

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 966**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2009** **E 09748720 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013** **EP 2356461**

54 Título: **PACAP como marcador para el cáncer**

30 Prioridad:

**12.11.2008 EP 08019731**

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

**27.01.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HAGMANN, MARIE LUISE;**  
**KARL, JOHANN;**  
**RIEDLINGER, JULIA;**  
**ROESSLER, MARKUS y**  
**TACKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 439 966 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

PACAP como marcador para el cáncer

La presente invención hace referencia a un método que facilita la evaluación del cáncer. Ésta describe la utilización de la proteína adaptadora de caspasas proapoptóticas (= PACAP) como marcador universal de diferentes tipos de cáncer. La PACAP facilita la evaluación del cáncer de pulmón (CP), particularmente del carcinoma pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), pero también de otros tipos específicos de cáncer. Tales tipos específicos de cáncer son, por ejemplo, el cáncer de colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar. Además, la presente invención hace especial referencia a un método para evaluar el cáncer a partir de una muestra líquida de suero o plasma, derivada de un individuo, mediante la medición de PACAP en dicha muestra. La medición de PACAP puede utilizarse, por ejemplo, en la detección precoz del cáncer o en la vigilancia de los pacientes que se someten a cirugía.

El cáncer sigue siendo un problema principal de salud pública pese al progreso en la detección y la terapia. Las células cancerosas se caracterizan por un crecimiento atípico e ilimitado que ya no está sometido a los mecanismos de control del crecimiento del cuerpo. La desdiferenciación y el crecimiento neoplásico de las células tumorales pueden conducir a la producción de las proteínas marcador asociadas a cáncer. Tales proteínas asociadas a cáncer pueden encontrarse tanto en los tejidos como en los fluidos corporales de un individuo que presenta células cancerosas. Habitualmente, sus niveles son bajos en los estadios precoces del progreso carcinogénico y aumentan durante la progresión de la enfermedad o, en algunos casos raros, las proteínas asociadas a cáncer muestran una disminución de su nivel en el curso de la progresión de la enfermedad. La identificación de nuevas proteínas asociadas a cáncer y su detección sensible es un reto tanto para los expertos técnicos como para los sistemas de salud pública. Los tipos de cáncer más prevalente son el cáncer de mama (CM), el cáncer de pulmón (CP) y el cáncer colorrectal (CCR).

Los enfoques terapéuticos más importantes para los tumores sólidos son:

- a) la resección quirúrgica del tumor,
- b) la quimioterapia,
- c) la radioterapia
- d) el tratamiento con fármacos biológicos, como los anticuerpos antitumorales o los anticuerpos antiangiogénicos y
- e) una combinación de los métodos anteriores.

La resección quirúrgica de los tumores está ampliamente aceptada como tratamiento de primera línea para el Estadío precoz de los tumores sólidos. No obstante, la mayoría de los cánceres se detecta sólo cuando se vuelven sintomáticos, es decir, cuando los pacientes presentan un Estadío bastante tardío de progresión de la enfermedad.

La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión y gravedad. Ésta agrupa los pacientes de cáncer para que se puedan realizar generalizaciones sobre el pronóstico y la elección de la terapia.

Hoy en día, el sistema TNM es la clasificación más utilizada en relación a la extensión anatómica del cáncer. Representa un sistema de estadificación uniforme y aceptado internacionalmente. Incluye 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 a distancia). Los criterios TNM están publicados en la UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (editores): Classification TNM of Malignant Tumours, sexta edición, 2002). Cuando se determina el estatus TNM, los pacientes se agrupan en estadios de enfermedad que se denominan mediante números romanos que van del I al IV, y IV es el Estadío de enfermedad más avanzado. La estadificación TNM y los estadios de enfermedad de la UICC se corresponden entre sí tal y como se muestra en la siguiente tabla de Sobin L.H. y Wittekind (editores), visto con anterioridad.

## Interrelación de la estadificación TNM y los estadios de enfermedad de la UICC

| Estadio de enfermedad de la UICC | Estadio T   | Estadio N   | Estadio M |
|----------------------------------|-------------|-------------|-----------|
| Estadio 0                        | Tis         | N0          | M0        |
| Estadio I                        | T1, T2      | N0          | M0        |
| Estadio IIA                      | T3          | N0          | M0        |
| Estadio IIB                      | T4          | N0          | M0        |
| Estadio IIIA                     | T1, T2      | N1          | M0        |
| Estadio IIIB                     | T3, T4      | N1          | M0        |
| Estadio IIIC                     | Cualquier T | N2          | M0        |
| Estadio IV                       | Cualquier T | Cualquier N | M1        |

El diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del cáncer colorrectal (CCR), es especialmente importante ya que se traduce en un pronóstico mucho mejor. Los tumores malignos del CCR aparecen sobre tumores benignos, es decir a partir de un adenoma. Por consiguiente, el mejor pronóstico lo presentan aquellos pacientes diagnosticados en el estadio de adenoma. Los pacientes diagnosticados tan precozmente como en los estadios Tis, N0, M0 o T1-3; N0; M0, si se tratan adecuadamente presentan más del 90% de posibilidades de supervivencia tras 5 años del diagnóstico en comparación con la tasa de supervivencia a 5 años de tan sólo el 10% para los pacientes diagnosticados cuando ya presentan metástasis a distancia.

En teoría, los métodos de detección actuales, que incluyen los métodos por imagen tales como los rayos X o la resonancia magnética nuclear, pueden ser apropiados, al menos parcialmente, para su utilización como herramienta de cribado general. No obstante, son muy caros y los sistemas de salud no se pueden permitir una utilización general y amplia en los cribados en masa de grandes números de sujetos, particularmente en los sujetos que no presentan síntomas tumorales.

Un objetivo de la presente invención es la proporción de un procedimiento simple y coste-eficiente para la evaluación de tumores, por ejemplo para identificar individuos sospechosos de presentar un cáncer. Para este fin, sería deseable un marcador tumoral general detectable en muestras de tejido o fluidos corporales, por ejemplo sangre, suero o plasma, o un panel de tales marcadores.

Actualmente, se utilizan varios marcadores tumorales séricos en la clínica. Por ejemplo, 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 de carcinoma de célula escamosa (CCE) son los marcadores más importantes de CP. Sin embargo, ninguno de ellos cumple los criterios requeridos de sensibilidad y especificidad para una herramienta de cribado (Thomas, L., Labor und Diagnose (2000), TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, Alemania).

Para que un marcador diagnóstico sea de utilidad clínica como marcador único debe ser comparable o mejor que otros marcadores conocidos en la materia. Un nuevo marcador debería conducir a un progreso en la sensibilidad y/o especificidad diagnóstica, tanto si se utiliza sólo o en combinación con uno o más marcadores, respectivamente. La sensibilidad y/o especificidad diagnósticas de un ensayo se evalúa mejor con sus características operativas de receptor, que se describirán en detalle más adelante.

La sangre total, el suero o el plasma son las fuentes de muestra más utilizadas en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral precoz que sea de facilite la detección fiable del cáncer o proporcione información pronóstica precoz puede llevar a un método que sea de gran ayuda en el diagnóstico y en el manejo de esta enfermedad. Por consiguiente, existe una necesidad urgente para mejorar la evaluación *in vitro* del cáncer y en particular del CP. Esto es especialmente importante para mejorar el diagnóstico precoz del cáncer, por ejemplo del CP, dado que las probabilidades de supervivencia de los pacientes diagnosticados precozmente son mucho mayores en comparación con las de aquellos diagnosticados en un estadio avanzado de la enfermedad.

La utilidad clínica de los marcadores bioquímicos establecidos en el cáncer de pulmón se ha revisado, por ejemplo, por Duffy, M.J. (Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262) y debería discutirse brevemente.

Se considera que, actualmente, CYFRA 21-1 es el mejor de los marcadores tumorales conocidos para el cáncer de pulmón. Pese a que no es específico de órgano, éste se encuentra predominantemente en el tejido pulmonar. Se describe que la sensibilidad de CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón es de entre el 46 y el 61%, con una especificidad del 95% frente a otras enfermedades pulmonares benignas. Los niveles séricos aumentados de CYFRA 21-1 también se asocian a enfermedades hepáticas benignas pronunciadas, a insuficiencia renal y a cáncer vesical invasivo. La evaluación del CYFRA 21-1 se recomienda en la vigilancia de la terapia postoperatoria.

El CEA pertenece al grupo de los antígenos carcinofoetales, que habitualmente se producen durante la embriogénesis. El CEA no es organoespecífico y se utiliza predominantemente para monitorizar el cáncer colorrectal. Aparte de las enfermedades malignas, los niveles séricos aumentados de CEA también se asocian a varias enfermedades benignas tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis y las enfermedades autoinmunes. Con una especificidad del 95% frente a las enfermedades pulmonares benignas se describe una sensibilidad para el cáncer de pulmón de entre el 29 y el 44%. La utilización principal del CEA es la monitorización del cáncer de colon, especialmente cuando la enfermedad presenta metástasis. No obstante, varios cánceres pueden elevar los niveles de CEA, incluso el cáncer de mama. Una utilización preferible del CEA es la vigilancia de la terapia del cáncer de pulmón.

La NSE es un marcador tumoral de CPCP. Generalmente, los niveles séricos aumentados de la NSE se asocian a tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. Los niveles séricos aumentados también se observan en pacientes con enfermedades pulmonares benignas y enfermedades cerebrales, tales como la meningitis u otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y heridas traumáticas craneales. Mientras que se describe una sensibilidad del 60-87% para el CPCP, con una especificidad del 95%, el rendimiento de la evaluación de la NSE en los CPCNP es pobre (7-25%). Se recomienda la NSE para la vigilancia de la terapia del CPCP.

El CA 19-9 (antígeno carbohidrato 19-9), un antígeno de Lewis (a) sialilado) en un glucolípido es un marcador tumoral de cánceres gastrointestinales. Aparece en el epitelio fetal gástrico, el intestinal y el pancreático. También pueden encontrarse concentraciones bajas en el tejido adulto del hígado, los pulmones y el páncreas. No existe correlación entre la masa tumoral y los valores del ensayo del CA 19-9, por consiguiente la determinación del CA 19-9 no puede utilizarse en la detección precoz del carcinoma pancreático. Dado que la mucina se excreta de manera exclusiva a través del hígado, la más mínima colestasis puede conllevar unos niveles séricos claramente elevados del CA 19-9 en algunos casos. El marcador se utiliza principalmente como ayuda en la monitorización del estado de enfermedad en aquellos pacientes con un cáncer pancreático confirmado (sensibilidad del 70-87%). Entre el 3-7% de la población presentan la configuración de grupo sanguíneo Lewis a negativo/b negativo y no pueden expresar la mucina con el determinante reactivo CA 19-9. Esto debe tenerse en cuenta cuando se interpretan los resultados.

El CA 125 se observa en un alto porcentaje de tumores ováricos no mucinosos de origen epitelial y puede detectarse en el suero. Los carcinomas ováricos representan un 20% de todos los tumores ginecológicos. Pese a que los valores más altos del CA 125 aparecen en las pacientes que padecen carcinoma ovárico, también se observan valores claramente elevados en enfermedades malignas de endometrio, mama, tracto gastrointestinal y otras enfermedades malignas. También se observan valores elevados en algunas enfermedades benignas ginecológicas tales como los quistes de ovario, la metaplasia ovárica, la endometriosis, el útero miomatoso o la cervicitis. También pueden aparecer elevaciones leves de este marcador al inicio del embarazo y en varias enfermedades benignas (por ejemplo, la pancreatitis aguda y crónica, las enfermedades gastrointestinales benignas, la insuficiencia renal, las enfermedades autoinmunes y otras). Se han observado niveles marcadamente elevados en enfermedades hepáticas benignas como la cirrosis y la hepatitis. Pueden aparecer elevaciones extremas en cualquier tipo de ascitis debida a enfermedades malignas y benignas. Pese a que el CA 125 es un marcador relativamente inespecífico, hoy en día es el marcador tumoral más importante para monitorizar la terapia y el progreso de las pacientes con carcinoma seroso ovárico. Se describe una sensibilidad del 69-79% con una especificidad del 82-93%.

El CCE se identificó originalmente en el carcinoma de célula escamosa de cérvix. La sensibilidad del CCE para el CP es generalmente baja (18-27%). Por consiguiente, se considera que la evaluación del CCE no es adecuada para el cribado. Sin embargo, debido a una mayor sensibilidad para el carcinoma de célula escamosa, se prefiere la utilización del CCE en la vigilancia de la terapia, pese a que habitualmente el rendimiento de CYFRA 21-1 es mejor.

El ProGRP es un marcador tumoral, útil en la detección y monitorización del CPCP. También se observan niveles séricos elevados en los pacientes con enfermedades pulmonares/pleurales no malignas, tales como la fibrosis pulmonar idiopática o la sarcoidosis. Mientras que la sensibilidad del proGRP en el campo del CPCP (con una especificidad del 95%) se describe en torno al 47-86%, el rendimiento de la evaluación del proGRP en el campo del CPCNP es pobre debido a que se describe una sensibilidad menor al 10%.

