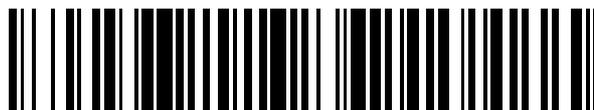


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 490 613**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09798890 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2380024**

54 Título: **ARMET como marcador de cáncer**

30 Prioridad:

22.12.2008 EP 08022238

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

04.09.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROESSLER, MARKUS;
KARL, JOHANN y
TACKE, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 490 613 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

ARMET como marcador de cáncer

5 La presente invención se refiere a un método para ayudar en la evaluación de cánceres. Divulga el uso de la proteína rica en arginina de los tumores tempranos metastatizados (= ARMET) como un marcador universal de diferentes tipos de cáncer. ARMET ayuda a la evaluación del cáncer pulmonar o de pulmón (CP) o del cáncer de colon, por ejemplo, el carcinoma no microcítico de pulmón (NSCLC) o el cáncer colorrectal (CCR), pero probablemente también de otros tipos específicos de cáncer. Dichos tipos específicos de cáncer son, por ejemplo, cáncer de mama, ovario, cuello
10 uterino, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago o conductos biliares. Además, se refiere específicamente a un método para evaluar el cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario *in vitro* a partir de una muestra de suero o de plasma derivada de un individuo, mediante la medición de ARMET en dicha muestra. La medición de ARMET puede usarse, por ejemplo, en la detección temprana del cáncer o en la vigilancia de los pacientes que se someten a cirugía.

15 El cáncer continúa siendo un importante desafío para la salud pública a pesar de los avances en detección y en terapia. Las células cancerosas se caracterizan por la producción de marcadores proteicos asociados a cáncer. Las proteínas asociadas a cáncer se encuentran tanto en los tejidos como en los fluidos corporales de un individuo portador de células cancerosas. Sus niveles son normalmente bajos en los estadios tempranos de la progresión del cáncer y se incrementan durante la progresión de la enfermedad y solamente en casos raros se observan proteínas que muestran un nivel reducido durante el curso de la progresión de la enfermedad. La detección sensible de estas proteínas es un enfoque ventajoso y prometedor para el diagnóstico del cáncer, en particular el diagnóstico del cáncer en un estadio temprano. Los tipos de cáncer más prevalentes son el cáncer de mama (CM), cáncer de pulmón (CP) y el cáncer colorrectal (CCR).

25 Los enfoques terapéuticos más importantes para tumores sólidos son:

- a) resección quirúrgica del tumor,
- b) quimioterapia,
- 30 c) radioterapia,
- d) tratamiento con productos biológicos, como los anticuerpos anti-tumorales o los anticuerpos anti-angiogénicos y
- e) una combinación de los métodos anteriores.

35 La resección quirúrgica de los tumores es un tratamiento ampliamente aceptado como tratamiento de primera línea para tumores sólidos en estadio temprano. La mayoría de los cánceres, sin embargo, solo se detectan cuando se vuelven sintomáticos, es decir, cuando los pacientes ya están en un estadio bastante tardío de la progresión de la enfermedad.

40 La estadificación del cáncer es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, progresión y severidad. Agrupa a los pacientes de cáncer de modo que se puedan hacer generalizaciones sobre el pronóstico y la elección de la terapia.

45 Los diferentes estadios del CCR solían clasificarse según los estadios de Dukes, de A a D. Actualmente, el sistema TNM es la clasificación de la extensión anatómica del cáncer más usada. Representa un sistema de estadificación uniforme y aceptado internacionalmente. Tiene tres variables básicas: T (la extensión del tumor primario), N (el estado de los ganglios linfáticos regionales) y M (la presencia o ausencia de metástasis a distancia). Los criterios de TNM los ha publicado la UICC (International Union Against Cancer), Sobin, L.H., Wittekind, Ch. (eds.), TNM Classification of Malignant Tumours, sexta edición (2002)). Una vez que se determina el estadio TNM, los pacientes se agrupan en estadios de la enfermedad que se denotan con números romanos que varían desde el I hasta el IV, siendo IV el estadio más avanzado de la enfermedad. La estadificación TNM y los estadios de enfermedad de UICC se corresponden entre sí tal como se muestra en la siguiente tabla tomada de Sobin y Wittekind (eds.), anteriormente citados.

