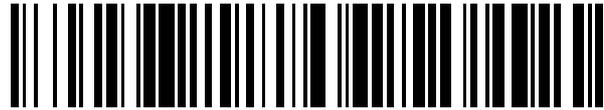


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 408 964**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2009 E 09772167 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2297581**

54 Título: **ASC como marcador del cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

**03.07.2008 EP 08012070**

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

**24.06.2013**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
Grenzacherstrasse 124  
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**ANDRES, HERBERT;  
HAGMANN, MARIE-LUISE;  
KARL, JOHANN;  
ROESSLER, MARKUS y  
TACKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 408 964 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

ASC como marcador del cáncer de pulmón.

5 La presente invención se refiere a un método de ayuda a la evaluación del cáncer pulmonar o de pulmón (=CP) y en particular a la evaluación del carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP). Da a conocer la utilización de "proteína puntiforme asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa" (ASC) como un marcador del CP, particularmente del CPCNP. Además, se refiere especialmente a un método de evaluación del cáncer de pulmón a partir de una muestra líquida, derivada de un individuo mediante la medición de ASC en dicha muestra. La medición de ASC puede utilizarse, por ejemplo, en la detección precoz del cáncer de pulmón o en el seguimiento de pacientes sometidos a cirugía.

15 El cáncer sigue siendo un importante reto de la salud pública a pesar de los avances en detección y terapia. Entre los diversos tipos de cáncer, el CP es un cáncer frecuente en el mundo occidental y entre las causas más frecuentes de mortalidad relacionada con el cáncer. Esto se debe en gran parte a la brecha diagnóstica de detección precoz de la enfermedad. El CP es generalmente asintomático en sus primeros estadios. La mayoría de los cánceres de pulmón se detectan en un estadio tardío, cuando la enfermedad ya es inoperable.

20 La mayoría de tumores de CP pueden clasificarse en carcinoma de pulmón de células pequeñas (CPCP) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). El CPCP constituye aproximadamente 20% a 25% de todos los casos de cáncer de pulmón. El CPCP es un CP de tipo neuroendocrino agresivo y presenta un pronóstico muy pobre incluso en el caso de que se detecte en las primeras etapas. El CPCP raramente se presta al tratamiento curativo mediante resección. Debido a la velocidad a la que avanza la enfermedad, el CPCP generalmente se clasifica en sólo dos estadios: enfermedad limitada y enfermedad extensa, y no en el sistema más complejo de estadificación TNM (ver posteriormente). Aproximadamente 75% a 80% de los casos de CP se agrupan en la clase del CPCNP, incluyendo el carcinoma de células escamosas (carcinoma=CA), el adenoCA (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 tumores de células gigantes, CA de células claras, CA adenoescamoso y CA no diferenciado).

30 El CPCNP, detectado 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 pueden realizarse generalizaciones sobre el pronóstico y la elección de la terapia.

35 Actualmente, el sistema TNM es el sistema de clasificación más ampliamente utilizado, el cual se basa en la extensión anatómica del cáncer. Representa un sistema de estadificación uniforme aceptado internacionalmente. Existen tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estatus de los nódulos linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis distantes). Los criterios del TNM son publicados por la UICC (International Union Against Cancer), edición 1997 (Sobin L.H. y Fleming I.D., TNM 80:1803-4, 1997).

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

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

55 Lo que resulta especialmente importantes es que el diagnóstico precoz del CPCNP se traduce en un pronóstico mucho mejor. Los pacientes diagnósticos incluso ya en el estadio Ia (T1N0M0), Ib (T2N0M0), IIa (T1N1M0), IIb (T3N0M0) y IIIa (T3N1M0), en el caso de que reciban el tratamiento correcto presentan una probabilidad de hasta el 80% de supervivencia a 5 años tras el diagnóstico. Este dato debe compararse con una tasa de supervivencia a 5 años inferior al 1% para los pacientes diagnosticados una vez han aparecido metástasis distantes.

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

65 Resulta preferente que el CP se evalúe en un estadio entre Ia y IIIa.

La mayoría de cánceres de pulmón se detectan cuando se vuelven 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 controversia respecto a lo adecuados que resultan estos medios para los cribados masivos.

5 Existen varios marcadores tumorales séricos para los cánceres de pulmón que están en uso clínico. El fragmento soluble de 30 kDa de la citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembrionario (ACE), la enolasa específica neuronal (EEN) y el antígeno del carcinoma de células escamosas (CCE) son los marcadores de CP más destacados. Sin embargo, ninguno de ellos cumple los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para 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 clínica, un marcador diagnóstico nuevo utilizado como marcador único debe ser comparable a otros marcadores conocidos de la técnica, o mejor. Alternativamente, un nuevo marcador debe conducir a un avance en la sensibilidad y/o especificidad diagnóstica, tanto si se utiliza solo como en combinación con otro u otros marcadores, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnóstica de un ensayo se evalúa mejor a partir de las características operativas del receptor, las cuales se describen en detalle posteriormente.

15 La sangre completa, el suero o el plasma son las fuentes más ampliamente utilizadas de muestras en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral temprano del CP que ayudase en la detección fiable del cáncer o que proporcionase información pronóstica temprana podría conducir a un método de gran ayuda en el diagnóstico y control de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejora de la evaluación *in vitro* del CP. Resulta especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz del CP, ya que para los pacientes diagnósticos precozmente la probabilidad de supervivencia es mucho más alta que para los diagnosticados en un estadio avanzado de la enfermedad. Existe una necesidad urgente especialmente de métodos para el seguimiento fiable de un tratamiento del CP, el cribado de individuos para el CP y el ensayo para la recurrencia del cáncer de pulmón tras la terapia del mismo.

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

25 En la actualidad CYFRA 21-1 se considera el mejor de los marcadores tumorales conocidos actualmente para el cáncer de pulmón. Aunque no es específico de órgano, se encuentra predominantemente en el tejido pulmonar. La sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón se ha descrito que es de entre 46% y 61% a una especificidad del 95% respecto a otras enfermedades pulmonares benignas. Los niveles séricos incrementados de CYFRA 21-1 también se asocian con enfermedades hepáticas benignas pronunciadas, insuficiencia renal y cáncer de vejiga invasivo. Se recomienda el análisis para CYFRA 21-1 en el seguimiento postoperatorio de la terapia.

30 El ACE pertenece al grupo de los antígenos carcinofetales, producido habitualmente durante la embriogénesis. El ACE no es específico de órgano y se utiliza predominantemente para el seguimiento del cáncer colorrectal. Aparte de los tumores malignos, también varias enfermedades benignas tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis y las enfermedades autoinmunitarias se asocian a niveles séricos incrementados de ACE. Con una especificidad del 95% para las enfermedades de pulmón benignas, se informa que su sensibilidad para el cáncer de pulmón es de entre 29% y 44%. Un uso preferente del ACE es el seguimiento de la terapia del cáncer de pulmón.

35 La EEN es un marcador tumoral del CPCP. Generalmente, los niveles incrementados de EEN se observan asociados a tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos.

40 También se observan niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades pulmonares y cerebrales benignas, tales como la meningitis u otras enfermedades inflamatorias del cerebro y en lesiones traumáticas de la cabeza. Aunque la sensibilidad para el CPCP a una especificidad del 95% se informa que es de entre 60% y 87%, el rendimiento del ensayo para la EEN en el CPCNP es pobre (sensibilidad de entre 7% y 25%). Se recomienda la EEN para el seguimiento de la terapia del CPCP.

45 El pro-GRP es un marcador tumoral que resulta útil en la detección y seguimiento del CPCP. También se observan niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades pulmonares/pleurales no malignas, tales como la fibrosis pulmonar idiopática o la sarcoidosis. Aunque la sensibilidad para el pro-GRP en el campo del CPCP (con una especificidad del 95%) se informa que es de entre 47% y 86%, el rendimiento de los ensayos de pro-GRP en el campo del CPCNP es pobre debido a una sensibilidad publicada inferior al 10%.