Habitualmente, el CA 15-3 se encuentra aumentado en pacientes con cáncer de mama avanzado. Los niveles del CA 15-3 se elevan excepcionalmente en mujeres con un Estadio precoz de cáncer de mama (Duffy, M.J., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences 38 (2001) 225-262). Los cánceres de ovario, pulmón y próstata también pueden elevar los niveles del CA 15-3. Los niveles aumentados del CA 15-3 pueden asociarse a condiciones no cancerosas, como enfermedades benignas de mama u ovario, la endometriosis, la enfermedad inflamatoria pélvica, y la hepatitis. El embarazo y la lactancia pueden elevar los niveles del CA 15-3 (National Cancer Institute, Cancer Facts, Fact Sheet 5.18 (1998) 1-5).

El CA 27-29 se observa, de forma similar al antígeno CA 15-3, en la sangre de la mayoría de los pacientes con cáncer de mama. Los niveles del CA 27-29 pueden utilizarse junto a otros procedimientos (tales como

mamografías y mediciones de otros niveles de marcadores tumorales) para evaluar la recurrencia en mujeres tratadas previamente por cánceres de mama en Estadío II y Estadío III. Los niveles de CA 27-29 también pueden elevarse en el cáncer de colon, estómago, riñón, pulmón, ovario, páncreas, útero e hígado. El primer trimestre de embarazo, la endometriosis, los quistes de ovario, las enfermedades mamarias benignas, las enfermedades renales, y las enfermedades hepáticas son condiciones no cancerosas que también pueden elevar los niveles del CA 27-29.

La AFP (alfafetoproteína) se produce de manera normal en el feto en desarrollo. Los niveles de AFP empiezan a descender precozmente tras el nacimiento y habitualmente son indetectables en la sangre de adultos sanos (excepto durante el embarazo). Un nivel elevado de AFP sugiere fuertemente la presencia de un cáncer hepático primario o un cáncer de células germinales (cánceres que provienen de células que proporcionarían óvulos o espermatozoides) de ovario o testículo. Sólo en algunos casos raros los pacientes con otros tipos de cáncer (tales como el cáncer de estómago) presentan niveles elevados de AFP. Las condiciones no cancerosas que pueden elevar los niveles de AFP incluyen las condiciones hepáticas benignas, tales como la cirrosis o la hepatitis; la ataxia telangiectasia; el síndrome de Wiscott-Aldrich y el embarazo.

El PSA (antígeno específico prostático) se utilizó en gran medida como marcador pronóstico fiable en el tratamiento de los pacientes con cáncer de próstata (Catalona, W.J. et al., N. Engl. J. Med. 324 (1991) 1156-1161; Osterling, J.E., J. Urol. 145 (1991) 907-923). Como marcador tumoral presenta la ventaja considerable de que no se detecta en la sangre de los hombres sanos o, en caso de que lo haga, sólo se presenta en concentraciones bajas. Los valores muy elevados de PSA se suelen medir en estadios avanzados de la enfermedad. El PSA pertenece a un grupo de las proteínas/enzimas conocidas como "calicreínas". La familia humana de calicreínas se compone de tres miembros, descritos como hK1, hK2 y hK3 (PSA) (Clements, J.A., Endocr. Rev. 10 (1989) 393-419; Carbin, L.A. et al., J. Hypertens. 11 (1993) 893-898). El antígeno específico prostático (PSA) o hK3 es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 29 kDa. Éste se forma en las células epiteliales prostáticas y es un componente del fluido seminal. El PSA tiene la actividad enzimática de una proteasa de serina neutra. Su función principal es la escisión de las seminogelinas I y II y la fibronectina que, como componentes esenciales del eyaculado, bloquean la movilidad del espermatozoide. Mediante la hidrólisis de estas proteínas, el PSA provoca la licuefacción del coágulo seminal, lo cual permite la movilidad espermática.

La ferritina es una macromolécula con un peso molecular de al menos 440 kD (en relación al contenido de hierro) e incluye una carcasa proteica (apoferritina) de 24 subunidades y un núcleo de hierro que contiene una media de aproximadamente 2500 iones de  $\text{Fe}^{3+}$  (en la ferritina hepática y esplénica) (Wick, M. et al., Ferritin in Iron Metabolism-Diagnosis of Anemias, segunda edición, Springer-Verlag (1995), ISBN 3-211-82525-8 e ISBN 0-387-82525-8). La ferritina tiende a formar oligómeros y cuando se presenta en exceso en las células de los órganos de almacenamiento, aparece una tendencia a la condensación en los lisosomas en forma de hemosiderina semicristalina.

Se distinguen, al menos, 20 isoformas de ferritina con la ayuda del enfoque isoeléctrico (Arosio, P. et al., Heterogeneity of ferritin II: Immunological aspects, en: Albertini A., Arosio P., Chiancone E., Drysdale J. (editores), Ferritins and isoforms as biochemical markers, Elsevier, Ámsterdam (1984) páginas 33-47). Esta microheterogeneidad se debe a las diferencias en los contenidos de las subunidades H ácida y L levemente básica. Las isoformas básicas son responsables de la función de almacenamiento de hierro a largo plazo y se encuentran principalmente en el hígado, el bazo y la médula ósea (Kaltwasser, J.P. et al., Serumferritin: Methodische und Klinische Aspekte, Springer Verlag (1980)).

Principalmente, las isoformas ácidas se encuentran en el miocardio, la placenta, y el tejido tumoral. Éstas presentan un contenido férrico menor y, presumiblemente, actúan como intermediarias en la transferencia del hierro en varios procesos de síntesis (Morikawa, K. et al., Leuk. Lymphoma 18 (1995) 429-433; Borch-Johnson, B., Analyst 120 (1995) 891-903; Cook, J. et al., Adv. Exp. Med. Biol. 356 (1994) 219-228).

La determinación de la ferritina es un método adecuado para determinar la situación metabólica del hierro. La determinación de la ferritina al inicio de la terapia proporciona una medida representativa de las reservas corporales de hierro. Clínicamente, se ha demostrado que el valor límite de 20  $\mu\text{g/l}$  (ng/ml) es útil en la detección de la deficiencia de hierro prelatente. Este valor proporciona un indicador fiable del agotamiento de las reservas de hierro que pueden movilizarse para la síntesis de la hemoglobina. Cuando el nivel de ferritina está elevado y se puede excluir la posibilidad de un trastorno de distribución, se trata de una manifestación de sobrecarga férrica en el cuerpo. Se utiliza el valor de 400  $\mu\text{g/l}$  (ng/ml) de ferritina como valor límite. También se observan valores elevados de ferritina en los siguientes tumores: leucemia aguda, enfermedad de Hodgkin y los carcinomas de pulmón, hígado y próstata. Se ha demostrado que la determinación de la ferritina es útil en las metástasis hepáticas. Algunos estudios indican que el 76% de todos los pacientes con metástasis hepáticas presentan valores de ferritina superiores a los 400  $\mu\text{g/l}$  (ng/ml). Algunas razones para este aumento de sus niveles pueden ser la necrosis celular, el bloqueo de la eritropoyesis o la síntesis incrementada en el tejido tumoral.

Por otro lado, se describió como característico que los cánceres gastrointestinales no aumentan los niveles séricos de ferritina (Niitsu, Y. et al., Rinsho Ketsueki 21 (1980) 1135-1143). Además, se ha descrito que los niveles medios de ferritina sérica son significativamente menores en los pacientes con cáncer colorrectal avanzado que en los controles (Kishida, T. et al., J. Gastroenterol. 29 (1994) 19-23). El descenso de los niveles séricos de ferritina se deben al sangrado continuo y esta pérdida de sangre se relaciona con el tamaño y la localización del tumor (Li, F. et al., J. Gastroenterol. 34 (1999) 195-199).

En relación a los perfiles de marcadores y con la intención de mejorar el diagnóstico del cáncer de pulmón, se publicó un método (Schneider, J. et al., Int. J. Clin. Oncol. 7 (2002) 145-151) que utiliza algoritmos de clasificación basados en lógica difusa para combinar los niveles séricos de CYFRA 21-1, NSE y proteína C reactiva (PCR), que es un marcador general de inflamación. Los autores describieron una sensibilidad del 92% con una especificidad del 95%. No obstante, en este estudio se describe, por ejemplo, una sensibilidad de CYFRA 21-1 como marcador tumoral único del 72% con una especificidad del 95%, la cual es significativamente mayor en comparación a otros estudios descritos. Duffy, M.J., en Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262 describen una sensibilidad de entre el 46% y el 61%. Este rendimiento inusualmente alto logrado por Schneider et al. genera algunas dudas y puede ser debido a varios hechos. Para empezar, el colectivo de pacientes control parece ser más joven que el colectivo de pacientes, es decir, los grupos no están bien apareados según la edad, y el colectivo de pacientes incluye muchos estadios tardíos. En segundo lugar, y aún más crítico, el rendimiento del algoritmo se comprueba con las muestras del conjunto de ensayo que se utilizaron para la determinación de los calificadores de lógica difusa. Por consiguiente, estos calificadores están "hechos a medida" para evaluar éste conjunto y no se aplican a un conjunto de validación independiente. Bajo circunstancias normales debería esperarse que el mismo algoritmo, aplicado a un conjunto de validación mayor, independiente y bien equilibrado, conlleve un rendimiento global significativamente reducido.

Una de las tareas de la presente invención fue investigar si se podía identificar un marcador bioquímico para su utilización en la evaluación de la enfermedad del cáncer. En particular, los inventores de la presente invención investigaron si se podía identificar un marcador bioquímico para la evaluación de diferentes tipos de cáncer, tal como el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago y/o conducto biliar en muestras tisulares o fluidos corporales.

Sorprendentemente, se ha observado que la utilización de la proteína PACAP como biomarcador puede solucionar, al menos parcialmente, algunos de los problemas de los marcadores actualmente conocidos en el estado de la materia.

La presente invención hace referencia a un método para evaluar el cáncer *in vitro*, y esto incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma, y la utilización de los resultados de la medición, particularmente la concentración determinada, en la evaluación del cáncer.

Sorprendentemente, se ha observado que una concentración aumentada de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en la muestra del ensayo se asocia a la presencia de cáncer. Podría observarse que la PACAP es un marcador no específico de un solo tipo de cáncer, sino que es un marcador de diferentes tipos de cáncer, es decir que parece ser un marcador tumoral general. Dado que la PACAP parece ser bastante específica de los procesos tumorigénicos, en sí, el nuevo marcador tumoral PACAP tiene un gran potencial para su utilidad clínica en varias clases de tumores.

El método de la presente invención es adecuado para la evaluación de muchos tipos diferentes de cáncer. Se han observado concentraciones elevadas de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra en comparación con controles normales, por ejemplo, en un tipo específico de cáncer tal como el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar, respectivamente.

De acuerdo con una realización preferible de la invención, se mide la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra para evaluar *in vitro* un tipo específico de cáncer, seleccionado a partir del grupo que incluye el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar.

De acuerdo con otra realización preferible de la invención, se mide la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra para evaluar *in vitro* el cáncer, tal como el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, melanoma, o riñón.

De acuerdo con otra realización preferible de la invención, se mide la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra para evaluar *in vitro* el cáncer, tal como el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario o endometrio.

De acuerdo con otra realización preferible de la invención, se mide la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra para evaluar *in vitro* el cáncer, tal como el cáncer de pulmón (CP) o el cáncer colorrectal (CCR).

- 5 De acuerdo con otra realización preferible de la invención, se mide la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra para evaluar *in vitro* el cáncer de pulmón (CP).

- 10 Una realización de la presente invención hace referencia al cribado en masa de una población para distinguir entre individuos probablemente libres de cáncer e individuos que pueden clasificarse como casos "sospechosos". Este último grupo de individuos puede someterse entonces a procedimientos diagnósticos adicionales, por ejemplo mediante métodos de imagen u otros medios adecuados.

- 15 Una realización adicional de la presente invención hace referencia a una mejora en los paneles de marcadores tumorales adecuados para el diagnóstico del cáncer en general o paneles de marcadores tumorales adecuados para el diagnóstico de un tipo de tumor específico, por ejemplo el cáncer de pulmón.

- 20 La presente invención también se relaciona con un método para la evaluación del cáncer *in vitro* mediante la utilización de marcadores bioquímicos, lo cual incluye la medición en una muestra de la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma y, de manera opcional, otro(s) marcador(es) específicos de cáncer, y la utilización de los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer. Los marcadores preferibles para su utilización en combinación con la PACAP son, por un lado, marcadores que son marcadores tumorales generales (es decir, marcadores que no son específicos de un único tipo de tumor) o, por otro lado, marcadores tumorales específicos (marcadores que son específicos de un único tipo tumoral). Algunos marcadores preferibles, por ejemplo para la evaluación del cáncer, tal como el
- 25 cáncer de pulmón, son el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE, el proGRP, el CA 15-3, el CA 27-29, la AFP, el PSA y la ferritina. Estos marcadores pueden utilizarse de manera individual o en cualquier combinación junto a la PACAP.

- 30 Si, de acuerdo con este método de la invención, se evalúa el cáncer, el o los marcadores del cáncer respectivo se seleccionan preferiblemente a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE, el proGRP, el CA 15-3, el CA 27-29, la AFP, el PSA y la ferritina.