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

Estadio de enfermedad de UICC	Estadificación T	Estadificación N	Estadificación 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

- Lo que es especialmente importante es que un cáncer con un diagnóstico temprano, por ejemplo, de CCR se traduce en un pronóstico mucho mejor. Los tumores malignos CCR de la zona colorrectal surgen a partir de tumores benignos, es decir, a partir de adenomas. Por lo tanto, el mejor pronóstico lo tienen aquellos pacientes que han sido diagnosticados en el estadio de adenoma. Los pacientes diagnosticados como de estadio temprano Tis, N0, M0 o T1-3; N0; M0, tienen una probabilidad de supervivencia de más de un 90% 5 años después del diagnóstico, si se tratan debidamente, en comparación con una tasa de supervivencia a los 5 años de solamente el 10 % para los pacientes diagnosticados cuando las metástasis a distancia ya están presentes.
- Los métodos de detección actuales, incluyendo los métodos de imagen, tales como los rayos X o la imagen por resonancia nuclear, teóricamente podrían ser apropiados al menos de manera parcial para su uso como una herramienta de cribado general. Sin embargo, son muy costosos e inasequibles para los sistemas de asistencia sanitaria para un uso generalizado y extendido en cribados a gran escala en un gran número de sujetos, particularmente para sujetos sin síntoma tumoral alguno.
- Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento simple y rentable de evaluaciones de tumores, por ejemplo, para identificar individuos sospechosos de tener cáncer. Para este propósito, sería deseable un marcador tumoral general que fuera detectable en los fluidos corporales, por ejemplo, en sangre o suero o en el plasma, o un panel de dichos marcadores.
- Una serie de marcadores tumorales séricos ya son de uso clínico. Por ejemplo, el fragmento soluble de 30 kDa de la citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembrionario (CEA), la enolasa específica de neuronas (NSE), y el antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC) son los marcadores de CP más prominentes. Sin embargo, ninguno de ellos reúne los criterios de sensibilidad y especificidad que se requieren para una herramienta de cribado (Thomas, L., Labor und Diagnose, TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, Alemania (2000)).
- A fin que sea de utilidad clínica, un nuevo marcador de diagnóstico como un marcador único debería ser comparable a otros marcadores conocidos en la técnica, o mejor. O, un nuevo marcador debería conducir a un progreso en la sensibilidad diagnóstica y/o especificidad, tanto si se usa solo como si se usa en combinación con uno o más marcadores adicionales, respectivamente. La sensibilidad diagnóstica y/o la especificidad de un ensayo se evalúan mejor por sus características de funcionamiento de receptor, las cuales se describirán en detalle más adelante.
- La sangre completa, el suero o el plasma son las fuentes de muestras de uso más amplio en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral temprano que podría ayudar en la detección fiable del cáncer o proporcionar información pronóstica temprana podría conducir a un método que ayudaría considerablemente en el diagnóstico y en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejorar la evaluación *in vitro* del cáncer y en particular del CP. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico temprano del cáncer, por ejemplo, CP, ya que los pacientes con diagnóstico temprano tienen probabilidades de supervivencia mucho mayores en comparación con aquellos diagnosticados en un estadio avanzado de enfermedad.
- La utilidad clínica de los marcadores bioquímicos en el cáncer de pulmón se ha revisado recientemente en (Duffy, M.J., Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262).
- Actualmente se considera que CYFRA 21-1 es el mejor de los marcadores tumorales conocidos en este momento para el cáncer de pulmón. Aunque no es organoespecífico, se encuentra predominantemente en el tejido pulmonar. Se ha descrito que la sensibilidad del CYFRA 21-1 para el cáncer de pulmón está entre el 46-61 % a una especificidad del 95 % para otras enfermedades benignas de pulmón. El incremento de los niveles séricos de CYFRA-21-1 también se asocia con importantes enfermedades benignas de hígado, insuficiencia renal y cáncer de vejiga invasivo. Se recomienda un ensayo de CYFRA-21-1 para la vigilancia de la terapia postoperatoria.
- El CEA pertenece al grupo de los antígenos carcinofetales, que normalmente se producen durante la embriogénesis. El CEA no es organoespecífico y se usa predominantemente para la supervisión del cáncer colorrectal. Además de otras malignidades, también varias enfermedades benignas tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis y enfermedades autoinmunitarias están asociadas con un aumento de los niveles séricos de CEA. Se ha informado que su sensibilidad para el cáncer de pulmón es del 29-44 %, a un 95 % de especificidad para enfermedades pulmonares benignas. El uso principal de CEA está en la supervisión del cáncer de colon, especialmente cuando la enfermedad ha metastatizado. Sin embargo, una diversidad de cánceres puede producir niveles elevados de CEA, incluyendo el cáncer de mama. Un uso preferente de CEA es la vigilancia de la terapia del cáncer de pulmón.
- El NSE es un marcador tumoral para el SCLC. En general, el aumento de los niveles séricos de NSE se encuentra asociado con tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. También se encuentran aumentos en los niveles séricos en pacientes con enfermedades benignas de pulmón y enfermedades cerebrales, tales como meningitis u otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y en lesiones traumáticas de la cabeza. Aunque se ha informado que la sensibilidad para SCLC a una especificidad del 95 % es del 60-87 %, el rendimiento de los ensayos de NSC para NSCLC es pobre (7-25 %). NSE está recomendado para la vigilancia de la terapia de SCLC.