50 El CCE fue originalmente identificado en el CA de células escamosas del cérvix. La sensibilidad del CCE para el CP es generalmente baja (18% a 27%). Por lo tanto, el ensayo del CCE se considera inadecuado para el cribado. Sin embargo, debido a la mayor sensibilidad para el CA de células escamosas, un uso preferente del CCE es el seguimiento de la terapia, aunque CYFRA 21-1 generalmente funciona mejor.

55 Con respecto a los perfiles de marcadores y el objetivo de un mejor diagnóstico del cáncer de pulmón, se ha publicado un método (Schneider J. *et al.*, Int. J. Clin. Oncol. 7:145-151, 2002) utilizando algoritmos de clasificación

- 5 basados en lógica difusa para combinar los niveles séricos de CYFRA 21-1, EEN y proteína C-reactiva (PCR), que es un marcador general de inflamación. Los autores informan de una sensibilidad de 92% a una especificidad de 95%. Sin embargo, en dicho estudio se informa que la sensibilidad de CYFRA 21-1 como único marcador tumoral es de 72% a una especificidad de 95%, que es significativamente superior a la citada en muchos otros estudios publicados. Duffy M.J, en *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 38:225-262, 2001, informan de una sensibilidad de entre 46% y 61%. Este rendimiento inusualmente alto conseguido por Schneider *et al.* plantea algunas dudas y podría deberse a varios factores. En primer lugar, el grupo de pacientes de control aparentemente es más joven que el grupo de pacientes, es decir, los grupos no están bien emparejados por edad, y el grupo de pacientes comprende muchos estadios tardíos. En segundo lugar, y más críticamente, el rendimiento del algoritmo se comprueba en muestras del conjunto de entrenamiento que han sido utilizadas para determinar los cuantificadores de lógica difusa. Por lo tanto, dichos cuantificadores han sido, en términos estrictos, "creados a medida" para este conjunto y no aplicados a un conjunto de validación independiente. Bajo circunstancias normales, debe esperarse que el mismo algoritmo aplicado a un conjunto de validación de mayor tamaño, independiente y bien equilibrado, conducirá a un rendimiento global significativamente reducido.
- 10
- 15 El objetivo de la presente invención era identificar un marcador bioquímico que pueda utilizarse en la evaluación del CP.
- 20 Inesperadamente se ha encontrado que la utilización del marcador ASC (proteína puntiforme asociada a apoptosis que contiene un CARD) puede superar por lo menos parcialmente algunos de los problemas de los marcadores conocidos actualmente en el estado de la técnica.
- La presente invención se define según las reivindicaciones adjuntas.
- 25 La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer de pulmón *in vitro*, que comprende medir en una muestra la presencia y/o la concentración de ASC, y utilizar el resultado de la medición, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer de pulmón.
- 30 En realizaciones preferentes, el nuevo marcador ASC puede utilizarse para fines de seguimiento, así como de cribado.
- 35 En el caso de que se utilice para el seguimiento de pacientes, el método diagnóstico según la presente invención podría ayudar a evaluar la carga tumoral, la eficacia del tratamiento y la recurrencia tumoral durante el seguimiento de los pacientes. Los niveles incrementados de ASC se correlacionan directamente con la carga tumoral. Tras la quimioterapia un incremento a corto plazo (pocas horas a 14 días) de ASC podría servir como indicador de la muerte de células tumorales. En el seguimiento de los pacientes (entre 3 meses y 10 años), puede utilizarse un incremento de ASC como indicador de la recurrencia tumoral.
- 40 En una realización preferente, el método diagnóstico según la presente invención se utiliza con fines de cribado. Es decir, se utiliza para evaluar sujetos sin un diagnóstico previo de CP mediante la medición del nivel de ASC y la correlación del nivel medido con la presencia o ausencia de CP.
- 45 La presente invención se refiere además a un método para evaluar el CP *in vitro* con marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la presencia y/o la concentración de ASC y otro u otros marcadores de CP y la utilización de los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas en la evaluación del CP. Resulta preferente que el otro u otros marcadores de CP se seleccionen de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRP y CCE.
- 50 La presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende ASC y uno o más marcadores adicionales en la evaluación del CP, en el que un marcador adicional preferente se selecciona de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRp y CCE.
- 55 La presente invención, en una realización preferente, se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos ASC y CYFRA 21-1 en la evaluación del CP.
- 60 La presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende por lo menos ASC y ACE en la evaluación del CP.
- 65 Se da a conocer además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos necesarios para medir específicamente ASC y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.
- Se da a conocer además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por lo

menos los reactivos necesarios para medir específicamente ASC y CYFRA 21-1, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.

5 Se da a conocer además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos necesarios para medir específicamente ASC y ACE, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.

10 Se da a conocer además un kit para llevar a cabo el método según la presente invención, que comprende por lo menos los reactivos necesarios para medir específicamente ASC y CCE, respectivamente, y opcionalmente reactivos auxiliares para llevar a cabo las mediciones.

15 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 y/o la concentración de: a) ASC, y b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer de pulmón, y c) utilizar 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.

20 El término "medición" comprende una medición cualitativa o cuantitativa de ASC en una muestra. En una realización preferente, la medición es una medición cualitativa o semicuantitativa, es decir, se determina si ASC se encuentra presente o ausente o se determina si la concentración de ASC es superior o inferior a un valor corte. Tal como apreciará el experto en la materia, en un ensayo Sí (presencia)/No (ausencia), la sensibilidad del ensayo habitualmente se fija para que corresponda al 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 fija para que resulte en una especificidad de 90%; también resulta preferente fijar un valor corte que resulte en una especificidad de 95%, o  
25 también resulta preferente fijar un valor de corte que resulte en una especificidad de 98%. La presencia de un valor superior al valor de corte puede ser indicativa, por ejemplo, de la presencia de cáncer de pulmón. En una realización preferente adicional, la medición es una medición cuantitativa. En dicha realización, la concentración de ASC se correlaciona con una cuestión diagnóstica subyacente como, por ejemplo, el estadio de la enfermedad, la progresión de la enfermedad o la respuesta a la terapia.

30 La expresión "proteína puntiforme asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa" (ASC), también conocida como "diana de silenciamiento inducido por metilación-1" (TMS1) (Swiss-PROT: Q9ULZ3) se caracteriza por la secuencia proporcionada en SEC ID nº 1. ASC presenta un peso molecular teórico de 21.627 Da y un punto isoelectrónico teórico de pH 6,29.

35 Los dominios de reclutamiento asociados a caspasa (CARD) median en la interacción entre las proteínas adaptadoras, tales como APAF1 (factor-1 activador de proteasa apoptótica) y la proforma de caspasas (por ejemplo CASP 9) que participan en la apoptosis. ASC es un miembro de la familia de proteínas adaptadoras que contienen CARD.

40 Mediante inmunocribado de una línea celular promielocítica, Masumoto *et al.* aislaron un ADNc codificante de ASC. La proteína deducida de 195 aminoácidos contiene un dominio N-terminal de tipo pirina (PYD) y un CARD C-terminal de 87 residuos. El análisis de transferencia western mostró la expresión de una proteína de 22 kDa e indicó que ASC podría presentar actividad proapoptótica al incrementar la susceptibilidad de las líneas celulares de leucemia a los estímulos apoptóticos de los fármacos anticáncer (Masumoto J. *et al.*, J. Biol. Chem. 274:33835-33838, 1999).