- 35 Por consiguiente, la presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye al menos el marcador PACAP y, al menos, otro marcador tumoral, por ejemplo el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE, el proGRP, el CA 15-3, el CA 27-29, la AFP, el PSA y la ferritina, en la evaluación del cáncer, por ejemplo el cáncer de pulmón y/o colon.

- 40 Preferiblemente, la presente invención se relaciona con un método para evaluar el cáncer, tal como el cáncer de pulmón *in vitro* mediante la utilización de marcadores bioquímicos, que incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de la proteína PACAP y/o fragmentos de la misma y, de manera opcional, uno o más marcadores de cáncer adicionales, por ejemplo uno o más marcadores de cáncer de pulmón adicionales, y la utilización de los resultados de la medición, particularmente las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer. Es preferible que el o los marcadores adicionales se seleccionen a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP.
- 45

La presente invención, en una realización preferible, también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y el CYFRA 21-1 en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

- 50 La presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y el CEA en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

- 55 La presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y el CA 19-9 en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

La presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y el CCE en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

- 60 La presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y el CA 125 en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

La presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y la NSE en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

- 65 La presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye, al menos, la PACAP y el proGRP en la evaluación del cáncer, particularmente el CP, y más particularmente el CPCNP.

La presente invención también hace referencia a la utilización de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer, en la que la concentración aumentada de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma indica la presencia de cáncer.

La presente invención también hace referencia a la utilización de la PACAP en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, particularmente del cáncer de pulmón, colon, vejiga, cervix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar.

La presente invención también hace referencia a la utilización de un anticuerpo dirigido frente a la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer, en la que la concentración aumentada de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma indica la presencia de cáncer.

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para evaluar el cáncer *in vitro*, lo cual incluye la medición en una muestra de la concentración de a) una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma, b) opcionalmente otro u otros marcadores adicionales de cáncer, y (c) la utilización de los resultados de la medición del paso (a) y opcionalmente el paso (b) en la evaluación del cáncer; en el que dicha muestra es suero o plasma, y en el que una concentración aumentada de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en comparación con los controles normales indica la presencia de cáncer.

El término "medición" preferiblemente incluye una medición cualitativa, semicualitativa o cuantitativa de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra. En una realización preferible, la medición es una medición semicuantitativa, es decir se determina si la concentración de la PACAP es superior o inferior a un valor de corte. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, en un ensayo sí (presencia) o no (ausencia), la sensibilidad del ensayo se suele configurar para que se corresponda con el valor de corte. Un valor de corte puede determinarse, por ejemplo, a partir de la evaluación de un grupo de individuos sanos. Preferiblemente, el valor de corte se configura para que se obtenga una especificidad del 90%, aunque también es preferible que el valor de corte se configure para que se obtenga una especificidad del 95%, o también es preferible que el valor de corte se configure para que se obtenga una especificidad del 98%. Un valor por encima del valor de corte puede indicar, por ejemplo, la presencia de cáncer. En particular, un valor de PACAP superior al valor de corte puede indicar, por ejemplo, la presencia de cáncer de pulmón, colon, vejiga, cervix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar. En una realización preferible adicional, la medición de la PACAP es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales, la concentración de PACAP 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.

La proteína adaptadora de caspasas proapoptóticas (PACAP, ID de la base de datos SwissProt: PACAP\_HUMAN, Nº de acceso de la base de datos SwissProt: Q8WU39) se caracteriza por la secuencia que se proporciona en el Id. de Sec. Nº 1 (figura 6). La molécula PACAP incluye 189 aminoácidos (=aa) y tiene un peso molecular de 20,7 kDa. Otros sinónimos de la PACAP son FLJ32987, gxHOMSA73848, HSPC190, proteína de unión a la caspasa-2 o proteína hipotética MGC29506. El gen humano correspondiente (secuencia codificante de la PACAP) se localiza en el cromosoma 5q23-q31.

El gen humano MGC29506 y la proteína que éste codifica fueron identificados y caracterizados por Katoh y Katoh mediante la utilización de información EST y la bioinformática (Katoh, M. y Katoh, M., Int. Journal of Oncology 23 (2003) 235-241). Se derivan tres proteínas del gen humano MGC29506 debido al empalme alternativo: la proteína de longitud completa PACAP (Id. de Sec. Nº 1) con 189 aa, así como las variantes de empalme, la proteína Q8WU39-2 (ID. de la base de datos SwissProt: PACAP\_HUMAN-S2, Nº de acceso de la base de datos SwissProt: Q8WU39-2 con 123 aa; Id. de Sec. Nº 5) y la proteína Q8WU39-3 (ID. de la base de datos SwissProt: PACAP\_HUMAN-S3, Nº de acceso de la base de datos SwissProt: Q8WU39-3 con 61 aa; Id. de Sec. Nº 6). Las proteínas Q8WU39 y Q8WU39-2 son idénticas en su región N-terminal, que incluye los aminoácidos 1-59, pero difieren por completo en la región C-terminal. Katoh y Katoh describieron que Q8WU39 (PACAP) y Q8WU39-2 (PACAP-2) son proteínas secretadas con el péptido señal N-terminal y seis residuos de cisteína conservados. Se observó que la Q8WU39 era la isoforma más expresada del gen MGC29506. Se observó que, frecuentemente, el gen PACAP estaba regulado negativamente en el cáncer gástrico de tipo intestinal (Katoh y Katoh). Debido a esta regulación a la baja, especularon que la PACAP podía ser un gen supresor de tumores candidato que estuviera implicado en el cáncer gástrico de tipo intestinal. No se describe la determinación de una proteína PACAP en las muestras tisulares o en un fluido corporal. El documento no incluye datos o indicaciones de que un nivel elevado de una proteína PACAP pueda servir como marcador asociado a la identificación de la enfermedad de cáncer, su pronóstico y/o diagnóstico.

Bonfoco et al. (J. Biol. Chem. 276 (2001) 29242-29250) describieron la clonación de la molécula proapoptótica PACAP mediante un sistema híbrido de dos levaduras. Identificaron la proteína PACAP-2 de 123 aminoácidos con una masa molecular calculada de 13,6 kDa. Mediante la utilización de ensayos de unión a proteínas *in vitro* y análisis Western blot, Bonfoco et al. observaron que la PACAP-2 interactúa con la caspasa-2 y la caspasa-9 e

identificaron a la proteína PACAP-2 como una proteína desencadenante de la apoptosis. No obstante, los autores no describen asociación alguna entre la PACAP-2 y la evaluación del cáncer.

La patente US 2006/0252057 describe productos de expresión génica o combinaciones de productos de un grupo de genes. Se menciona el gen PACAP como uno de los 331 genes. Se verificó la expresión diferencial de varios genes a nivel proteico mediante IHQ, mayormente queratinas pero no con la PACAP. Dado que la IHQ sólo se llevó a cabo con tejido canceroso no se mostró la comparación de la expresión alterada con el tejido normal.

La patente WO 2006/121991 describe el pronóstico del cáncer de mama mediante la cuantificación del nivel de expresión de un grupo de genes de pacientes con cáncer de mama en comparación con un grupo control. Junto con otros 67 genes, se describió que el gen de la PACAP, medido como mRNA, era un indicador de buen pronóstico. Sólo se proporcionan ejemplos de la determinación de los niveles de mRNA correspondientes de estos genes mediante la metodología QPCR. Ninguno de los ejemplos muestra el nivel de ninguna de las proteínas, ni en el tejido ni en la circulación.

Los mismos autores describen conjuntos de genes para la determinación y el pronóstico del cáncer de colon en la patente WO 2007/112330. Se describe que la expresión inferior del gen PACAP en un grupo junto a 8 genes más indica un pronóstico pobre en el cáncer de colon.

Los ejemplos de las dos últimas solicitudes de patente utilizan exclusivamente métodos de detección de RNA para la identificación y cuantificación. No se miden los niveles de proteína correspondientes.

Por consiguiente, ninguno de los documentos anteriores de la materia muestra la medición de la proteína PACAP en muestras tisulares o fluidos corporales.

Además, se sabe que la correlación entre el nivel de mRNA y el nivel de proteína varía en gran medida (Kadota, K. et al., Genome Letters 2 (2003) 139-148; Greenbaum, D. et al., Genome Biology 4 (2003) 117). Así, no se puede deducir la cantidad de proteína a partir de los niveles correspondientes de mRNA. No se puede llegar a la conclusión de que un nivel desregulado de mRNA lleva simultáneamente a un nivel de proteína desregulado.

La patente WO 1997/38003 describe proteínas humanas específicas de la hematopoyesis (proteínas hHSP). En una realización particular, la patente WO 1997/38003 describe la proteína PACAP como una proteína humana específica de la hematopoyesis y su utilización en la regulación de la diferenciación y la maduración de las células del sistema inmune, y en el tratamiento y/o prevención de las condiciones caracterizadas por la subexpresión de las proteínas hHSP. No se describe la determinación de la proteína PACAP en muestras tisulares o en fluidos corporales. Además, el documento no contiene ningún dato acerca de que la proteína PACAP puede ser un marcador asociado al cáncer, y en particular al cáncer de pulmón, mama y/o colon.

La patente WO 2006/060653 describe métodos y medios (tal como anticuerpos) para evaluar el estado del cáncer de pulmón, lo cual incluye los pasos de obtención de una muestra biológica de un paciente con cáncer de pulmón. También se mide el mRNA de los marcadores, tal como la PACAP y el CCE.

La patente WO 2007/112330 describe que la PACAP se mide en la sangre, heces u otras muestras de un paciente como marcador diagnóstico de cáncer de colon. En particular, se ha observado que una subexpresión de la PACAP es indicativa de un pronóstico pobre en el cáncer de colon.

Suzuki M. et al., Molecular Oncology, vol. 1, Nº 2 (2007) 172-180, han observado que la PACAP se sobreexpresa en las metástasis linfáticas de los carcinomas de mama.

Por consiguiente, ninguno de los documentos de la materia mencionados con anterioridad sugiere que la determinación de la PACAP en las muestras tisulares y en los fluidos corporales permite la evaluación del cáncer de pulmón.

Sorprendentemente, en la presente invención se observó que la determinación de la presencia y/o cantidad de la PACAP en una muestra tisular y/o fluido corporal en ausencia de información morfológica o histológica, particularmente sin la determinación de la localización subcelular, permite la evaluación de la enfermedad de cáncer, por ejemplo de la enfermedad de cáncer de pulmón, mama, colon, próstata o riñón, y en particular de la enfermedad de cáncer de pulmón.

Tal y como se utiliza aquí, los siguientes términos tienen el significado que a ellos se asocia en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan para hacer referencia a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un marcador" hace referencia a un marcador o más de un marcador. El término "al menos" se utiliza para indicar que, de modo opcional, uno o más objetos pueden estar

presentes. A modo de ejemplo, un panel de marcadores que incluye, al menos, (los marcadores) PACAP y CYFRA 21-1 puede incluir de manera opcional uno o más marcador adicionales.

La expresión "uno o más" hace referencia a 1-50, preferiblemente 1-20, también preferible 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 15.

El término "marcador" o "marcador bioquímico", tal y como se utiliza aquí, hace referencia a una molécula que puede utilizarse como diana para analizar una muestra de ensayo de un paciente. Algunos ejemplos de tales dianas moleculares son proteínas o polipéptidos. Se contempla que las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención incluyen variantes naturales de dicha proteína, así como fragmentos de tal proteína o dicha variante, en particular fragmentos inmunológicamente detectables. Preferiblemente, los fragmentos inmunológicamente detectables incluyen al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de tal polipéptido marcador. Los expertos en la materia reconocerán que las proteínas liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular pueden alterarse, por ejemplo durante la inflamación, y pueden degradarse o escindir-se en tales fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en forma inactiva, la cual se activa subsiguiente mediante proteólisis. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, las proteínas o los fragmentos de las mismas también pueden estar presentes como parte de un complejo. Tal complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador se codifican por el mismo gen pero difieren en el punto isoeléctrico (=pI), el peso molecular (=PM) o en ambos como resultado, por ejemplo, del procesamiento alternativo del mRNA o premRNA. La secuencia de aminoácidos de una variante es un 95% o más idéntica a la secuencia del marcador correspondiente. Además, o de forma alternativa, un polipéptido marcador o una variante del mismo puede incluir una modificación postraducciona. Algunos ejemplos de modificaciones postraduccionales son la glicosilación, la acilación y/o la fosforilación.

PACAP:

Las proteínas PACAP, particularmente las formas solubles de las proteínas PACAP y/o los fragmentos de la misma, se detectan en muestras adecuadas. Algunas muestras preferibles son las muestras tisulares o los fluidos corporales, tales como la sangre, el plasma, el suero, la orina, las heces, el lavado broncoalveolar (LBA), el fluido de recubrimiento epitelial (ELF) o el esputo. Preferiblemente, la muestra se deriva de un sujeto humano, por ejemplo un paciente con un tumor o una persona en riesgo de tener un tumor o una persona sospechosa de tener un tumor. También es preferible que la PACAP se detecte en una muestra de suero o plasma.

En una realización preferible de acuerdo con la presente invención, se determina la concentración de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma. En una realización, el marcador PACAP se mide específicamente en una muestra de suero o plasma mediante la utilización de un agente de unión específico.

Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor de la PACAP, una lectina de unión a la PACAP o un anticuerpo frente a la PACAP. Un agente de unión específico presenta una afinidad de, al menos,  $10^7$  l/mol para su molécula diana correspondiente. Preferiblemente, el agente de unión específico tiene una afinidad de  $10^8$  l/mol o también preferible de  $10^9$  l/mol para su molécula diana. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, el término específico se utiliza para indicar que el resto de biomoléculas presentes en la muestra no se unen de forma significativa al agente de unión específico de la PACAP. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula diferente a la molécula diana resulta en una afinidad de unión de tan sólo un 10% o menos, tan sólo un 5% o menos, tan sólo un 2% o menos o tan sólo un 1% o menos en relación a la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferible cumplirá tanto los criterios de afinidad mínimos mencionados con anterioridad, así como los relacionados con la especificidad.

Preferiblemente, un agente de unión específico preferiblemente es un anticuerpo reactivo frente a la PACAP. El término anticuerpo hace referencia a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígeno de tales anticuerpos, anticuerpos de cadena única así como constructos genéticos que incluyen el dominio de unión de un anticuerpo.

Puede utilizarse cualquier fragmento de anticuerpo que cumpla los criterios de un agente de unión específico mencionados con anterioridad. Los anticuerpos se generan mediante los procedimientos del estado de la materia, por ejemplo, tal y como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Ámsterdam, el libro completo, especialmente las páginas 43-78). Además, los expertos en la materia conocen los métodos basados en inmunoabsorbentes que pueden utilizarse en el asilamiento específico de anticuerpos. A través de estos medios se puede potenciar la calidad de los anticuerpos policlonales y por consiguiente su rendimiento en los inmunoensayos (Tijssen, P., visto antes, páginas 108-115).

Para los logros descritos en la presente invención se pueden utilizar anticuerpos policlonales obtenidos de conejos. No obstante, también pueden utilizarse anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, oveja o cabra, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, estos representan una herramienta ideal para el

desarrollo de un ensayo en la rutina clínica. La generación y la utilización de anticuerpos monoclonales frente a PACAP en un método de acuerdo con la presente invención representan otras realizaciones preferibles, respectivamente.

5 Tal y como apreciarán los expertos en la materia, ahora que se ha identificado la PACAP como marcador útil en la evaluación del cáncer, preferiblemente el cáncer de colon o de pulmón, se pueden utilizar varios procedimientos inmunodiagnósticos para lograr resultados comparables con los logros de la presente invención. Por ejemplo, se pueden utilizar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Tales estrategias incluyen, entre otros, la utilización de péptidos sintéticos, que representan un epítipo de la PACAP, para la inmunización.  
10 De forma alternativa, también se puede utilizar la inmunización con DNA, también conocida como vacunación de DNA.

15 Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incuba con el agente de unión específico para la PACAP bajo condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre el agente de unión y la PACAP. No hace falta especificar tales condiciones, dado que los expertos en la materia pueden identificar fácilmente tales condiciones de incubación apropiadas. Se mide la cantidad de complejo entre el agente de unión y la PACAP y la concentración de PACAP determinada se utiliza en la evaluación del cáncer, preferiblemente del cáncer de pulmón. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, existen varios métodos para medir la cantidad del complejo entre el agente de unión específico y la PACAP, y todos ellos se describen en detalle en los libros de texto relevantes (véase, por ejemplo, Tijssen P., visto antes, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (editores), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

25 Preferiblemente, la PACAP se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich. En tal ensayo, se utiliza un primer agente de unión específico para capturar la PACAP en un lado y en el otro lado se utiliza un segundo agente de unión específico, que se marca para que se pueda detectar directa o indirectamente. Los agentes de unión específicos utilizados en un formato de ensayo de tipo sándwich pueden ser anticuerpos dirigidos específicamente frente a la PACAP. La detección puede llevarse a cabo mediante la utilización de diferentes anticuerpos marcados de captura, es decir anticuerpos que reconocen diferentes epítopos de la proteína PACAP.

30 En el sentido de la presente invención, un "marcador de cáncer" y en particular un "marcador de cáncer de pulmón" es cualquier marcador que, si se combina con el marcador PACAP, añade información relevante en la evaluación del cáncer en general o en la evaluación de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo en la evaluación del CP. La información se considera relevante, si el valor aditivo para la evaluación del cáncer (la sensibilidad con una especificidad determinada, o la especificidad con una sensibilidad determinada, respectivamente) puede mejorarse mediante la inclusión de dicho marcador en la combinación de marcadores que ya incluye el marcador PACAP. En la realización preferible de la evaluación del cáncer, la mejora en la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es significativa estadísticamente con un valor de significación de  $p=0,05$ ,  $0,02$ ,  $0,01$  o menor. Preferiblemente, el o los marcadores tumorales se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP.

40 Tal y como se utiliza aquí, el término "muestra" hace referencia a una muestra biológica obtenida para su evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra o la muestra del paciente incluyen preferiblemente cualquier fluido corporal o muestra tisular. Las muestras preferibles son la sangre total, el suero, el plasma, el lavado broncoalveolar (LBA), el fluido de recubrimiento epitelial (ELF), la orina o el esputo, y las más preferibles son el plasma o el suero.

50 Tal y como se utiliza aquí, el término "muestra tisular" y/o "sección de tejido" hace referencia a una muestra biológica tomada de un paciente durante la cirugía, una resección terapéutica o una biopsia (por ejemplo una biopsia incisional, una biopsia excisional, un biopsia nuclear o una biopsia con aspiración con aguja), lo cual incluye la sustracción de células o tejidos para su evaluación *in vitro*. Cuando se lleva a cabo el análisis de acuerdo con la presente invención, el material de la muestra tisular se utiliza directamente o como "lisado de tejido". Una "muestra tisular", tal y como se utiliza aquí, también hace referencia a cortes finos de tejido que habitualmente se logran mediante la utilización de un micrótopo. En cualquiera de las realizaciones descritas del método que incluyen una muestra biológica, tal muestra biológica puede montarse en un portaobjetos de microscopio (aunque no es necesario), puede tratarse de una sección de tejido (tal como una sección de tejido fijada en formalina y embebida en parafina) y/o puede tratarse de un tejido neoplásico (tal como, un cáncer de pulmón, un cáncer colorrectal, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer gástrico o un glioblastoma).

60 Tal y como se utiliza aquí, un "lisado tisular", "lisado celular", "lisado", "muestra lisada", "extracto de tejido" o "extracto celular" hace referencia a una muestra y/o material de muestra biológica que incluye tejido o células lisadas, es decir en la que se ha alterado la integridad estructural del tejido o las células. Para liberar el contenido de las células o de una muestra tisular, el material se trata habitualmente con enzimas y/o con productos químicos para disolver, degradar o alterar las paredes celulares y las membranas celulares de tales tejidos o células. Los expertos en la materia están familiarizados con los métodos adecuados para la obtención de lisados.  
65 Este proceso se denomina con el término "lisis".

El término "evaluar el cáncer" y en particular "evaluar el cáncer de pulmón" se utiliza para indicar que el método de acuerdo con la presente invención ayudará (por sí solo o en conjunto con otros marcadores o variables, por ejemplo, los criterios descritos por la UICC (véase más arriba)) a que el médico, por ejemplo, establezca o confirme la ausencia o presencia de cáncer, en particular del CP; ayudará al médico en el pronóstico, la detección de recurrencias (seguimiento de pacientes tras la cirugía) y/o la monitorización del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

Tal y como apreciarán los expertos en la materia, cualquier evaluación se lleva a cabo *in vitro*. La muestra del paciente se descarta posteriormente. La muestra del paciente sólo se utiliza en el diagnóstico *in vitro* del método de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. Habitualmente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo, sangre total, suero, o plasma.

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se utilizan de acuerdo con su utilización convencional. Las definiciones de los términos comunes de la biología celular y molecular se pueden encontrar en Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287-9; Kendrew et al. (editores), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A. (editor), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569-8).

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para evaluar el cáncer, por ejemplo el CP, *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, y el método incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de la proteína PACAP y/o fragmentos de la misma, y la utilización de la concentración determinada en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

En otra realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para evaluar el CP *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, y el método incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de la proteína PACAP y/o fragmentos de la misma y la utilización de la concentración determinada en la evaluación del CP.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar una concentración aumentada del marcador PACAP en un porcentaje significativo de muestras derivadas de pacientes con cáncer, en particular con cáncer de pulmón, colon, vejiga, cervix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar. Aún más sorprendentemente han sido capaces de demostrar que el aumento de la concentración de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en tal muestra obtenida de un individuo puede utilizarse en la evaluación del cáncer, en particular en los tipos de cáncer mencionados con anterioridad.

La situación ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un solo acontecimiento o proceso causara la enfermedad respectiva, tal como por ejemplo en las enfermedades infecciosas. En el resto de casos, el diagnóstico correcto puede ser difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se comprende por completo, como es el caso de la mayoría de tipos de cáncer, por ejemplo el CP. Tal y como apreciarán los expertos en la materia, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad del 100% y, al mismo tiempo, una sensibilidad del 100% en una enfermedad multifactorial, por ejemplo el CP. Por contra, los marcadores bioquímicos, por ejemplo el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 125, el proGRP, el CCE, o como se muestra aquí, la PACAP pueden utilizarse para evaluar con cierta probabilidad o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, ausencia, o gravedad de una enfermedad. Por consiguiente, en el diagnóstico clínico de rutina, se suelen considerar varios síntomas clínicos junto con marcadores biológicos para el diagnóstico, tratamiento y manejo de la enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o, en una realización preferible de la invención, pueden medirse simultáneamente mediante la utilización de un chip o una cuenta basada en la tecnología de arrays. Entonces, las concentraciones de los biomarcadores se interpretan independientemente, por ejemplo, mediante la utilización de un valor de corte individual para cada marcador, o se combinan para su interpretación.

En una realización preferible adicional, la evaluación del cáncer de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en un método que incluye la medición en una muestra de suero o plasma de la concentración de a) una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma, b) uno o más marcadores adicionales de cáncer, y c) la utilización de los resultados de la medición, por ejemplo la concentración determinada en el paso (a) y el paso (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer.

En la evaluación del cáncer, el marcador PACAP será una ventaja en uno o más de los siguientes aspectos: cribado; ayuda diagnóstica; pronóstico; monitorización de la terapia, tal como la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia.

## Cribado:

El cribado se define como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar en individuos, por ejemplo, individuos con riesgo, indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de cáncer. Preferiblemente, la población de cribado está compuesta por individuos de los que se tiene la certeza de que presentan un riesgo mayor al promedio de cáncer. Por ejemplo, una población de cribado para el cáncer de pulmón está compuesta por individuos de los que se tiene la certeza de que presentan un riesgo mayor al promedio de cáncer de pulmón, como lo son los fumadores, ex fumadores, trabajadores expuestos al uranio, cuarzo o asbesto.

En una realización preferible, se utiliza una muestra tisular o cualquier fluido corporal tal como el plasma, el suero, las heces, la orina, o el esputo como muestra en el cribado de cáncer, por ejemplo de cáncer de pulmón.

En otra realización preferible del CP, se utiliza esputo como muestra en el cribado del cáncer de pulmón.

Para la mayoría de enfermedades, no hay ningún marcador bioquímico único en la circulación que cumpla los criterios de sensibilidad y especificidad requeridos para los fines de cribado. Esto también puede aplicarse al cáncer y, en particular, al cáncer de pulmón. Debe esperarse la utilización de un panel de marcadores que incluye varios marcadores para el cribado del cáncer. Los datos establecidos en la presente invención indican que el marcador PACAP formará parte integral de un panel de marcadores apropiado para los fines de cribado. Por consiguiente, la presente invención hace referencia a la utilización de la PACAP como un marcador de un panel de marcadores de cáncer, es decir un panel de marcadores que incluye la PACAP y uno o más marcadores con el fin del cribado del cáncer. En particular, la presente invención hace referencia a la utilización de la PACAP como un marcador de un panel de marcadores de cáncer generales. Tal panel de marcadores incluye el marcador PACAP y uno o más marcadores adicionales, por ejemplo marcadores generales de cáncer y/o marcadores para los tipos de cáncer mencionados anteriormente.

También es probable que la PACAP contribuya a los paneles de marcadores de ciertos tipos específicos de cáncer, como por ejemplo el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar.

Un tipo de cáncer que preferiblemente puede evaluarse con un panel de marcadores que incluye la PACAP es el cáncer de pulmón (CP).

Los datos presentes también indican que ciertas combinaciones de marcadores serán ventajosas en el cribado del cáncer. Por ejemplo, en relación a la realización preferible del cribado del CP, la presente invención también hace referencia a la utilización de un panel de marcadores que incluye la PACAP y el CYFRA 21-1, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y el CEA, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y el CA 19-9, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y el CCE, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y el CA 125, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y la NSE, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y el proGRP, o de un panel de marcadores que incluye la PACAP y dos o más marcadores seleccionados a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP.

## Ayuda diagnóstica:

Los marcadores pueden ayudar al diagnóstico diferencial entre enfermedad benigna y maligna en un órgano particular, ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor o establecer los valores basales de marcadores antes de la cirugía.