El CA 19-9 (antígeno de carbohidrato 19-9), un antígeno de Lewis (a) sializado en un glucolípidio, es un marcador tumoral de cánceres gastrointestinales. Está presente en el epitelio gástrico, intestinal y pancreático fetal. También se pueden encontrar bajas concentraciones en tejido adulto en el hígado, los pulmones y el páncreas. No existe correlación entre la masa tumoral y los valores de ensayo de CA 19-9. Por lo tanto, la determinación de CA 19-9 no se puede usar para la detección temprana del carcinoma pancreático. Como la mucina se excreta exclusivamente a través del hígado, incluso una ligera coleostasis puede conducir a niveles séricos de CA 19-9 claramente elevados en algunos casos. El marcador se usa principalmente como una ayuda en la supervisión del estado de la enfermedad en aquellos pacientes a los que se les ha confirmado que tienen cáncer de páncreas (sensibilidad del 70-87 %). El 3-7 % de la población tiene la configuración de grupo sanguíneo de Lewis a-negativo/b-negativo y es incapaz de expresar la mucina con el determinante reactivo CA 19-9. Esto debe tenerse en cuenta al interpretar los hallazgos.

El CA 125 se encuentra en un alto porcentaje de tumores de ovario no mucinosos de origen epitelial y puede detectarse en suero. El carcinoma de ovario representa aproximadamente el 20 % de los tumores ginecológicos. Aunque los valores más altos de CA 125 se dan en pacientes que padecen carcinoma de ovario, también se observan valores claramente elevados en las malignidades de endometrio, mama, tracto gastrointestinal y varias otras malignidades. En ocasiones se encuentran valores incrementados en diversas enfermedades ginecológicas benignas tales como quistes ováricos, metaplasia de ovario, endometriosis, útero miomatoso o cervicitis. Pueden ocurrir ligeras elevaciones de este marcador en las fases tempranas del embarazo y en varias enfermedades benignas (por ejemplo, pancreatitis aguda y crónica, enfermedades gastrointestinales benignas, insuficiencia renal, enfermedades autoinmunes y otras). Se han encontrado niveles notablemente elevados en enfermedades benignas del hígado tales como la cirrosis y la hepatitis. Pueden ocurrir elevaciones extremas en cualquier tipo de ascitis debida a enfermedades malignas y benignas. Aunque el CA 125 es un marcador relativamente inespecífico, hoy en día es el marcador tumoral más importante para la supervisión de la terapia y el progreso de pacientes con carcinoma de ovario seroso. Se ha informado una sensibilidad del 69-71 % para una especificidad del 82-93 %.

El PSA ("antígeno prostático específico") es un marcador tumoral comúnmente ensayado que se usa en los análisis de sangre. PSA parece tener una alta especificidad tisular; la glicoproteína se encuentra en el epitelio prostático normal y en las secreciones, pero no en otros tejidos. PSA tiene una alta sensibilidad para la presencia de cáncer de próstata. La elevación se correlaciona con el estadio y el volumen tumoral. Es predictivo de recurrencia y respuesta al tratamiento. Finalmente, el antígeno tiene valor pronóstico en pacientes con valores muy altos antes de la cirugía, los cuales son propensos a recaer.

La NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa; Swiss-PROT: P40261) tiene un peso molecular aparente de 29,6 kDa y un punto isoeléctrico de 5,56. La NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida y otras piridinas. Esta actividad es importante para la transformación biológica de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. Se ha informado de que la proteína se expresa predominantemente en el hígado y está localizada en el citoplasma. La NNMT se ha clonado a partir de ADNc de hígado humano y contenía un marco de lectura abierto de 792 nucleótidos que codifica una proteína de 264 aminoácidos con una masa molecular calculada de 29,6 kDa (Aksoy, S., et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 14835-14840). Se sabe poco en la bibliografía sobre el papel potencial de la enzima en el cáncer humano. En un artículo, se informó del incremento de la actividad enzimática de NNMT en hígado como un marcador para la caquexia en cáncer en ratones (Okamura, A., et al., Jpn. J. Cancer Res. 89 (1998) 649-656). En un informe reciente, se demostró la regulación a la baja del gen de NNMT en respuesta a la radiación en líneas celulares sensibles a la radiación (Kassem, H., et al., Int. J. Cancer 101 (2002) 454-460). Se ha encontrado recientemente (documento WO 2004/057336) que la NNMT será de interés en la evaluación del CCR.

El ProGRP es un marcador tumoral, útil en la detección y en la supervisión del SCLC. También se encuentran niveles séricos incrementados en pacientes con enfermedades no malignas de pulmón/pleurales, tales como la fibrosis pulmonar idiopática o la sarcoidosis. Aunque se ha informado de que la sensibilidad para ProGRP en el campo del SCLC (a una especificidad del 95 %) es del 47-86 %, el rendimiento de las pruebas de ProGRP en el campo de NSCLC es pobre debido a que se ha informado de que la sensibilidad está por debajo del 10 %.

El SCC se identificó originalmente en CA de células escamosas de cuello uterino. La sensibilidad de SCC para CP en general es baja (18-27 %). Por lo tanto, los ensayos con SCC no se consideran adecuados para el cribado. Sin embargo, debido a una sensibilidad más alta para la el CA de células escamosas, un uso preferente de SCC es la vigilancia de la terapia, aunque el funcionamiento de CYFRA 21-1 en general es mejor.

Con respecto a los perfiles de marcadores y con el objetivo de mejorar el diagnóstico de cáncer de pulmón, se publicó un método (Schneider, J. et al., Int. J. Clin. Oncol. 7 (2002) 145-151) usando algoritmos de clasificación basados en lógica difusa para combinar los niveles séricos de CYFRA 21-1, NSE y la proteína C-reactiva (CRP), que es un marcador general de inflamación. Los autores informan de una sensibilidad del 92 % a una especificidad del 95 %. Sin embargo en este estudio, por ejemplo la sensibilidad de CYFRA 21-1 como un marcador tumoral único, según se ha informado, es del 72 % a una especificidad del 95 %, que es significativamente más alta que en muchos otros estudios descritos. Duffy, M.J., en Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 38 (2001) 225-262 informan de una sensibilidad entre el 46 % y el 61 %. Este alto rendimiento inusual alcanzado por Schneider et al., plantea algunas dudas y podría deberse a varios hechos. En primer lugar, el colectivo de pacientes control parece ser más joven que el colectivo de pacientes, es decir, los grupos no están bien emparejados por edad y el colectivo de pacientes comprende muchos estadios tardíos. En

segundo lugar, y aún más importante, el rendimiento del algoritmo se comprueba en las muestras del conjunto de capacitación que se usó para la determinación de los calificadores de lógica difusa. Por lo tanto, estos calificadores, estrictamente hablando, están “hechos a medida” para este conjunto y no se aplican a conjuntos de validación independientes. Bajo circunstancias normales, es de esperar que el mismo algoritmo aplicado a un conjunto de validación mayor, independiente y bien equilibrado conduzca a una reducción significativa del rendimiento total.

La labor de la presente invención fue investigar si se puede identificar un marcador bioquímico que pueda usarse para la evaluación de la enfermedad cancerosa. En particular, los inventores de la presente invención investigaron si se podría identificar un marcador bioquímico para la evaluación de diferentes tipos de cáncer, tales como cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conductos biliares en muestras de tejidos o fluidos corporales.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de la proteína ARMET como biomarcador puede solucionar al menos en parte algunos de los problemas de los marcadores actualmente conocidos en el estado de la técnica.