45 Los análisis de PCR de restricción sensible a la metilación y de PCR específica de metilación (MSP) de Conway *et al.* indicaron que el silenciamiento de ASC se correlacionaba con la hipermetilación de la isla CpG que circundaba al exón1 y que la sobreexpresión de DNMT1 (ADN citosín-5-metiltransferasa-1) estimula la hipermetilación y el silenciamiento de ASC. Las líneas celulares de cáncer de mama, pero no el tejido mamario normal, mostraban una metilación completa de ASC y no expresaban ningún mensaje de ASC. La expresión de ASC en líneas celulares de cáncer de mama inhibió el crecimiento y redujo el número de colonias supervivientes. Conway *et al.* concluyeron que ASC funciona estimulando la apoptosis dependiente de caspasa y que la sobreexpresión de ASC inhibe el crecimiento de las células de cáncer de mama (Conway K.E. *et al.*, Cancer Research 60:6236-6242, 2000).

55 McConnell y Vertino demostraron que la expresión inducible de ASC inhibe la proliferación celular y que induce fragmentación del ADN que puede ser bloqueada por inhibidor de caspasa. La microscopía de inmunofluorescencia demostró que la inducción de la apoptosis provoca un desplazamiento dependiente de CARD desde la expresión citoplasmática difusa a agregados perinucleares esféricos (McConnell B.B. y Vertino P.M., Cancer Research 60:6243-6247, 2000). Moriani *et al.* observaron metilación del gen ASC no sólo en las células de cáncer de mama sino también en el cáncer gástrico. Propusieron un papel directo de la metilación aberrante del gen ASC en la progresión del cáncer de mama y gástrico que implica la regulación negativa del gen ASC proapoptótico (Moriani R. *et al.*, Anticancer Research 22:4163-8, 2002).

65 Conway *et al.* examinaron tejidos primarios de mama para la metilación TMS1 y compararon los resultados con la metilación en tejidos sanos (Conway K.E. *et al.*, Cancer Research 60:6236-6242, 2000). Levine *et al.* encontraron

- 5 que el silenciamiento de ASC no se correlacionaba con la metilación de sitios CpG específicos, sino que se asociaba a metilación densa de la isla CpG de ASC. Las líneas celulares de tumor mamario que contienen exclusivamente copias metiladas de ASC no expresan ASC, mientras que en líneas celulares parcialmente metiladas, los niveles de expresión de ASC se relacionan directamente con el porcentaje de alelos de ASC metilados presentes en la población celular (Levine J.J. *et al.*, *Oncogene* 22:3475-3488, 2003).
- 10 Virmani *et al.* examinaron el estado de metilación de ASC en tejido de cáncer de pulmón y de cáncer de mama. Encontraron que la metilación aberrante de ASC se encontraba presente en 46% de las líneas celulares de cáncer de mama y en 32% del tejido de tumor de mama. La metilación era infrecuente en el tejido mamario no maligno (7%) (Virmani A. *et al.*, *Int. J. Cancer* 106:198-204, 2003).
- 15 Zhang *et al.* describen ASC como un gen supresor tumoral que resulta frecuentemente inactivado por la metilación *de novo* del promotor en el cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP). Los autores concluyeron que la hipermetilación del promotor de ASC es un suceso común en pacientes con CPCNP primario que se asocia a una menor supervivencia (Zhang Z. *et al.*, *Clin. Lung Cancer* 8(1):62-65, 2006).
- 20 Shiohara *et al.* encontraron que la regulación positiva de ASC se encuentra estrechamente asociada a inflamación y apoptosis en neutrófilos humanos (Shiohara M. *et al.*, *Blood* 98:229a, 2001).
- Masumoto *et al.* observaron que se expresan abundantemente niveles elevados de ASC en las células epiteliales y leucocitos (Masumoto J. *et al.*, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49:1269-1275, 2001).
- 25 Los documentos WO n° 2006/066915 A1 y n° 2006/066917 A2 describen ASC como un marcador tumoral indicativo de cáncer colorrectal.
- 30 El documento WO n° 2005/040806 A2 da a conocer que ASC es un marcador adecuado para el diagnóstico del cáncer de mama.
- En el documento WO n° 2008/063655 se describe un método para identificar metástasis y particularmente micrometástasis mediante la detección de la hipermetilación de ácidos nucleicos y el silenciamiento que resulta de la misma de uno o más genes en una muestra. Como gen se menciona, entre otros, ASC.
- 35 El documento WO n° 01/29235 da a conocer métodos para diagnosticar el cáncer, que comprenden al determinación del nivel de metilación del gen ASC (TMS1) o la medición del perfil de expresión de TMS1 en una muestra, tal como por ejemplo la sangre. Ésta última comprende la medición del polipéptido TMS1, en la que una concentración baja de TMS1 resulta de la presencia de enfermedad tumoral.
- 40 [0055] Schneider (*Adv. Clin. Chem.* 42: 1-41, 2006) revisan los marcadores tumorales utilizados en la detección del cáncer de pulmón y también mencionan los paneles de marcadores.
- 45 Machida *et al.*, *Cancer Research* 66(12):6210-6218, junio de 2006 (2006-06), enseñan una asociación entre una hipermetilación del gen ASC y un nivel de expresión de ASC reducido con el cáncer de pulmón.
- De esta manera, una hipermetilación de ASC se correlaciona con estadios tumorales avanzados.
- 50 Resulta interesante que ninguno de los documentos anteriormente indicados sugiere que una determinación de ASC en extractos de tejidos y en líquidos corporales permita la evaluación del cáncer de pulmón. Inesperadamente, se ha encontrado en la presente invención que una determinación de la presencia y/o cantidad de ASC en una muestra de lisado de tejido y/o de líquido corporal permite la evaluación del cáncer de pulmón. Además, los inventores han encontrado que resulta posible una evaluación fiable del CP mediante la medición de ASC en una muestra de líquido procedente de un individuo, es decir, no resulta necesario tejido ni muestra de biopsia en el diagnóstico del CP al utilizar la proteína ASC como marcador. Todavía más inesperadamente, se ha encontrado que un nivel incrementado de ASC medido en un líquido corporal procedente de un individuo se asocia a cáncer de pulmón.
- 55 Tal como resultará evidente para el experto en la materia, la presente invención no debe entenderse como limitada a la proteína de longitud completa ASC de SEC ID n° 1. Los fragmentos fisiológicos o artificiales de ASC, las modificaciones secundarias de ASC, así como las variantes alélicas de ASC, también se encuentran comprendidas en la presente invención. Los fragmentos artificiales preferentemente comprenden un péptido producido sintéticamente o por medios recombinantes, que por lo menos comprende un epítipo de interés diagnóstico que
- 60 consiste de por lo menos 6 aminoácidos contiguos, tal como se deriva de la secuencia dada a conocer en SEC ID n° 1. Dicho fragmento puede utilizarse ventajosamente para la generación de anticuerpos o como un estándar en un inmunoensayo. Más preferentemente, el fragmento artificial comprende por lo menos dos epítopos de interés apropiados para montar un inmunoensayo de tipo sándwich.
- 65 Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado a los mismos 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, por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, "un marcador" se refiere a un marcado o a más de un marcador. La expresión "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente pueden encontrarse presentes uno o más objetos adicionales. A título de ejemplo, un panel de marcadores que comprende por lo menos (los marcadores) ASC 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; también resultan preferentes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula que debe utilizarse como diana para analizar una muestra de ensayo de un paciente. En una realización, son ejemplos de dichas dianas moleculares, proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcadores en la presente invención se contempla que incluyen variantes naturales de dichas proteínas, así como fragmentos de dichas proteínas o de dichas variantes, en particular fragmentos inmunológicos detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables 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 que son liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo durante la inflamación, y podrían resultar degradadas o cortadas en dichos fragmentos. Determinados marcadores son sintetizados en una forma inactiva, que posteriormente puede activarse mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, también pueden encontrarse presentes proteínas o fragmentos de los mismos 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, pero pueden diferir en su punto isoeléctrico (=PI) o peso molecular (=PM), o ambas, por ejemplo como resultado del procesamiento alternativo de ARNm o 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 ASC se mide específicamente de una muestra mediante la utilización de un agente de unión específico.

Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor de ASC, una lectina de unión a ASC o un anticuerpo de ASC. Un agente de unión específico 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 de  $10^9$  l/mol para su molécula diana. Tal como apreciará el experto en la materia, el específico se utiliza para indicar que otras moléculas biológicas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para ASC. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula biológica diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que presenta una afinidad como máximo de sólo 10% o menos, de sólo 5% o menos, de sólo 2% o menos o de sólo 1% o menos la afinidad de la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica preferente satisfará tanto los criterios mínimos anteriormente indicados de afinidad, como de especificidad.

Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo reactivo con ASC. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, así como constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

Puede utilizarse cualquier fragmento de unión que conserve los criterios anteriormente indicados de un agente de unión específica. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos del estado de la técnica, por ejemplo tal como se describe en Tijssen (Tijssen P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, la obra completa, especialmente las páginas 43 a 78). Además, el experto en la materia conoce perfectamente métodos basados en inmunosorbentes que pueden utilizarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Por estos medios puede incrementarse la calidad de los anticuerpos policlonales y por lo tanto su comportamiento en inmunoensayos (Tijssen P., *supra*, páginas 108 a 115).

Para los resultados dados a conocer en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos policlonales cultivados en conejos. Sin embargo, resulta evidente que también pueden utilizarse anticuerpos policlonales de especies diferentes, por ejemplo de ratas o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Debido a que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales de ASC en un método según la presente invención, respectivamente, representa todavía otras realizaciones preferentes.

Tal como apreciará el experto en la materia, ahora que se ha identificado ASC como marcador que resulta útil en la evaluación del cáncer de pulmón, pueden utilizarse diversos procedimientos inmunodiagnósticos para alcanzar 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, que representan un epítipo de ASC para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con ADN, también conocida como vacunación de ADN.

5 Para las mediciones, la muestra obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específica a ASC bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión-ASC. No resulta necesario especificar dichas condiciones, ya que el experto en la materia podrá identificar fácilmente sin ningún esfuerzo inventivo dichas condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo de agente de unión-ASC se mide y se utiliza en la evaluación del cáncer de pulmón. Tal como apreciará el experto en la materia, existen numerosos métodos para  
10 medir la cantidad del complejo de agente de unión específica-ASC, todos descritos en detalle en los libros de texto relevantes (ver, por ejemplo, Tijssen P., *supra*, o Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores), *Immunoassay*, Academic Press, Boston, 1996).

15 Preferentemente, se detecta ASC en un formato de ensayo de tipo sándwich. En dicho ensayo, se utiliza un primer agente de unión específica para capturar ASC 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.

20 En una realización preferente, la medición de ASC en una muestra se lleva a cabo mediante la utilización de un inmunoensayo de tipo sándwich, en el que se utilizan placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Se utiliza un anticuerpo policlonal biotinilado de ASC como anticuerpo de captura y un anticuerpo policlonal digoxigenilado de ASC como la segunda pareja de unión específica en este ensayo de tipo sándwich. El complejo de tipo sándwich formado se visualiza finalmente mediante un conjugado de anticuerpo anti-digoxigenina-peroxidasa de rábano picante y un sustrato de peroxidasa apropiado.

25 Tal como se ha indicado anteriormente, puede medirse ASC de una muestra líquida obtenida de una muestra individual. No resulta necesaria ninguna muestra de tejido ni biopsia para aplicar el marcador ASC en el diagnóstico del CP.

30 En una realización preferente, el método según la presente invención se pone en práctica con suero como material de muestra líquida.

En una realización preferente adicional, el método según la presente invención se pone en práctica con plasma como material de muestra líquida.

35 En una realización preferente adicional, el método según la presente invención se pone en práctica con sangre completa como material de muestra líquida.

En una realización preferente adicional, el método según la presente invención se pone en práctica con líquido aspirado del pezón como material de muestra líquida.

40 Un "marcador de cáncer de pulmón" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que, en combinación con el marcador ASC, añade información relevante en la evaluación del CP. La información se considera relevante o de valor aditivo en el caso de que, a una especificidad dada, la sensibilidad, o en el caso de que a una sensibilidad dada, la especificidad, respectivamente, para la evaluación del CP, puede mejorarse  
45 mediante la inclusión de dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprende el marcador ASC. Preferentemente, la mejora de la sensibilidad o especificidad, respectivamente, resulta estadísticamente significativa a un nivel de significancia de  $p=0,05$ ,  $0,02$ ,  $0,01$  ó inferior. Preferentemente, el otro u otros marcadores de CP se seleccionen de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRP y CCE.

50 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 de paciente preferentemente puede comprender cualquier líquido corporal o un extracto de tejido. Entre las muestras de ensayo preferentes se incluyen sangre, suero, plasma, esputo y lavado bronquial. Son muestras preferentes, sangre completa, suero, plasma, lavado bronquial o esputo, siendo más preferentes plasma o suero.

55 La expresión "evaluación del cáncer de pulmón" se utiliza para indicar que el método según la presente invención (solo o conjuntamente con otros marcadores o variables, por ejemplo los criterios indicados por la UICC (ver anteriormente)) por ejemplo ayudará al médico a establecer o confirmar la ausencia o presencia de CP o ayudará al médico en el pronóstico, la detección de recurrencia (seguimiento de los pacientes tras la cirugía), el cribado y/o el seguimiento del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

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

65 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el CP *in vitro* mediante

marcadores bioquímicos, que comprende medir en una muestra la concentración de ASC y utilizar la concentración determinada en la evaluación del CP.

5 Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido detectar la proteína marcadora ASC en un porcentaje significativo de muestras derivadas de pacientes con CP. Todavía más inesperadamente, han podido demostrar que la presencia y/o la concentración de ASC en dicha muestra obtenida de un individuo puede utilizarse en la evaluación del cáncer de pulmón.

10 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único suceso o proceso causase la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende por completo, como es el caso del CP. Tal como apreciará el experto en la materia, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad de 100% y simultáneamente una sensibilidad de 100% para una enfermedad multifactorial dada, por ejemplo el CP. Por el contrario, algunos marcadores bioquímicos, por ejemplo CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRP y CCE, o tal como se muestra en la presente memoria, ASC puede utilizarse para evaluar con 15 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 de manera conjunta en el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad subyacente.

20 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 basadas en perlas. Las concentraciones de los marcadores biológicos seguidamente se interpretan independientemente, por ejemplo utilizando un valor de corte individual para cada marcador, o se combinan para la interpretación.

25 En una realización preferente adicional, la evaluación del CP según la presente invención se lleva a cabo en un método que comprende medir en una muestra la presencia y/o la concentración de: a) ASC, y b) otro u otros marcadores de cáncer de pulmón, y c) utilizar los resultados de las mediciones, por ejemplo las concentraciones determinadas en las etapas (a) y (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer de pulmón.

30 En la evaluación del CP, el marcador ASC resulta ventajoso en uno o más de los aspectos siguientes: cribado, ayuda diagnóstica, pronóstico, seguimiento de la terapia, tal como la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia.

Cribado:

35 El cribado se define como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar los individuos, por ejemplos 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 superior al promedio de cáncer de pulmón, tales como fumadores, ex-fumadores y trabajadores expuestos a uranio, cuarzo o amianto. En una realización preferente, se utiliza esputo como muestra en el cribado para cáncer de 40 pulmón.