Hoy en día, algunos métodos importantes utilizados en la detección del cáncer de pulmón son la radiología y/o el escáner por tomografía computarizada (TC). Con estos métodos se pueden visualizar pequeños nódulos, es decir, pequeñas regiones de tejido sospechoso. No obstante, muchos de estos módulos -más del 90% con TC- representan cambios tisulares benignos y sólo una minoría de los nódulos representa tejido canceroso. La utilización del marcador PACAP puede ser de ayuda en la diferenciación entre enfermedad benigna y maligna.

En una realización preferible, el marcador PACAP se utiliza en un método inmunohistológico para establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar, preferiblemente CP.

Dado que la PACAP como marcador único puede ser superior a otros marcadores, por ejemplo en el caso del CP frente a otros marcadores, como el CYFRA 21-1 o el CEA, debe esperarse que la PACAP se utilice como ayuda diagnóstica, especialmente para establecer el valor basal antes de la cirugía. Así, la presente invención también hace referencia a la utilización de la PACAP para establecer el valor basal antes de la cirugía del cáncer.

## Pronóstico:

Los indicadores pronósticos pueden definirse como características clínicas, patológicas o bioquímicas de los pacientes con cáncer y sus tumores que predicen con cierta probabilidad el resultado de la enfermedad. Su principal utilización es la ayuda para planificar racionalmente el manejo del paciente, es decir para evitar el infratratamiento de una enfermedad agresiva y el sobretratamiento de una enfermedad indolente, respectivamente. Molina R. et al., Tumor Biol. 24 (2003) 209-218 evaluaron el valor pronóstico del CEA, el CA 125, el CYFRA 21-1, el SSC y la NSE en el CPCNP. En su estudio, los niveles séricos anormales de los marcadores NSE, CEA, y LDH (lactato deshidrogenasa) parecieron indicar una supervivencia menor.

Dado que la PACAP sola contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes con cáncer, por ejemplo los pacientes con CP, de los controles sanos, debe esperarse que ésta ayude a evaluar el pronóstico de los pacientes que padecen cáncer, preferiblemente CP. Lo más probable es que el nivel preoperatorio de la PACAP se combine con uno o más marcadores adicionales de cáncer y/o el sistema de estadificación TNM. En una realización preferible se utiliza la PACAP en el pronóstico de los pacientes con CP.

## Monitorización de la quimioterapia:

Merle, P. et al., Int. J. of Biological Markers 19 (2004) 310-315 han evaluado las variaciones del nivel sérico del CYFRA 21-1 en pacientes con CPCNP localmente avanzado y tratados con quimioterapia de inducción. Concluyeron que la monitorización de los niveles séricos del CYFRA 21-1 puede ser útil como herramienta pronóstica de la respuesta tumoral y la supervivencia de los pacientes en Estadío III del CPCNP. Además, algunos documentos describen la utilización del CEA en la monitorización del tratamiento de los pacientes con CP (Fukasawa, T. et al., Gan to Kagaku Ryoho 13 (1986) 1862-1867). La mayoría de estos fueron ensayos retrospectivos, no aleatorizados e incluyeron un pequeño número de pacientes. Como en el caso de los estudios con el CYFRA 21-1, los estudios con el CEA sugirieron: a) que, en general, los pacientes que presentaron una disminución en los niveles de CEA mientras recibieron la quimioterapia obtuvieron un mejor resultado que los pacientes en los que los niveles de CEA no disminuyeron y (b) que, para casi todos los pacientes, el aumento en los niveles de CEA se asoció con la progresión de la enfermedad.

Se espera que la PACAP sea, al menos, tan buen marcador para la monitorización de la quimioterapia como lo son el CYFRA 21-1 o el CEA, respectivamente. Por consiguiente, la presente invención también hace referencia a la utilización de la PACAP en la monitorización de pacientes con cáncer y preferiblemente pacientes con cáncer de pulmón (CP) en tratamiento con quimioterapia. En una realización preferible, en la monitorización de la terapia se combinarán las mediciones de la PACAP y, al menos, un marcador seleccionado a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE, y/o el proGRP, y se utilizarán en la evaluación de CP.

## Seguimiento:

Una gran parte de los pacientes con CP que se sometieron a una resección quirúrgica buscando una extracción completa del tejido canceroso desarrollaron posteriormente una enfermedad metastática o recurrente (Wagner, H., Chest 117 (2000) 110S-118S; Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). La mayoría de estas recidivas aparecen en los primeros 2-3 años después de la cirugía. Debido a que la enfermedad recurrente/metastática es fatal de modo invariable si se detecta demasiado tarde, se han concentrado considerablemente los esfuerzos de investigación en la recidiva del cáncer en un estadio precoz y, por consiguiente, potencialmente tratable.

Consecuentemente, muchos pacientes con cáncer, por ejemplo los pacientes con CP, siguen un programa de vigilancia postoperatorio que habitualmente incluye la monitorización regular del CEA. Se ha observado que la monitorización seriada del CEA un año después de la resección quirúrgica detecta una enfermedad recurrente/metastática postoperatoria precoz con una sensibilidad de aproximada del 29%, con una especificidad de aproximadamente el 97%, incluso en ausencia de síntomas o signos sospechosos (Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). Así, el seguimiento de los pacientes con CP tras la cirugía es uno de los campos más importantes para la utilización de un marcador bioquímico adecuado. Debido a la alta sensibilidad de la PACAP en los pacientes con CP investigados, es probable que la PACAP sola o en combinación con uno o más marcadores adicionales sea de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes con CP, especialmente en los pacientes con CP tras la cirugía. La utilización de un panel de marcadores que incluye la PACAP y uno o más marcadores adicionales de CP en el seguimiento de los pacientes con CP representa una realización preferible adicional de la presente invención.

En una realización preferible, la presente invención hace referencia a la utilización de la PACAP en el campo diagnóstico del cáncer. Preferiblemente, la PACAP se utiliza en la evaluación del cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar, respectivamente.

En aún otra realización preferible, la presente invención hace referencia a la utilización de la PACAP como molécula marcador de cáncer, por ejemplo de cáncer en general o de tipos específicos de cáncer, tal como el cáncer de pulmón, colon, vejiga, cérvix, ovario, endometrio, cabeza y cuello, mama, melanoma, páncreas, riñón, próstata, esófago, estómago o conducto biliar; en combinación con una o más moléculas marcador de cáncer.

Las moléculas marcador adicionales pueden ser moléculas marcador generales e inespecíficas en cuanto a los tipos de cáncer y/o moléculas marcador específicas en cuanto a los tipos de cáncer, por ejemplo moléculas marcador de cáncer de pulmón o de colon. Se utilizan la PACAP y el, al menos, otro marcador adicional en la evaluación del cáncer, por ejemplo el cáncer de pulmón o de colon, en una muestra líquida obtenida de un individuo. Algunos marcadores de cáncer seleccionados y preferibles con los que se puede combinar la medición de la PACAP son el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE, el proGRP, el CA 15-3, el CA 27-29, la AFP, el PSA y la ferritina. En particular, los marcadores de CP adicionales, seleccionados y preferibles con los que se puede combinar la medición de la PACAP son el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP. Aún más preferible, el panel de marcadores utilizado en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP, incluye la PACAP y al menos otra molécula marcador seleccionada a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1 y el CEA.

Tal y como apreciarán los expertos en la materia, existen muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la cuestión diagnóstica bajo investigación. En un enfoque bastante sencillo pero, sin embargo efectivo en la mayoría de los casos, se asume un resultado positivo si una muestra es positiva para, al menos, uno de los marcadores investigados. Este puede ser el caso, por ejemplo, cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como el SIDA.

No obstante, la combinación de de marcadores se evalúa frecuentemente. Preferiblemente, los valores medidos para los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo de la PACAP y el 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 cualquiera de los métodos matemáticos apropiados del estado de la materia. Algunos métodos matemáticos conocidos para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad emplea métodos como el análisis discriminativo (DA) (es decir DA lineal, cuadrático o regularizado), los métodos Kernel (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, clasificadores de k-Nearest-Neighbor), PLS (cuadrados mínimos parciales), los métodos de tipo árbol (es decir, la regresión lógica, CART, los métodos Random Forest, los métodos Boosting/Bagging), los modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística), los métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), los modelos aditivos generalizados, métodos basados en lógica heurística, métodos basados en redes neuronales y algoritmos genéticos. Los expertos en la materia no tendrán problemas para seleccionar el método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferiblemente, el método utilizado en la correlación de la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo en ausencia o presencia de CP, se selecciona del grupo que incluye el DA (es decir el análisis discriminativo lineal, cuadrático o regularizado), los métodos Kernel (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, clasificadores de k-Nearest-Neighbor), PLS (cuadrados mínimos parciales), los métodos de tipo árbol (es decir, la regresión lógica, CART, los métodos Random Forest, los métodos Boosting), modelos lineales generalizados (es decir, regresión logística). Los detalles relacionados con estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I. et al., J. de Computational and Graphical Statistics 12 (2003) 475-511; Friedman, J.H., J. de la American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, T. et al., The Elements of Statistical Learning, Springer Series en Statistics (2001); Breiman, L. et al., Classification and regression trees, Wadsworth, Inc., California (1984); Breiman, L., Random Forests, Machine Learning 45 (2001) 5-32; Pepe, M.S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); y Duda, R.O. et al., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2ª edición (2001).

Es una realización preferible de la invención la utilización de un valor de corte multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para la discriminación entre el estado A y el estado B, por ejemplo, entre enfermo o sano. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que forman un panel de marcadores.

La precisión de un método diagnóstico se describe mejor mediante sus características operativas de receptor (ROC) (véase especialmente Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es un gráfico cuyos pares de sensibilidad/especificidad resultan de la variación continua del umbral de decisión por encima del rango completo de los datos observados.

El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de la precisión diagnóstica o la habilidad de clasificar de modo correcto a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La precisión diagnóstica mide la habilidad del ensayo para distinguir correctamente entre dos condiciones diferentes en los sujetos investigados. Tales condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o enfermedad benigna frente a maligna.

En cada caso, el gráfico ROC ilustra la superposición entre las dos distribuciones mediante la representación de

- la sensibilidad frente a 1-especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. En el eje Y se representa la sensibilidad o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados verdaderos positivos del ensayo)/(número de verdaderos positivos + número de resultados falsos negativos del ensayo)]. También se hace referencia a esto como positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje X se representa la fracción de falsos positivos, o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de especificidad y se calcula completamente a partir del subgrupo no afectado.
- Debido a que las fracciones de verdaderos y falsos positivos se calculan completamente por separado mediante la utilización de los resultados de los ensayos de dos subgrupos diferentes, el ensayo ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto en el gráfico ROC representa un par de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con una discriminación perfecta (sin superposición en las dos distribuciones de resultados) tiene un ensayo ROC que pasa por la esquina superior izquierda, donde la fracción de verdaderos positivos es de 1,0, o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones de resultados idénticas en los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda hacia la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se sitúan entre estos dos extremos. (Si el gráfico ROC se sitúa por completo bajo la diagonal de 45°, esto se puede remediar fácilmente mediante la inversión de los criterios de "positividad" desde "mayor de" a "menor de" o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cercano esté el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la precisión global del ensayo.
- Un modo preferible de cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. Por ejemplo, tal parámetro global se llama "error total" o alternativamente "área bajo la curva = AUC". La medida global más común es el área bajo el gráfico ROC. Por convención, este área siempre es  $\geq 0,5$  (si no lo es, se puede invertir la regla de decisión para que lo sea). Los valores se comprenden entre 1,0 (separación perfecta de los valores del ensayo en dos grupos) y 0,5 (sin diferencia distribucional aparente entre los dos grupos de valores del ensayo). El área no sólo depende de una fracción particular del gráfico, tal como el punto más cercano a la diagonal o a la sensibilidad con una especificidad del 90%, sino del gráfico completo. Esto es una expresión cuantitativa y descriptiva de cuán cercano está el gráfico ROC del gráfico perfecto (área = 1,0).
- Mediante la combinación de las mediciones de la PACAP con otros marcadores tales como el CYFRA 21-1 o el CEA, o con otros marcadores de CP por descubrir, se logra que la PACAP conduzca hacia mejoras adicionales en la evaluación del CP.
- En una realización preferible, la presente invención hace referencia a un método para mejorar la precisión diagnóstica para el cáncer, por ejemplo el CP, frente a controles sanos mediante la medición en una muestra de la concentración de, al menos, el PACAP y el CYFRA 21-1, y de manera opcional el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP, respectivamente; y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo de CP, y la mejora resulta en un mayor número de pacientes que se clasifican correctamente como enfermos de cáncer, por ejemplo de CP frente a controles sanos en comparación con una clasificación basada en la investigación de un único marcador.
- En un método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y CYFRA 21-1, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.
- En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.
- En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y CA 19-9, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.
- En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y CCE, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.
- En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y CA 125, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y NSE, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

5 En otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP y proGRP, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

10 En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP, CYFRA 21-1 y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

15 En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP, CYFRA 21-1 y CA 19-9, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

20 En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP, CYFRA 21-1 y CCE, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP, CYFRA 21-1 y CA 125, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

25 En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP, CYFRA 21-1 y NSE, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

30 En aún otro método preferible de acuerdo con la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores PACAP, CYFRA 21-1 y proGRP, respectivamente, y la combinación de marcadores se utiliza en la evaluación del cáncer, por ejemplo el CP.

