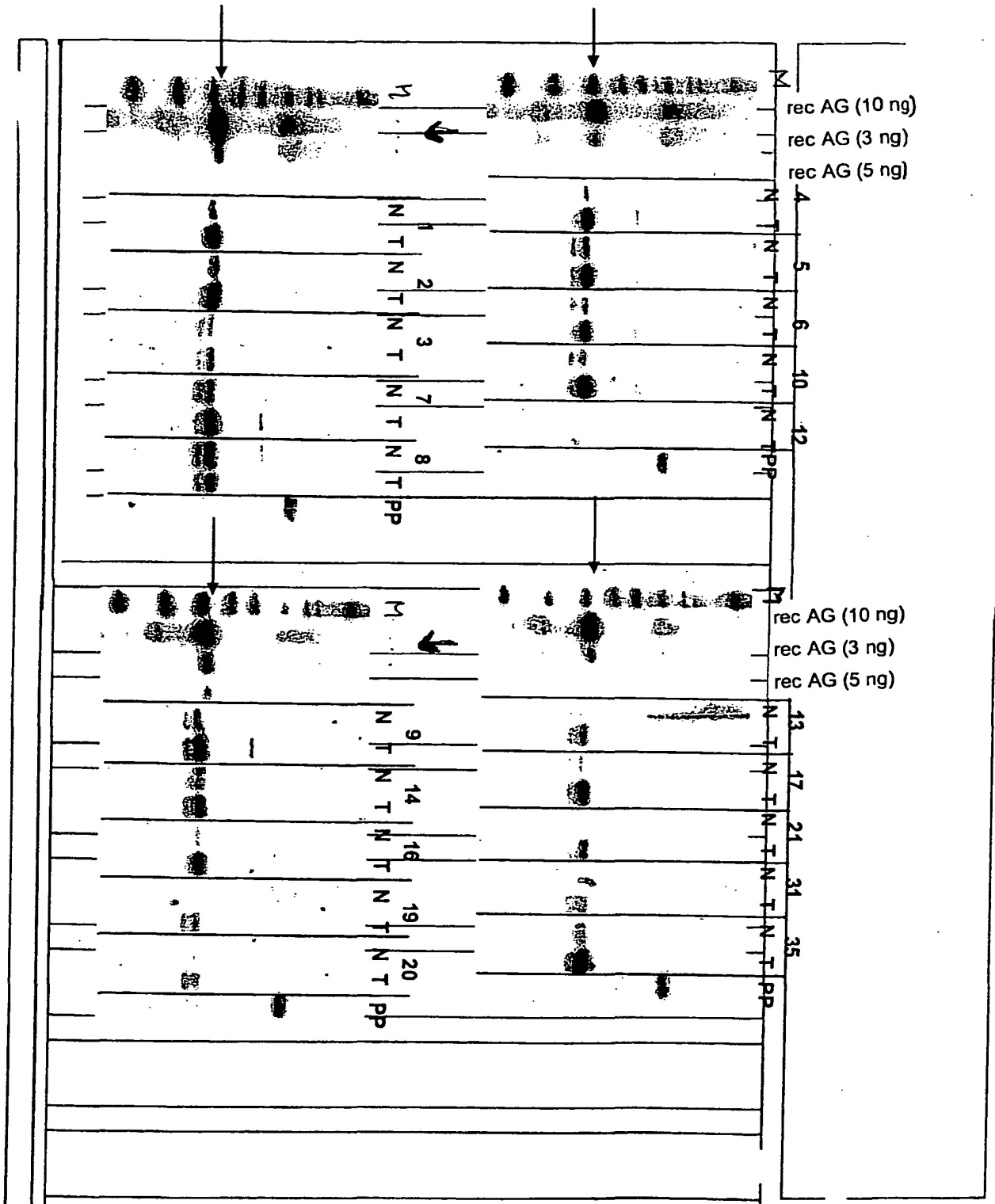


Fig. 2