45 Para muchas enfermedades, ningún marcador bioquímico en la circulación por sí solo cumplirá los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos con fines de cribado. Lo anterior aparentemente también resulta cierto para el cáncer de pulmón. Debe esperarse que resulte necesario utilizar un panel de marcadores que comprenda una pluralidad de marcadores en el cribado del CP. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador ASC formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado con fines de cribado. Por lo tanto, la presente invención se refiere a la utilización de ASC como un marcador de un panel de marcadores del CP, es decir, un panel de marcadores que comprende APEX y uno o más marcadores adicionales con fines de cribado del CP. Se seleccionan marcadores adicionales preferentes de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRP y CCE. 50

Ayuda diagnóstica:

55 Los marcadores pueden ayudar en el diagnóstico diferencial de una enfermedad benigna o maligna en un órgano particular, pueden ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o a establecer valores de línea base de marcadores previamente a la cirugía.

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

65 En una realización preferente, se utiliza el marcador ASC en un método inmunohistológico para establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de CP.

Debido a que ASC como marcador único podría resultar superior a otros marcadores del CP como ACE o EEN, debe esperarse que ASC se utilice como ayuda diagnóstica, especialmente mediante establecimiento de un valor de línea base previamente a la cirugía. De esta manera, la presente invención se refiere además a la utilización de ASC para establecer un valor de línea base antes de la cirugía para CP.

#### 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 cierta probabilidad el resultado de enfermedad. Su uso principal es ayudar a planificar racionalmente el control del paciente, es decir, evitar el infratratamiento de una enfermedad agresiva y el sobretatamiento de una enfermedad indolente. Molina R. *et al.*, Tumor Biol. 24:209-218, 2003, evaluaron el valor pronóstico de ACE, CA-125, CYFRA 21-1, CCE y EEN en el CPCNP. En su estudio, los niveles séricos anormales de los marcadores EEN, ACE y LDH (lactato deshidrogenasa) aparentemente indicaban una supervivencia más corta.

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

#### 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 CPCNP 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 de la respuesta tumoral y de la supervivencia en pacientes de CPCNP de estadio III. Además, algunas publicaciones han descrito la utilización del ACE en el seguimiento del tratamiento de pacientes con CP (Fukasawa T. *et al.*, Cancer & Chemotherapy 13:1862-1867, 1986). La mayoría de estos estudios eran retrospectivos, no aleatorizados y contenían un número pequeño de pacientes. Tal como en el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios con ACE sugieren que: a) los pacientes con una reducción de los niveles de ACE mientras recibían quimioterapia generalmente presentaron un mejor resultado que los pacientes con niveles de ACE que no bajaron, y (b) para prácticamente todos los pacientes, el incremento de los niveles de ACE estaba asociado a progresión de la enfermedad.

Se espera que ASC sea un marcador por lo menos tan bueno para el seguimiento de la quimioterapia como CYFRA 21-1 ó ACE, respectivamente. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a la utilización de ASC en el seguimiento de los pacientes de CP bajo quimioterapia.

#### Seguimiento:

Un gran parte de los pacientes de CP 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 estas recaídas se produjeron en los primeros 2-3 años después de la cirugía. Debido a que la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente fatal si se detecta tarde, mucha investigación se ha centrado en la recaída del CP en un estadio precoz y, de esta manera, en un estadio potencialmente tratable.

En consecuencia, muchos pacientes de CP se someten a un programa postoperatorio de seguimiento que incluye frecuentemente el seguimiento periódico con ACE. El seguimiento seriado con ACE un año después de la resección quirúrgica se ha demostrado que detecta una enfermedad recurrente/metastásica postoperatoria temprana con una sensibilidad de aproximadamente 29% con 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 CP tras la cirugía es uno de los campos de utilización más importantes para un marcador bioquímico apropiado. Debido a la elevada sensibilidad de ASC en los pacientes de CP investigados, es probable que ASC por sí solo o en combinación con otro u otros marcadores resulte de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes de CP, especialmente en los pacientes de CP posteriormente a la cirugía. La utilización de un panel de marcadores que comprenda ASC y otro u otros marcadores del CP en el seguimiento de los pacientes de CP representa una realización preferente adicional de la presente invención.

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

En todavía una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de ASC como molécula marcadora del cáncer de pulmón en combinación con una o más moléculas marcadores del cáncer de pulmón en la evaluación del cáncer de pulmón a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo. Otros

marcadores del CP seleccionados preferentes con los que puede combinarse la medición de ASC son CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRP y/o CCE. Todavía más preferentemente, el panel de marcadores utilizado en la evaluación del CP comprende ASC y por lo menos otra molécula marcadora seleccionada de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1 y ACE.

5 Tal como apreciará el experto en la materia, existen muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores con el fin de mejorar la cuestión diagnóstica que se investiga. En un enfoque bastante simple, aunque sin embargo con frecuencia efectivo, se considera un resultado positivo el caso de que una muestra sea positiva para como mínimo uno de los marcadores investigados. Éste puede ser el caso, por ejemplo, al diagnosticar una enfermedad infecciosa, tal como el SIDA.

15 Sin embargo, frecuentemente se evalúa la combinación de marcadores. Preferentemente, los valores medidos de los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo de ASC y CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores de los marcadores pueden combinarse mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Algunos métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad utilizan métodos tales como el análisis discriminante (AD) (es decir, el AD lineal, cuadrático, regularizado), los métodos núcleo (SVM), los métodos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino k más próximo), los CMP (cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (regresión lógica, CART, los métodos de bosque aleatorio, los métodos de "boosting/bagging"), modelos lineales generalizados (regresión logística), los métodos basados en los componentes principales (SIMCA), los modelos aditivos generalizados, los métodos basados en lógica difusa, las redes neuronales y los métodos basados en algoritmos genéticos. El experto en la materia no tendrá ningún problema en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente, el método utilizado para correlacionar la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo con la ausencia o presencia de CP, se selecciona de entre AD (análisis discriminante lineal, cuadrático, regularizado), métodos núcleo (SVM), métodos no paramétricos (clasificadores del vecino k más próximo), CMP (cuadrados mínimos parciales), métodos basados en árboles (regresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de "boosting") o modelos lineales generalizados (regresión logística). Los detalles relativos a dichos métodos estadísticos se encuentran 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.

40 Una realización preferente de la invención es la utilización de un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y discriminar entre el estado A y el estado B, por ejemplo enfermo y sano. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que formar un panel de marcadores.

45 La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor a partir de sus características operativas de receptor (COR) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de COR es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de modificar continuamente el umbral de decisión a lo largo del rango completo de datos observados.

50 El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o del a 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, la salud y la enfermedad o una enfermedad benigna frente a una maligna.

55 En cada caso, el gráfico de ROC ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones al dibujar la sensibilidad frente a 1-especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados de ensayo verdaderos positivos) / (número de positivos verdaderos + número de resultados de ensayo falsos negativos)]. A lo anterior también se lo 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 de falsos positivos o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos) / (número de verdaderos positivos + número de falsos negativos)]. Es un índice de especificidad y se calcula enteramente a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de verdaderos positivos y de falsos positivos se calculan de manera completamente separada, mediante la utilización de los resultados de ensayo de los dos subgrupos diferentes, el gráfico de COR es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico de COR representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral particular de decisión. Un ensayo con discriminación perfecta (ningún solapamiento de las dos distribuciones de resultados) presenta un gráfico de COR que pasa por la esquina superior izquierda, en la que la fracción de verdaderos positivos es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo de discriminación nula (distribuciones idénticas de

resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45°, de esquina inferior izquierda a esquina superior derecha. La mayoría de gráficos se encuentra entre estos dos extremos. (en el caso de que el gráfico de COR se encuentre completamente bajo la diagonal a 45°, esto se remedia 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, más alta será la exactitud global del ensayo.