35 Los siguientes ejemplos, listados de secuenciación y figuras se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención, el verdadero ámbito de la cual se describe en las reivindicaciones anejas.

#### Descripción de las figuras

40 **Figura 1** La figura 1 muestra una sección agrandada de un gel 2D típico, cargado con una muestra tumoral (panel B), y de un gel típico, cargado con una muestra control apareada (panel A). El círculo indica la posición de la proteína PACAP. B = panel B, muestra tumoral; A = panel A, muestra control.

45 **Figura 2** La figura 2 muestra el gráfico de las características operativas de receptor (gráfico ROC) de la evaluación de 60 muestras obtenidas de pacientes con CP en comparación con 60 muestras control obtenidas de 30 individuos obviamente sanos y 30 fumadores aparentemente sanos.

50 **Figura 3** La figura 3 muestra un análisis Western blot de lisados tisulares de cáncer de pulmón. Se analizaron 5 µg de proteínas totales de 20 lisados tisulares de cáncer de pulmón (10 adenocarcinomas y 10 carcinomas de célula escamosa) y sus lisados tisulares apareados de control, tal y como se describe en el ejemplo 5. M = peso molecular del marcador; T = lisado de tejido tumoral; N = lisado tisular de control apareado; las flechas indican la posición de la PACAP.

55 **Figura 4** La figura 4 muestra un análisis Western blot de lisados tisulares de cáncer de mama, colon, próstata y riñón. Se analizaron 5 µg de proteínas totales de 20 lisados tisulares de cáncer de pulmón (10 adenocarcinomas y 10 carcinomas de célula escamosa) y sus lisados tisulares apareados de control, tal y como se describe en el ejemplo 6. M = peso molecular del marcador; T = lisado de tejido tumoral; N = lisado tisular de control apareado; Mama = lisado tisular de cáncer de mama; Colon = lisado tisular de cáncer de colon; Próstata = lisado tisular de cáncer de próstata; Riñón = lisado tisular de cáncer de riñón; Bl. = lisado tisular de cáncer de vejiga; las flechas indican la posición de la PACAP.

60 **Figura 5** La figura 5 muestra un análisis comparativo de Western Blot de lisados tisulares de cáncer de pulmón, mama y colon. Los lisados tisulares de cáncer se analizaron tal y como se describe en los ejemplos 5 y 6. M = peso molecular del marcador; Lu = lisado tisular de cáncer de pulmón;

Ma = lisado tisular de cáncer de mama; Co = lisado tisular de cáncer de colon; las flechas indican la posición de la PACAP.

Figura 6 La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína PACAP (Id. de Sec. N° 1).

Descripción de las secuencias:

Id. de Sec. N° 1 muestra la secuencia de acuerdo con la figura 6. La secuencia de la proteína humana PACAP (número de acceso a la base de datos SwissProt: Q8WU39)

Id. de Sec. N° 2 muestra un cebador directo sintetizado LC13Bfor-EcoRI

Id. de Sec. N° 3 muestra un cebador inverso sintetizado LC13Brev-HindIII

Id. de Sec. N° 4 muestra una extensión peptídica sintetizada

Id. de Sec. N° 5 muestra una variante de empalme del gen humano de la PACAP: PACAP\_HUMAN-S2 (número de acceso a la base de datos SwissProt: Q8WU39-2)

Id. de Sec. N° 6 muestra una variante de empalme del gen humano de la PACAP: PACAP\_HUMAN-S3 (número de acceso a la base de datos SwissProt: Q8WU39-3)

Ejemplo 1

Identificación de la PACAP como marcador de cáncer de pulmón

Fuentes de tejido:

Para identificar proteínas específicas de tumores como marcadores diagnósticos de cáncer de pulmón, se lleva a cabo un análisis de dos tipos diferentes de tejido mediante métodos de proteómica.

En total, se analizan especímenes de tejido de 20 pacientes que padecen cáncer de pulmón (10 adenocarcinomas y 10 carcinomas de célula escamosa). De cada paciente se recogen dos tipos diferentes de tejido a partir de las resecciones terapéuticas: tejido tumoral (>80% de tumor) (T) y tejido sano adyacente (N). Éste último hace las veces de muestra de control sano apareado. Los tejidos se congelan instantáneamente tras la resección y se almacenan a -80°C antes de su procesamiento. Los tumores se diagnostican según criterios histopatológicos.

Preparación del tejido:

Se cortan 0,8-1,2 g de tejido congelado en pequeñas partes, se transfieren a un recipiente de molienda refrigerado de un molino mezclador de bolas y se congela por completo con nitrógeno líquido. El tejido se pulveriza en el molino de bolas, se disuelve en el volumen 10 veces mayor (w/v) de tampón de lisis (40 mM de citrato de Na, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, Genapol X-080 al 1%, acida de Na al 0,02%, Complete<sup>®</sup> sin EDTA [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Cat. 1 873 580]) y subsiguientemente se homogeniza en un homogeneizador de vidrio Wheaton<sup>®</sup> (20 x ajuste suelto, 20 x ajuste tendo). El homogenado se somete a centrifugación (10' a 5.000 x g), el sobrenadante se transfiere a otro vial y, de nuevo, se somete a centrifugación (15' a 20.000 x g). El sobrenadante resultante contiene proteínas solubles y se utiliza para el análisis posterior.

Depleción de la albúmina:

Para sustraer la gran abundancia de albúmina de los lisados tisulares preparados, los lisados se sometieron a cromatografía de inmunoafinidad utilizando una IgG monoclonal antialbúmina humana enlazada a Sepharose 4B activada con CNBr (GE Healthcare Europe GmbH, Munich, Alemania). Los lisados tisulares se concentraron mediante la utilización del aparato Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se inyectó 1 ml de los lisados concentrados en la columna de inmunoafinidad y se sometieron a cromatografía con un flujo máximo de 1 ml/min. El tampón utilizado fue el tampón de lisis sin Genapol X-080. El flujo sin albúmina se recogió y se utilizó para los análisis posteriores.

Enfoque isoeléctrico (IEF) y SDS-PAGE:

Para el IEF, se mezclaron 3 ml de la fracción de unión a la heparina sin albúmina con 12 ml del tampón de muestra (7 M de urea, 2 M de tiourea, CHAPS al 2%, tampón IPG al 0,4% pH 4-7, DTT al 0,5%) y se incubaron durante 1 h. Las muestras se concentraron en un aparato Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania) y se determinó la concentración de proteínas mediante la utilización del ensayo proteico Bio-Rad (N° de Cat. 500-0006; Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Alemania) siguiendo las instrucciones del manual del

fabricante. Se añadió el tampón de muestra a un volumen correspondiente a 1,5 mg de proteínas hasta formar un volumen final de 350 µl. Esta solución se utilizó para rehidratar tiras de IPG pH 4-7 (Amersham Biosciences, Freiburg, Alemania) durante la noche. El IEF se llevó a cabo mediante la utilización del siguiente protocolo de gradiente: 1.) 1 minuto a 500 V; 2.) 2 h. a 3500 V; 3.) 22 h. a 3500V constantes, dando lugar a 82 kVh. Tras el IEF, las tiras se almacenaron a -80 °C o se utilizaron directamente en la SDS-PAGE.

Antes de la SDS-PAGE, las tiras se incubaron en el tampón de equilibrio (6 M de urea, 50 mM de Tris/HCl, pH 8,8,

glicerol al 30%, SDS al 2%), para la reducción se añadió DDT (15 min., + 50 mg de DTT/10 ml), y para la aquilación se añadió IAA (15 min., + 235 mg yodacetamida/10 ml). Las tiras se pusieron en geles de poliacrilamida al 12,5% y se sometieron a electroforesis a 1 W/gel durante 1 h. y luego a 17 W/gel. Subsiguientemente, los geles se fijaron (metanol al 50%, acetato al 10%) y se tiñeron durante la noche con el kit de tinción de azul coloidal Novex® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, N° de Cat. LC6025, 45-7101).

Detección de la proteína PACAP como marcador potencial de cáncer de pulmón:

Cada paciente se analizó por separado mediante el análisis de imagen con el programa informático ProteomeWeaver® (Definiens AG, Munich, Alemania). Además, todos los puntos del gel se recogieron mediante un robot de recogida y se identificaron las proteínas presentes en los puntos mediante la espectrometría de masas MALDI-TOF (Ultraflex™ Tof/Tof, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania). Para cada paciente, se compararon 3 geles de la muestra tumoral con 3 geles de la muestra normal adyacente, y se analizaron los puntos distintivos correspondientes a las proteínas expresadas de forma diferencial. Mediante estos medios, se observó que la proteína PACAP se expresaba específicamente o se sobreexpresaba fuertemente en el tejido tumoral. Se detectó el punto de la proteína PACAP y se identificó en geles 2D de 13 pacientes con cáncer de pulmón, pero sólo en 4 muestras control. La sobreexpresión fue similar en el adenocarcinoma (AdCa) y el carcinoma de célula escamosa (CCE) (véanse la tabla 1 y la figura 1). Por consiguiente, la PACAP se calificó como un marcador candidato para su utilización en el diagnóstico del cáncer de pulmón.

Tabla 1

| Sobreexpresión de la proteína PACAP en los tumores pulmonares |                                            |         |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------|
|                                                               | Proteína detectada en (número de muestras) |         |
|                                                               | Tumor                                      | Control |
| Total                                                         | 13                                         | 4       |
| Adenocarcinoma (AdCa)                                         | 7                                          | 1       |
| Carcinoma de célula escamosa (CCE)                            | 6                                          | 3       |

#### Ejemplo 2

Generación de anticuerpos frente a la proteína marcador de cáncer de pulmón PACAP

Se generan anticuerpos policlonales frente a la proteína marcador de cáncer de pulmón PACAP para la utilización posterior del anticuerpo en la medición de los niveles séricos, plasmáticos y sanguíneos de la PACAP mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo el Western Blot y el ELISA.

Expresión de la proteína recombinante en *E. coli*:

Para generar anticuerpos frente a la PACAP, el antígeno recombinante se produce en *E.coli*. Por consiguiente, la región codificante de PACAP se amplifica mediante PCR a partir del clon de longitud completa de cDNA IRALp962G1939Q obtenido del German Resource Center for Genome Research (RZPD, Berlín, Alemania) mediante la utilización de los cebadores:

Cebador directo LC13Bfor-*EcoRI*:

5'ACGTACGTGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAC  
**ATG**AGAGGATCGCATCACCATCACCATCACATTGAAGGCCGTagg\_ctgtcactgc cactgctgc (Id. de Sec. N° 2 /*EcoRI* – el codón de inicio está subrayado),

Cebador inverso LC13Brev-HindIII:

5' acgtacgtaa gcttcatta gagctctct cttgtggctg (Id. de Sec. N° 3).

Aparte de los sitios de unión ribosomales y de clonación *EcoRI*, el cebador directo cuenta con oligonucleótidos que codifican por una extensión peptídica N-terminal MRGSHHHHHIEGR (Id. de Sec. N° 4) introducida dentro del marco de la proteína PACAP. Los fragmentos digeridos mediante PCR *EcoRI*/*HindIII* se ligaron en el fragmento del vector pQE-30 correspondiente (Qiagen, Hilden, Alemania), que posteriormente se transformó en

las células competentes *E.coli* XL1-blue. Tras el análisis de la secuencia, el plásmido se transforma en las células competentes *E.coli* BL21 para la expresión, bajo el promotor T5 inducible con IPTG, de las series de vector pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

- 5 Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHIEGR-PACAP, se sedimentó mediante centrifugación 1 l de un cultivo bacteriano inducido durante la noche y el sedimento celular se lisó mediante la resuspensión en 100 mM de tampón fosfato sódico, pH 8,0, 7 M de hidrocloreuro de guanidio, 5 mM de imidazol y 20 mM de tioglicerol. El material insoluble se sedimenta mediante centrifugación y el sobrenadante se aplica en una cromatografía de afinidad con metales de ácido Ni-nitrilotriacético (Ni-NTA): la columna se lavó con varios volúmenes de lecho del tampón de lisis, seguido de lavado con a) 100 mM de tampón fosfato sódico, pH 8,0, 10 mM de Tris-HCl, pH 8,0, 8 M de urea, 20 mM de tioglicerol; b) 100 mM de tampón fosfato sódico, pH 8,0, dodecilsulfato de sodio al 0,5% (SDS), 20 mM de tioglicerol; y c) 100 mM de tampón fosfato sódico, pH 8,0, SDS al 0,1%, 20 mM de tioglicerol. Finalmente, el antígeno unido se elude mediante la utilización de 100 mM de tampón fosfato sódico, pH 5,0, SDS al 0,1%, 20 mM de tioglicerol, bajo condiciones ácidas, y se almacenan en el mismo tampón a 4°C.

Generación de anticuerpos policlonales:

#### 20 a) Inmunización

Para la inmunización, se prepara una emulsión fresca de la solución de proteínas (100 µg/ml de la proteína PACAP) y el adyuvante Freund completo con una proporción de 1:1. Cada conejo se inmuniza con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. La sangre se drena y resulta en un suero anti-PACAP que se utiliza en los experimentos posteriores, tal y como se describe en los ejemplos 3 y 4.

#### 25 b) Purificación de la IgG (inmunoglobulina G) del suero de conejo mediante la precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio

30 Se diluye un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes del tampón acetato (60 mM, pH 4,0). El pH se ajusta a 4,5 con 2 M de Tris-base. Se añade ácido caprílico (25 µl/ml de la muestra diluida) gota a gota bajo agitación vigorosa. Después de 30 min., la muestra se centrifuga (13.000 x g, 30 min., 4°C), se desecha el sedimento y se recoge el sobrenadante. El pH del sobrenadante se ajusta a 7,5 mediante la adición de 2 M de Tris-base y se filtra (0,2 µm).

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

40 Se desecha el sobrenadante. El sedimento se disuelve en 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl y se dializa exhaustivamente. El dializado se centrifuga (13.000 x g, 15 min., 4°C) y se filtra (0,2 µm).

Biotinilación de la IgG policlonal de conejo:

45 Se lleva a la IgG policlonal de conejo a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl. Por cada ml de la solución de IgG se añaden 50 µl de biotin-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 min. a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex<sup>®</sup> 200 (10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl). Se recogen las fracciones que contienen la IgG biotinilada. Los anticuerpos monoclonales se biotinilan de acuerdo con el mismo procedimiento.

#### 50 Digoxigenilación de la IgG policlonal de conejo:

55 La IgG policlonal de conejo se lleva a una concentración de 10 mg/ml en 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, 30 mM de NaCl, pH 7,5. Por cada ml de la solución de IgG se añaden 50 µl del éster de N-hidroxisuccinimida de ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, Nº de Cat. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 min. a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex<sup>®</sup> 200 (10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaOH, pH 7,5, 30 mM de NaCl). Se recogen las fracciones que contienen la IgG digoxigenilada. Los anticuerpos monoclonales se marcan con digoxigenina de acuerdo con el mismo procedimiento.

## Ejemplo 3

ELISA para la medición de la PACAP en muestras de suero y plasma humano

- 5 Se desarrolló un ensayo ELISA en sándwich para la detección de la PACAP en el suero o plasma humano. Para la captura y detección del antígeno se conjugaron alícuotas del anticuerpo policlonal anti-PACAP (véase el ejemplo 2) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

- 10 Se incubaron placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con estreptavidina con 100 µl del anticuerpo policlonal biotinilado anti-PACAP durante 60 min. a 10 µg/ml en 10 mM de fosfato, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%. Entonces se incubaron los pocillos durante 2 h., bien con una dilución seriada de la proteína recombinante (véase el ejemplo 2) como antígeno estándar o bien con muestras diluidas de plasma de los pacientes. Tras la unión con la PACAP, las placas se lavaron tres veces con NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%.
- 15 Para la detección específica de la PACAP unida, se incubaron los pocillos con 100 µl del anticuerpo policlonal digoxigenilado anti-PACAP durante 60 min. a 10 µg/ml en 10 mM de fosfato, pH 7,4, NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%. Posteriormente, las placas se lavan tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En un paso posterior, los pocillos se incuban con 20 mU/ml de conjugados de anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Catálogo 1633716) durante 60 min. en 10 mM de fosfato, pH 7,4, BSA al 1%, NaCl al 0,9% y Tween 20 al 0,1%. Subsiguientemente, se lavaron las placas tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos entre el antígeno y el anticuerpo, los pocillos se incubaron con 100 µl de la solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Catálogo 11685767) y se midió el OD tras 30-60 min. a 405 nm con un lector de ELISA.

25 Ejemplo 4

Utilidad clínica de la PACAP en el cáncer de pulmón

- 30 La utilidad clínica de la PACAP se evalúa mediante el análisis de las muestras de suero obtenidas a partir de una cohorte de pacientes bien caracterizada. Se evalúan dos poblaciones de estudio que difieren en el número y población de controles y pacientes. El valor diagnóstico se evalúa mediante un análisis ROC y la determinación de la sensibilidad con una especificidad del 95%.

Primer estudio

- 35 Se utilizan las muestras que derivan de 60 pacientes con CPCNP bien caracterizados (30 adenocarcinomas, 30 carcinomas de célula escamosa) con la clasificación UICC proporcionada en la tabla 2.

Tabla 2

| Población del estudio               |                    |
|-------------------------------------|--------------------|
| Estadío de acuerdo a la UICC        | Número de muestras |
| UICC I/II                           | 24                 |
| UICC III                            | 17                 |
| UICC IV                             | 19                 |
| Donantes de sangre obviamente sanos | 30                 |
| Fumadores aparentemente sanos       | 30                 |

- 40 Se evalúa el nivel de la PACAP en las muestras de CP de la tabla 2 en comparación con 60 muestras control obtenidas de 30 individuos sanos y 30 fumadores aparentemente sanos sin enfermedad pulmonar maligna conocida (=cohorte control).

- 45 Se observa que el poder discriminativo para diferenciar a pacientes en el grupo de CP respecto a individuos sanos, que se mide mediante el área bajo la curva, es de un 82% de CP frente a los controles sanos (figura 2).

Con una especificidad del 95 %, la sensibilidad de todas las muestras de CP fue del 37%, 23% para los adenocarcinomas y 50% para los carcinomas de célula escamosa, respectivamente.

50 Segundo estudio

- 55 En un estudio multicéntrico, se recogió un gran número de muestras de suero clínicamente bien caracterizadas (tabla 3). Además de las muestras de personas sanas y de fumadores aparentemente sanos o ex fumadores, el colectivo total de control (233 muestras) incluye muestras de individuos con un riesgo aumentado de cáncer de pulmón debido a una exposición laboral y de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica en los estadios 0-II (EPOC).

En el grupo de cáncer de pulmón apareado por edad (tabla 4), los tipos histológicos de CPCNP más importantes de todos los estadios se representan tan bien como las muestras de pacientes con CPCP. El valor del AUC del análisis ROC de las muestras de CPCNP fue del 69 % y del 68% para las muestras de CPCP. Se obtienen valores de entre 62-74% mediante la agrupación de las muestras de CPCNP mediante los estadios de la UICC. De los diferentes grupos histológicos, las muestras de carcinoma de célula grande discriminan mejor (77% del AUC). De acuerdo con esto, la sensibilidad para este tipo histológico fue la mayor, con una selectividad del 95%.

Tabla 3:

| Características de las muestras de control de la población del segundo estudio |        |               |
|--------------------------------------------------------------------------------|--------|---------------|
| Colectivo de control                                                           | Número | Edad (años)   |
| Total                                                                          | 233    | 47,7 +/- 14,9 |
| No fumadores sanos o ex fumadores (<5 paquetes/año)                            | 50     | 41,4 +/- 9,4  |
| Fumador/ex fumador aparente                                                    | 89     | 40,2 +/- 9,9  |
| EPOC                                                                           | 46     | 69,0 +/- 12,8 |
| Estadio 0                                                                      | 5      | 56,4 +/- 12,9 |
| Estadio I                                                                      | 11     | 59,5 +/- 11,3 |
| Estadio II                                                                     | 30     | 66,3 +/- 12,9 |
| Exposición laboral                                                             | 48     | 53,0 +/- 15,9 |
| Asbesto                                                                        | 11     | 56,6 +/- 14,9 |
| Polvo                                                                          | 10     | 34,6 +/- 7,4  |
| Radiación                                                                      | 26     | 58,6 +/- 13,5 |
| Silicio                                                                        | 1      | 50            |

Tabla 4

| Estadio e histología del cáncer de pulmón                         | Número | AUC % | Sensibilidad %<br>(con una especificidad del 95%) |
|-------------------------------------------------------------------|--------|-------|---------------------------------------------------|
| CPCNP                                                             | 323    | 69    | 26                                                |
| Estadio UICC I                                                    | 122    | 62    | 19,6                                              |
| Estadio UICC II                                                   | 52     | 74    | 34,6                                              |
| Estadio UICC III                                                  | 101    | 74    | 29,7                                              |
| Estadio UICC IV                                                   | 47     | 68    | 23,4                                              |
| Adenocarcinoma                                                    | 152    | 66    | 21,7                                              |
| Carcinoma de célula escamosa                                      | 87     | 73    | 27,5                                              |
| Carcinoma de célula grande                                        | 19     | 77    | 42,1                                              |
| Mezcla de CPCNP                                                   | 39     | 70    | 25,6                                              |
| Otros                                                             | 26     | 69    | 34,6                                              |
| CPCP<br>Estadio UICC (número)<br>I (6), II (4); III (20); IV (15) | 45     | 68    | 29                                                |

## Ejemplo 5

Western blot para la detección de la PACAP en tejido de cáncer de pulmón humano mediante la utilización del anticuerpo policlonal, tal y como se genera en el ejemplo 2

Los lisados tisulares de las muestras tumorales y las muestras de controles sanos se preparan tal y como se describe en el ejemplo 1, "preparación del tejido".

La SDS-PAGE y el Western blot se llevan a cabo mediante la utilización de reactivos y equipos de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra tisular evaluada, se diluyen 15 µg del lisado tisular en el tampón de muestra SDS NuPAGE® reductor (Invitrogen) y se calientan durante 10 min. a 95°C. Las muestras se hacen correr en geles de NuPAGE® al 4-12% (Tris-Glicina) en el sistema de tampón de ejecución MES. La mezcla proteica separada del gel se transfiere a membranas de nitrocelulosa mediante la utilización del Invitrogen XCell II® Blot Module (Invitrogen) y el sistema tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas se lavan 3 veces en PBS/Tween-20 al 0,05% y se bloquean con el tampón de bloqueo Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 h. El anticuerpo primario, suero policlonal de conejo anti-Q8WU39 (su generación se describe en el ejemplo 2), se diluye 1:10.000 en el suero de bloqueo Roti®-Block y se incuba con la membrana durante 1 h. Las membranas se lavan 6 veces en PBS/Tween-20 al 0,05%. El anticuerpo de conejo primario específicamente unido se marca con un anticuerpo IgG anticonejo de oveja, policlonal y conjugado con POD, se diluye a 10 mU/ml en 0,5 x tampón de bloqueo Roti®-Block. Tras la incubación durante 1 h., las membranas se lavan 6 veces en PBS/Tween-20 al 0,05%. Para la detección del anticuerpo anticonejo conjugado con POD, la membrana se incuba con el sustrato de Western Blot Lumi-LightPLUS (Nº para petición 2015196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expone a una película autorradiográfica.

La intensidad de la señal de la PACAP aumento en 16 de los 20 lisados tisulares tumorales obtenidos de los 20 diferentes pacientes con CP (figura 3). El nivel de expresión fue de >100 ng/mg. Por consiguiente, la abundancia aumentada de la PACAP en el tejido del cáncer de pulmón detectada mediante MALDI en el ejemplo 1 se confirmó mediante el análisis de Western blot.

Ejemplo 6

Western blot para la detección de la PACAP en tejido de mama y de colon humano mediante la utilización del anticuerpo policlonal, tal y como se genera en el ejemplo 2

Los lisados tisulares de las muestras tumorales y las muestras de controles sanos se preparan tal y como se describe en el ejemplo 1, "preparación del tejido".

La SDS- PAGE y el Western blot se llevan a cabo tal y como se describe en el ejemplo 5.