Una manera preferente de cuantificar la exactitud diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un solo número. Dicho parámetro global es, por ejemplo, el denominado "error total" o, alternativamente, el "área bajo la curva = ABC". La medida global más común es el área bajo el gráfico COR. Convencionalmente este área siempre es  $\geq 0,5$  (en caso contrario, puede invertirse la regla de decisión para que se cumpla la condición). Los valores están comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia aparente de distribución en los dos grupos de valores de ensayo). El área no depende sólo de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a un 90% de especificidad, sino del gráfico entero. Ésta es una expresión descriptiva cuantitativa de la proximidad del gráfico COR a un gráfico perfecto (área=1,0).

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para mejorar la exactitud diagnóstica para el CP frente a controles sanos mediante la medición en una muestra de la concentración de por lo menos ASC y CYFRA 21-1, y opcionalmente de ACE, pro-GRP, EEN y/o CCE, respectivamente, y la correlación entre las concentraciones determinadas y la presencia o ausencia de CP, resultando la mejora en que más pacientes son clasificados correctamente como pacientes de CP frente a los controles sanos, en comparación con una clasificación basada en un marcador único investigado por sí solo.

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

En un método preferente adicional según la presente invención se determina por lo menos la concentración de los marcadores biológicos ASC y ACE, respectivamente, y se utiliza la combinación de marcadores en la evaluación del CP.

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

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

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

Los ejemplos y las 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. Debe entenderse que resulta posible llevar a cabo modificaciones de los procedimientos indicados sin apartarse del espíritu de la invención.

#### Descripción de las figuras

La figura 1 es un diagrama que muestra la correlación entre la concentración de ASC y la presencia de cáncer de pulmón. Un valor de corte de 525,1 pg/ml resulta significativo para la presencia de CP. La medición de ASC se llevó a cabo en 60 muestras obtenidas de pacientes con CP ("Cáncer") y en 60 muestras de control obtenidas de 30 individuos manifiestamente sanos y 30 fumadores aparentemente sanos.

La figura 2 muestra un gráfico de las características operativas de receptor (COR) para la evaluación de 60 muestras obtenidas de pacientes con CP en comparación con 60 muestras de control obtenidas de 30 individuos manifiestamente sanos y 30 fumadores aparentemente sanos.

La figura 3 muestra un gráfico de las características operativas de receptor (COR) para la evaluación de 365 muestras obtenidas de pacientes con CP en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos manifiestamente sanos.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Identificación de ASC como marcador de cáncer de pulmón.

Preparación de muestras para el análisis de CL-IEP-EMEM:

10 Se determinó la concentración de proteínas de la fracción soluble de proteínas en una muestra de tejido utilizando el ensayo de proteínas Bio-Rad protein assay® (n° de cat. 500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) siguiendo las instrucciones en el manual del proveedor. A un volumen correspondiente a 200 mg de proteína se añadieron 4 ml de tampón de reducción (urea 9 M, DTT 2 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaOH, pH 8,2) y se incubó durante 1 hora. Esta solución se concentró a 50 ml en un dispositivo Amicon® Ultra (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y para la alquilación se transfirió a 0,5 ml de tampón para muestras (urea 9 M, yodoacetamida 4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, NaOH, pH 8,2) y se incubó durante 6 horas. Tras la alquilación, la solución se concentró en un dispositivo Amicon® Ultra hasta 50 ml y se añadieron 0,5 ml de urea 9 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, NaOH, pH 8,2, y la solución se concentró nuevamente a 50 ml. Se repitió este procedimiento dos veces. A continuación, los 50 ml finales se diluyeron a 990 ml con 4 mg de tripsina (grado Proteomics, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) en agua y se digirieron durante la noche.

20 Análisis de CL-IEP-EMEM:

25 El digerido trípítico (100 ml) se separó mediante HPLC bidimensional (MudPIT) en un sistema Nano de CL (Ultimate, Famos, Switchos; LC Packings, Idstein, Alemania). La separación se llevó a cabo con columnas bidimensionales autoempaquetadas (sílice fundida: PicoFrit 75 mm, New Objective; RP: ProntoSil 120-5-C18 AQ+, Bischoff; SCX: Partisil 10, Whatman). Se generaron 11 fracciones de SCX mediante elución escalonada con cantidades sucesivamente crecientes de NH<sub>4</sub>Ac (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. Se procesaron los datos brutos con el sistema no comercial propio de Roche de gestión de datos utilizando Sequest como algoritmo de base (para los parámetros ver la Tab. 1). Las listas resultantes de péptidos y proteínas identificados en las réplicas de análisis se agruparon.

35 La proteína ASC se identificó mediante la ayuda de las secuencias identificadas y proporcionadas en la Tab. 1.

Detección de ASC como marcador de cáncer de pulmón:

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

45 La proteína ASC se encuentra fuertemente sobrerrepresentada en el tejido tumoral de pacientes que sufren cáncer de pulmón. Las secuencias peptídicas siguientes de la proteína ASC se identificaron mediante búsqueda en base de datos a partir de datos de LCQ-MS<sup>2</sup> en el tejido tumoral: Se identificaron las secuencias siguientes derivadas de ASC utilizando el método anteriormente indicado.

Tabla 1: Secuencias identificadas mediante IEP-EMEM

Secuencia	Tramo de aminoácidos de ASC
DAILDALENLTAEELK	6-22
DAILDALENLTAEELKK	6-23
LVSFYLETYGAELTANVLR	56-75
VTNVEWLLDALYGK	126-140
VLTDEQYQAVR	140-151
KLFSFTPAWNWTCK	161-175
DLLLQALR	175-183
ESQSYLVEDLER	183-195

50 Pudo identificarse ASC en muestras de lisado de tejido tumoral de 5 de entre 8 pacientes con adenocarcinoma pulmonar. En los lisados de tejido normal no pudo identificarse la presencia de ASC.

Ejemplo 2

55 Generación de anticuerpos de la proteína ASC marcadora de cáncer de pulmón

Se generó anticuerpo policlonal de la proteína ASC marcadora de cáncer de pulmón para la utilización posterior del

anticuerpo en la medición de los niveles séricos, plasmáticos y sanguíneos de ASC mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo transferencia western y ELISA.

Expresión recombinante de proteínas en *E. coli*:

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

10 El cebador directo proporciona (aparte de los sitios de clonación EcoRI y de unión ribosómica) oligonucleótidos codificantes de una extensión de péptido MRGSHHHHHHIEGR N-terminal (SEC ID nº 2) introducida en el mismo marco de lectura del polipéptido ASC. El fragmento de PCR digerido con EcoRI/BamHI se ligó en el fragmento de vector pQE-30 correspondiente (Qiagen, Hilden, Alemania), que posteriormente se transformó en células competentes *E. coli* XL1-blue. Tras el análisis de la secuencia, el plásmido se transformó en células competentes *E. coli* BL21 para la expresión bajo el promotor de T5 inducible con IPTG de la serie de vectores pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

20 Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-ASC, se pelletizó mediante centrifugación 1 l 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 el material insoluble se pelletizó mediante centrifugación y el sobrenadante se aplicó a cromatografía de afinidad a metales de Ni-nitrilo-triacético (Ni-NTA). La columna se lavó con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis seguido de lavados con tampón de fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, 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.

Generación de anticuerpos policlonales:

30 a) Inmunización

35 Para la inmunización, se preparó una emulsión fresca de la solución de proteínas (100 mg/ml de proteína ASC) y adyuvante completo de Freund en una proporción de 1:1. Cada conejo se inmunizó con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrajo sangre y el suero anti-ASC resultante se utilizó tal como se indica posteriormente en la presente memoria.

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

45 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 ml/ml de muestra diluida) bajo agitación vigorosa. Tras 30 minutos, se centrifugó la muestra (13.000xg, 30 minutos, 4°C), se descartó el pellet y se recogió el sobrenadante. El pH del sobrenadante se ajustó a 7,5 mediante adición de base Tris 2 M.