Tanto para el carcinoma de mama como para el de colon, se analizó el tejido tumoral y el tejido adyacente normal de 5 pacientes. Se observó la sobreexpresión de la proteína PACAP en 3 cánceres de mama y en 4 cánceres de colon en comparación con el tejido normal. El nivel de expresión varió entre las muestras y fue ligeramente menor en todos los cánceres de mama y colon respecto a los cánceres de pulmón. La abundancia aumentada de la PACAP en el tejido de cáncer de mama y de colon se confirmó mediante el análisis de Western blot (Figuras 4 y 5).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH  
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> PACAP como marcador para el cáncer

<130> Patente 25485 WO

<150> EP08019731  
<151> 12-11-2008

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1  
<211> 189  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Leu Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Trp Ala  
1 5 10 15

Ile Pro Gly Gly Leu Gly Asp Arg Ala Pro Leu Thr Ala Thr Ala Pro  
20 25 30

Gln Leu Asp Asp Glu Glu Met Tyr Ser Ala His Met Pro Ala His Leu  
35 40 45

Arg Cys Asp Ala Cys Arg Ala Val Ala Tyr Gln Met Trp Gln Asn Leu  
50 55 60

Ala Lys Ala Glu Thr Lys Leu His Thr Ser Asn Ser Gly Gly Arg Arg  
65 70 75 80

Glu Leu Ser Glu Leu Val Tyr Thr Asp Val Leu Asp Arg Ser Cys Ser  
85 90 95

Arg Asn Trp Gln Asp Tyr Gly Val Arg Glu Val Asp Gln Val Lys Arg  
100 105 110

Leu Thr Gly Pro Gly Leu Ser Glu Gly Pro Glu Pro Ser Ile Ser Val  
115 120 125

Met Val Thr Gly Gly Pro Trp Pro Thr Arg Leu Ser Arg Thr Cys Leu  
130 135 140

His Tyr Leu Gly Glu Phe Gly Glu Asp Gln Ile Tyr Glu Ala His Gln  
145 150 155 160

# ES 2 439 966 T3

Gln Gly Arg Gly Ala Leu Glu Ala Leu Leu Cys Gly Gly Pro Gln Gly  
165 170 175

Ala Cys Ser Glu Lys Val Ser Ala Thr Arg Glu Glu Leu  
180 185

<210> 2  
<211> 99  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador

<400> 2

acgtacgtga attcattaaa gaggagaaat taactatgag aggatcgcat caccatcacc 60

atcacattga aggccgtagg ctgtcactgc cactgctgc 99

<210> 3  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador

<400> 3  
acgtacgtaa gcttcatta gagctctct cttgtggctg 40

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

<220>  
<223> Polipéptido

<400> 4

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

<210> 5  
<211> 123  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Leu Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Trp Ala  
1 5 10 15

Ile Pro Gly Gly Leu Gly Asp Arg Ala Pro Leu Thr Ala Thr Ala Pro  
20 25 30

Gln Leu Asp Asp Glu Glu Met Tyr Ser Ala His Met Pro Ala His Leu  
35 40 45

Arg Cys Asp Ala Cys Arg Ala Val Ala Tyr Gln Ser Leu Leu Val Pro  
50 55 60

Asp Val Ala Lys Ser Gly Lys Gly Arg Asp Gln Thr Ser Tyr Leu Lys  
65 70 75 80

Leu Trp Gly Ala Ala Gly Ala Glu Arg Val Gly Leu His Gly Cys Pro  
85 90 95

Gly Pro Glu Leu Leu Pro Glu Leu Ala Gly Leu Arg Ser Ser Arg Ser  
100 105 110

Gly Pro Ser Glu Thr Ser His Arg Pro Arg Thr  
115 120

<210> 6  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Val Thr Gly Gly Pro Trp Pro Thr Arg Leu Ser Arg Thr Cys Leu  
1 5 10 15

His Tyr Leu Gly Glu Phe Gly Glu Asp Gln Ile Tyr Glu Ala His Gln  
20 25 30

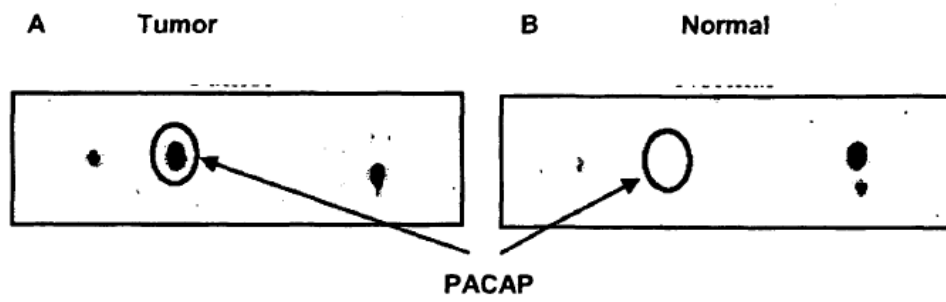
Gln Gly Arg Gly Ala Leu Glu Ala Leu Leu Cys Gly Gly Pro Gln Gly  
35 40 45

Ala Cys Ser Glu Lys Val Ser Ala Thr Arg Glu Glu Leu  
50 55 60

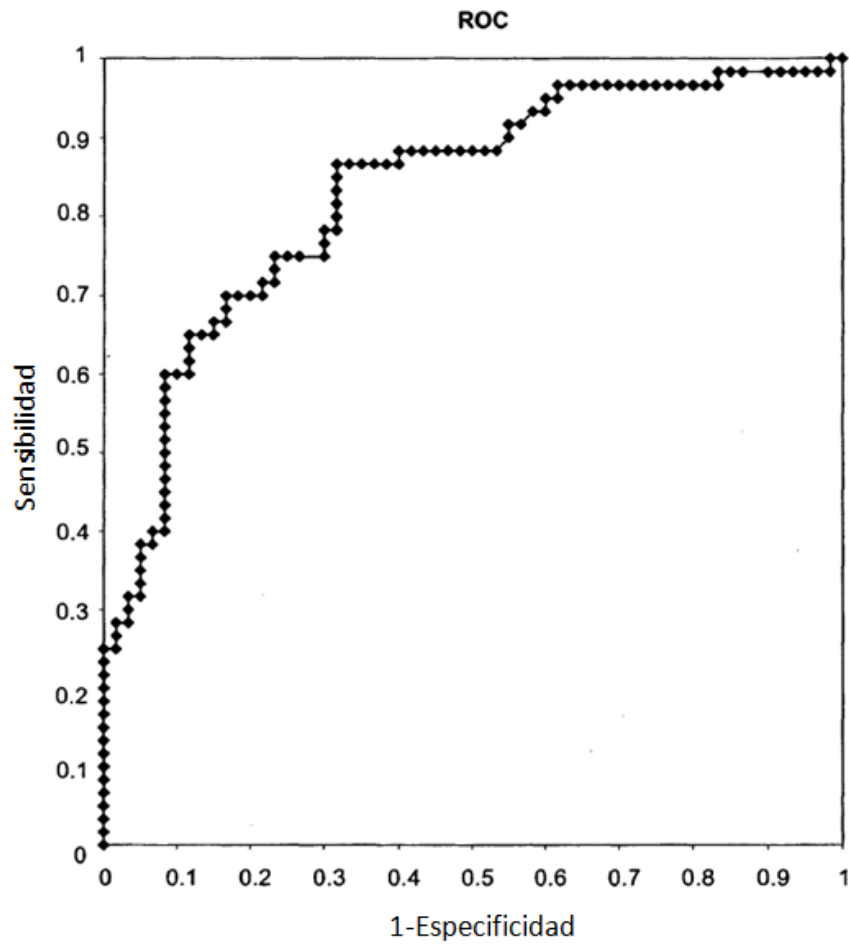
# REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el cáncer de pulmón *in vitro* que incluye la medición en una muestra de la concentración de  
5           (a) una proteína adaptadora de caspasa proapoptótica (PACAP) y/o los fragmentos de la misma, y  
             (b) la utilización del resultado de la medición del paso (a) en la evaluación del cáncer, en la que dicha muestra es suero o plasma, y en la que una concentración aumentada de una proteína PACAP y/o los  
10           fragmentos de la misma, en comparación con controles normales, indica la presencia de cáncer de pulmón.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que además se mide uno o más marcadores adicionales de cáncer.  
15
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, que también se caracteriza porque dicho uno o más marcadores adicionales se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP.
- 20 4. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-3, que también se caracteriza porque la concentración se mide mediante un método inmunológico.
5. La utilización de la proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer de pulmón, en la que una concentración aumentada de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma, en comparación con controles normales, indica la presencia de cáncer de pulmón.  
25
6. La utilización de acuerdo con la reivindicación 5 en la evaluación del cáncer de pulmón, particularmente el cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP).
- 30 7. La utilización de un anticuerpo dirigido frente a una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer de pulmón, en la que una concentración aumentada de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma, en comparación con controles normales, indica la presencia de cáncer de pulmón.
- 35 8. La utilización de un panel de marcadores que incluye una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma, y uno o más marcadores adicionales de cáncer en la evaluación del cáncer de pulmón, en la que una concentración aumentada de una proteína PACAP y/o los fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma, en comparación con controles normales, indica la presencia de cáncer de pulmón.
- 40 9. La utilización del panel de marcadores de acuerdo con la reivindicación 8, que también se caracteriza porque dicho uno o más marcadores adicionales se seleccionan a partir del grupo que incluye el CYFRA 21-1, el CEA, el CA 19-9, el CCE, el CA 125, la NSE y/o el proGRP.
- 45 10. La utilización del panel de marcadores de acuerdo con las reivindicaciones 8-9 en la evaluación del cáncer de pulmón, particularmente el CPCNP.

**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**

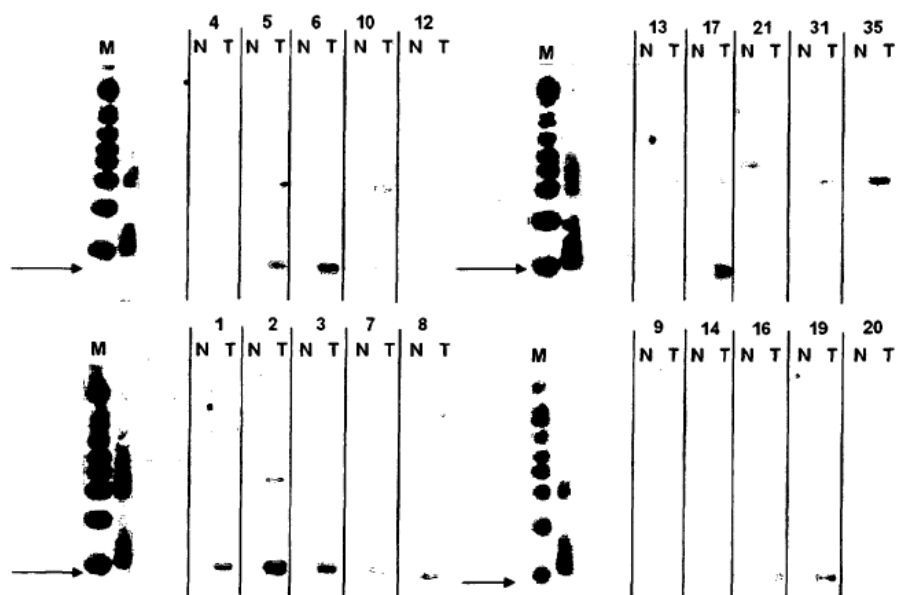
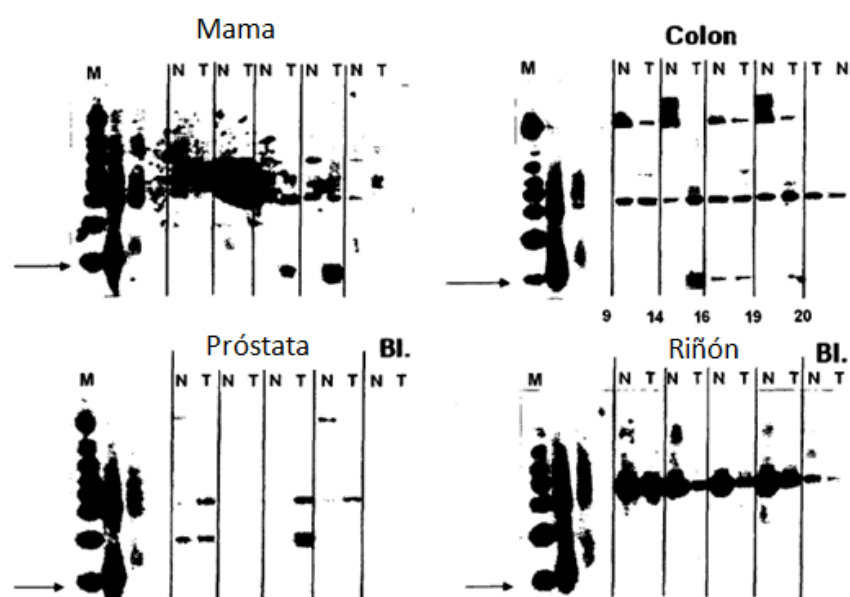
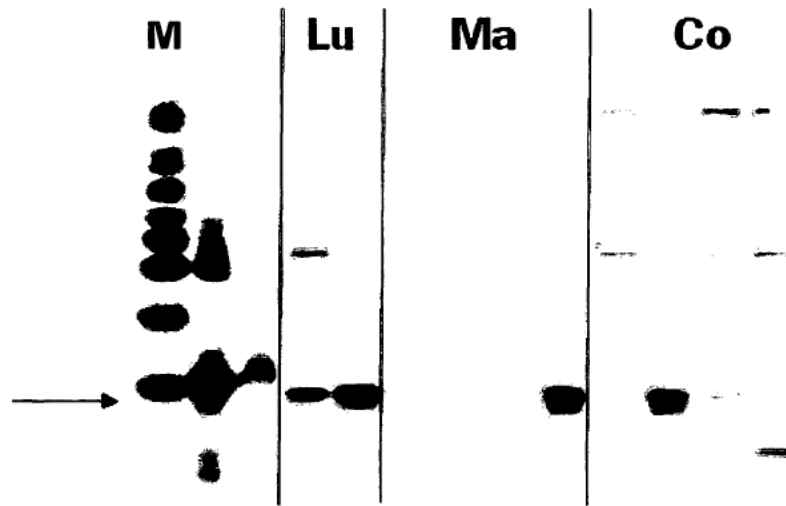


Fig. 4



**Fig. 5**



**Fig. 6**

MRLSLPLLLLLLGAWAIPGGLGDRAPLTATAPQLDDEEMYSAHMPAHLRCDACRAVAYQMWQN  
LAKAETKLHTSNSGGRRELSLVYTDVLDRSCSRNWQDYGVREVDQVKRLTGPGLESEGPEPSI  
SVMVTGGPWPTRLSRTCLHYLGEFGEDQIYEAHQQGRGALEALLCGGPQGACSEKVSATREEL