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

50 Se descartó el sobrenadante. Se disolvió el pellet en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializó exhaustivamente. Se centrifugó el dializado (13.000xg, 15 minutos, 4°C) y se filtró (0,2 µm).

c) Biotinilación de IgG policlona de conejo:

55 Se llevó IgG policlona de conejo a 10 mg/ml con NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG biotinilada.

60 d) Inmunosorción de IgG policlona de conejo:

65 Para la inmunosorción de ASC, se acoplaron 10 mg de ASC recombinante purificado con 1 ml de Sepharose™ 4B activado con CNBr (GE Healthcare, Alemania, nº de catálogo 17-04-30-01) siguiendo el protocolo del fabricante. La columna de afinidad se cargó con 100 mg de IgG policlona de conejo en PBS, Tween-20 al 0,05%, seguido de lavados 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 clorhídrico y se llevó inmediatamente 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.

5 Ejemplo 3

ELISA para la medición de ASC en muestras de suero y plasma humano.

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

15 Se incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-ASC inmovilizado durante 60 minutos a una concentración de 5 mg/ml en carbonato disódico 150 mM, hidrogenocarbonato sódico 350 mM. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS, 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) como antígeno estándar o con muestras diluidas de plasma de pacientes conjuntamente con 5 mg/ml de anticuerpo policlonal anti-ASC biotinilado. La incubación se realizó 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 etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 20 µg/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%. Las placas se lavaron seguidamente tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos unidos de antígeno-anticuerpo, 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.

25 Ejemplo 4

ASC en micromuestras broncoscópicas de líquido de revestimiento epitelial (LRE)

30 El micromuestreo broncoscópico (MB) ofrece la posibilidad de recoger líquido de revestimiento epitelial (LRE) próximo a nódulos pulmonares pequeños de una manera mayoritariamente no invasiva. A continuación, resulta posible medir las concentraciones de marcadores tumorales en el LRE con el fin de identificar un nódulo maligno.

35 La sonda de MB (Olympus Medical Systems Corp., Tokyo, Japón, nº de cat. BC-402C) se inserta en los pulmones a través del broncoscopio y consiste de una vaina externa de polietileno y una sonda interna de algodón acoplada a una guía de acero inoxidable. Se introduce la sonda interna hasta una región próxima al nódulo y se lleva a cabo el MB durante unos cuantos segundos. A continuación, se extrae la sonda interna introduciéndola en la vaina externa y se extraen ambos dispositivos simultáneamente. Se corta la punta de algodón y se congela directamente a -80°C. Para la determinación, se eluye el LRE de la punta de algodón y puede analizarse posteriormente. La concentración de ASC se determina en el LRE con la ELISA descrita en el Ejemplo 3.

Ejemplo 5

ASC como marcador sérico del cáncer de pulmón

45 Población de estudio

Estudio 1

50 Se utilizaron muestras derivadas de 60 pacientes de CPCNP bien caracterizados (30 de adeno-CA, 30 de CA de células escamosas) con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 2.

Tabla 2: Población de estudio

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

55 Se evaluó el nivel de ASC en las muestras de CP de la Tabla 2 en comparación con 60 muestras de control obtenidas de 30 individuos manifiestamente sanos y 30 fumadores aparentemente sanos sin ninguna enfermedad pulmonar maligna conocida (=cohorte de control).

El nivel de ASC en las muestras de CP de la Tabla 2 se encontraba incrementado en comparación con el nivel de

ASC en las muestras de control.

5 Se llevó a cabo un análisis de COR según Zweig M.H. y Campbell, *supra*. Se encontró que el poder discriminante para diferenciar los pacientes en el grupo de CP de los individuos sanos según la medición del área bajo la curva, era de 92% para CP frente a los controles sanos (figuras 1 y 2).

Con una especificidad de 95%, la sensibilidad de todas las muestras de CP era de 70%, de 67% para los adenocarcinomas y de 73% para el carcinoma de células escamosas, respectivamente.

10 Estudio 2

15 Se utilizaron muestras derivadas de 365 pacientes de CPCNP bien caracterizados (146 de adeno-CA, 87 de CA de células escamosas, 44 de CA de células pequeñas y 88 de otro CA de pulmón) con la clasificación de la UICC proporcionada en la Tabla 3.

Tabla 3: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	182
UICC III	116
UICC IV	66
no estadificados	1
donantes de sangre manifiestamente sanos	50

20 Se evaluó el nivel de ASC en las muestras de CP de la Tabla 2 en comparación con 50 muestras de control obtenidas de individuos manifiestamente sanos (=cohorte de control) con un ABC de 0,94 (fig. 3).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> F. Hoffmann-La Roche AG
- 25 <120> ASC como marcador de cáncer de pulmón
- <130> 42395P EP
- <160> 2
- 30 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 195
- 35 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Gly Arg Ala Arg Asp Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu Asn Leu Thr  
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Leu Lys Lys Phe Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Pro Leu  
 20 25 30

Arg Glu Gly Tyr Gly Arg Ile Pro Arg Gly Ala Leu Leu Ser Met Asp  
 35 40 45

Ala Leu Asp Leu Thr Asp Lys Leu Val Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Tyr  
 50 55 60

Gly Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val Leu Arg Asp Met Gly Leu Gln Glu  
 65 70 75 80

Met Ala Gly Gln Leu Gln Ala Ala Thr His Gln Gly Ser Gly Ala Ala  
 85 90 95

Pro Ala Gly Ile Gln Ala Pro Pro Gln Ser Ala Ala Lys Pro Gly Leu  
 100 105 110

His Phe Ile Asp Gln His Arg Ala Ala Leu Ile Ala Arg Val Thr Asn  
 115 120 125

Val Glu Trp Leu Leu Asp Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Thr Asp Glu  
 130 135 140

Gln Tyr Gln Ala Val Arg Ala Glu Pro Thr Asn Pro Ser Lys Met Arg  
 145 150 155 160

Lys Leu Phe Ser Phe Thr Pro Ala Trp Asn Trp Thr Cys Lys Asp Leu  
 165 170 175

Leu Leu Gln Ala Leu Arg Glu Ser Gln Ser Tyr Leu Val Glu Asp Leu  
 180 185 190

Glu Arg Ser

<210> 2  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> extensión de péptido

<400> 2

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

**REIVINDICACIONES**

1. Método para evaluar el cáncer de pulmón *in vitro*, que comprende:
  - 5 (a) medir en una muestra seleccionada de entre líquidos corporales y/o extractos de tejido la concentración de proteína puntiforme asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa (ASC),
  - (b) opcionalmente otro u otros marcadores de cáncer de pulmón, y
  - (c) utilizando el resultado de medición de la etapa (a) y opcionalmente la etapa (b) en la evaluación del cáncer de pulmón, en el que la detección de un nivel incrementado de ASC es indicativa de cáncer de pulmón.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho otro u otros marcadores se seleccionen de entre el grupo que consiste de CYFRA 21-1, ACE, EEN, pro-GRP y CCE.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho otro u otros marcadores es CYFRA 21-1.
4. Método según la reivindicación 2, en el que dicho otro u otros marcadores es ACE.
5. Método según la reivindicación 2, en el que dicho otro u otros marcadores es CCE.
- 20 6. Utilización de proteína puntiforme asociada apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa (ASC) en la evaluación *in vitro* del cáncer de pulmón en una muestra seleccionada de entre líquidos corporales y/o extractos de tejido, en la que la detección de un nivel incrementado de ASC es indicativa de cáncer de pulmón.
- 25 7. Utilización de un panel de marcadores que comprende proteína puntiforme asociada apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa (ASC) 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 tejidos y líquidos corporales, en la que la detección de un nivel incrementado de ASC es indicativa de cáncer de pulmón.
- 30 8. Utilización del panel de marcadores según la reivindicación 7, en el que dicho otro u otros marcadores consisten de CYFRA 21-1, ACE, EEN y CCE.
9. Utilización de un panel de marcadores según la reivindicación 8, que comprende por lo menos ASC y CYFRA 21-1.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 ó la utilización según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en el que el líquido corporal se selecciona de entre suero, plasma y/o sangre.

Figura 1

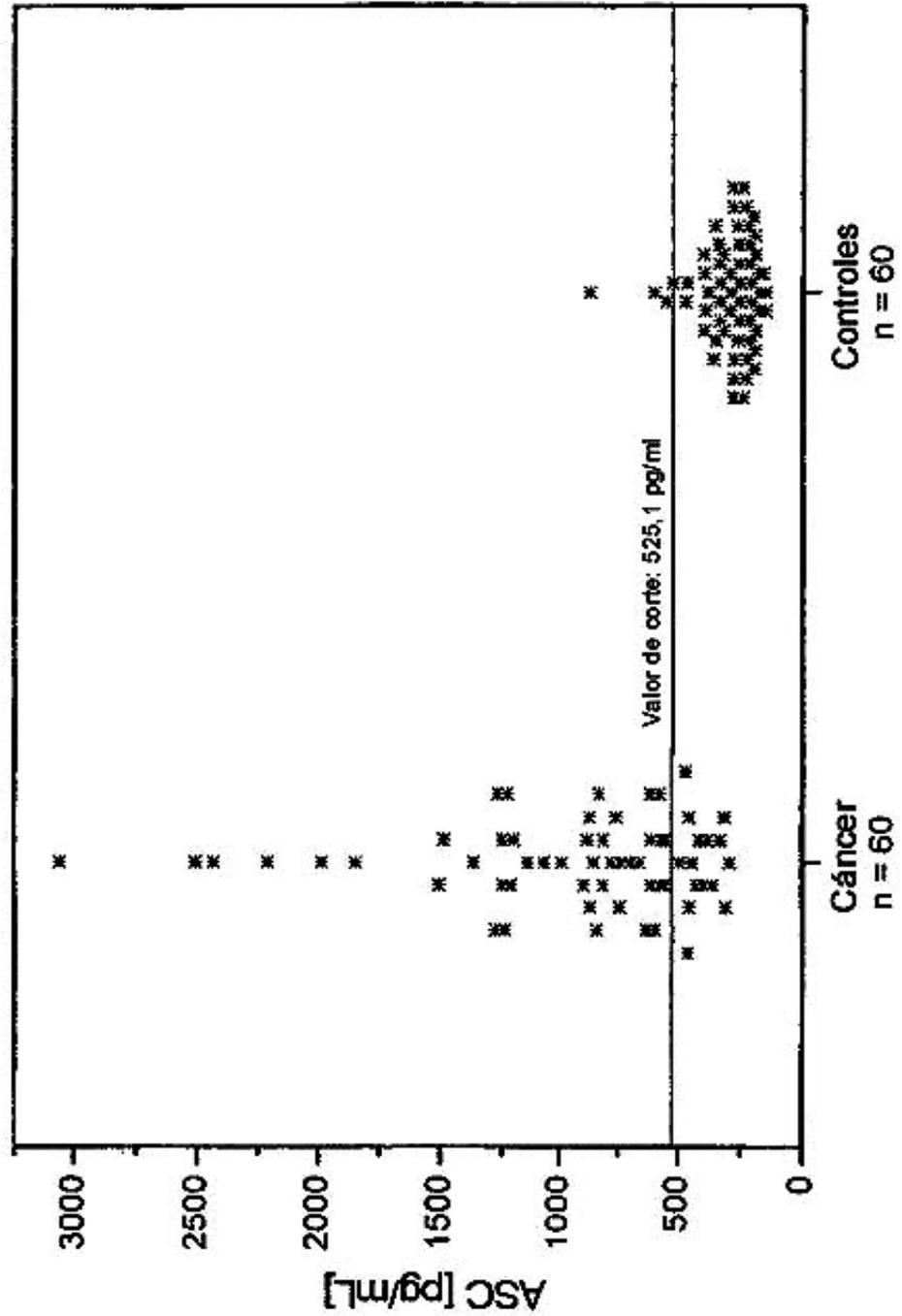
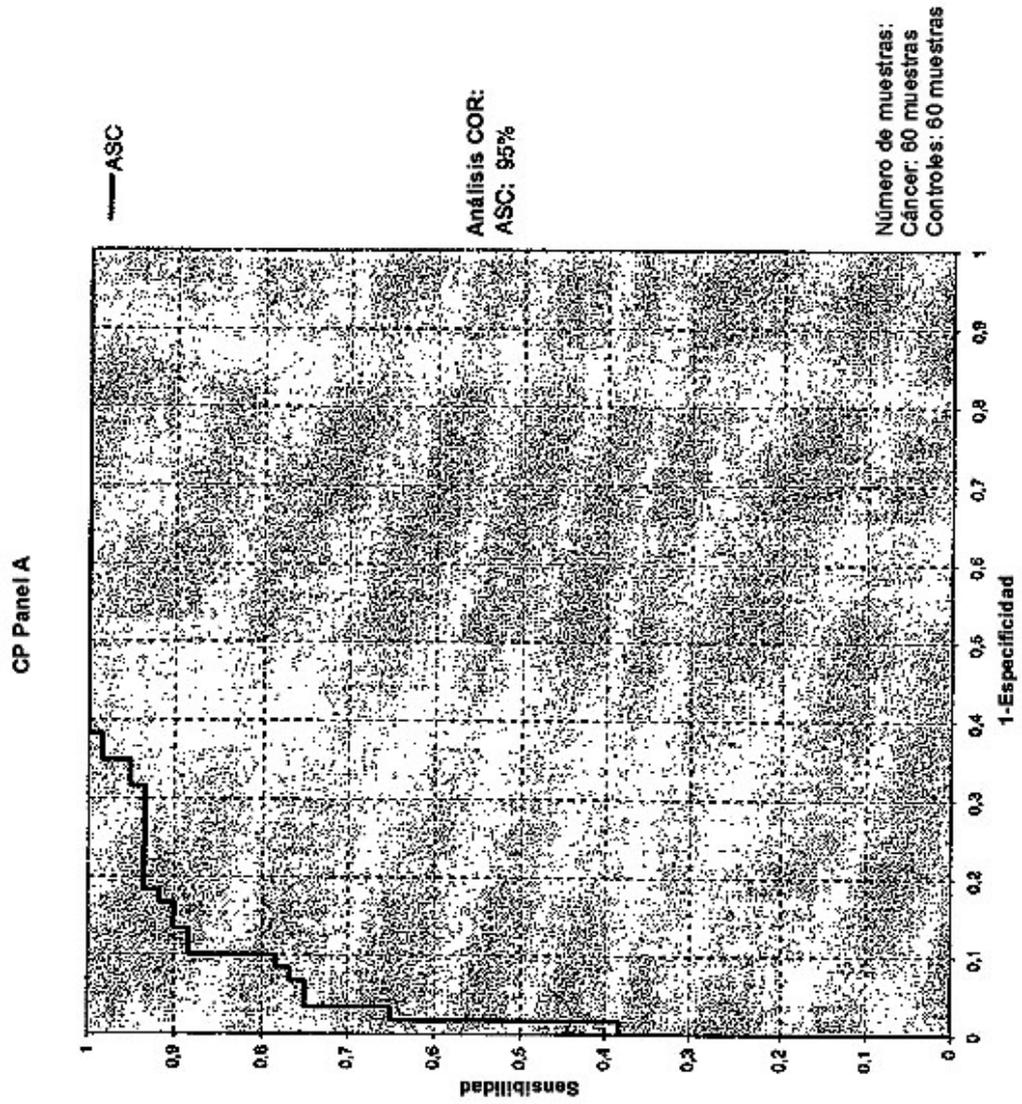


Figura 2



**Figura 3**