La presente invención se refiere a un método para evaluar el cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o de ovario *in vitro*, que comprende medir la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en una muestra de suero o plasma y usar los resultados de la medición, en particular la concentración determinada, en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.

Sorprendentemente, se ha descubierto que un incremento de la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en la muestra de suero o de plasma está asociada con la aparición del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario. Podría mostrarse que ARMET es un marcador que no es específico para un único tipo de cáncer, sino que es un marcador para diferentes tipos de cáncer, es decir, un marcador tumoral general. Dado que ARMET parece ser más bien específico para procesos tumorigénicos, el nuevo marcador tumoral ARMET tiene un gran potencial para ser de uso clínico para varias clases de tipos de tumor.

El método de la presente invención es adecuado para la evaluación de muchos tipos de cáncer diferentes. Se ha observado un incremento de las concentraciones de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en comparación con los controles normales, por ejemplo, en tipos específicos de cáncer como el cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conductos biliares, respectivamente.

Según una realización preferente de la invención, la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o de plasma a fin de evaluar un cáncer, tal como el cáncer de pulmón, colon, mama u ovario *in vitro*.

Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o de plasma a fin de evaluar un cáncer, tal como el cáncer de pulmón (CP) o cáncer colorrectal (CCR) *in vitro*.

Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o de plasma a fin de evaluar un cáncer, tal como el cáncer de pulmón (CP) *in vitro*.

Según otra realización preferente de la invención, la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma se mide en una muestra de suero o de plasma a fin de evaluar un cáncer, tal como el cáncer colorrectal (CCR) *in vitro*.

Una realización de la presente invención se refiere al cribado a gran escala de una población para distinguir entre individuos que probablemente están libres de cáncer e individuos que podrían clasificarse como casos “sospechosos”. Este último grupo de individuos podría someterse después a procedimientos diagnósticos adicionales, por ejemplo, mediante métodos de imagen u otros medios adecuados.

Una realización adicional de la presente invención se refiere a una mejora de los paneles de marcadores tumorales que son adecuados para el diagnóstico del cáncer en general o paneles de marcadores generales que son adecuados para el diagnóstico de un tipo específico de tumor, por ejemplo, cáncer de pulmón.

La presente invención también se dirige a un método para la evaluación *in vitro* del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario por medio de marcadores bioquímicos, que comprende medir la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma y de uno o más marcadores adicionales específicos de cáncer, en una muestra de suero o de plasma, y usar los resultados de las mediciones, en particular las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario. Los marcadores preferentes para su uso en combinación con ARMET son, por un lado, marcadores que son marcadores tumorales generales (es decir, marcadores que no son específicos para un único tipo de tumor) o, por otro lado, marcadores tumorales específicos (marcadores que son específicos para un único tipo de tumor). Los marcadores preferentes, por ejemplo, para la evaluación del cáncer, tal como cáncer de pulmón o cáncer de colon, son Cyfra 21-1,

CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y NNMT. Estos marcadores se pueden usar cada uno individualmente o en cualquier combinación junto con ARMET.

5 Si se evalúa el cáncer, según este método de la invención, dichos uno o más marcadores adicionales del cáncer respectivo se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y NNMT.

10 Por lo tanto, la presente invención, en una realización preferente, también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos el marcador ARMET y al menos un marcador tumoral adicional, por ejemplo, de Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y NNMT, en la evaluación de un cáncer, por ejemplo, el cáncer de pulmón y/o de colon.

15 Preferentemente, la presente invención se refiere a un método para la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario, *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma y de uno o más marcadores de cáncer adicionales, por ejemplo uno o más marcadores adicionales de cáncer de pulmón o cáncer de colon, en una muestra de suero o de plasma, y usar los resultados de las mediciones, en particular las concentraciones determinadas en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario. Es preferible que dichos uno o más marcadores adicionales se seleccionen del grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y NNMT.

20 La presente invención, en una realización preferente, también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y CYFRA 21-1 en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

25 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y CEA en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

30 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y NSE en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

35 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y CA 19-9 en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y CA 125 en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

40 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y PSA en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

45 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y ProGRP en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y SCC en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal.

50 La presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende al menos ARMET y NNMT en la evaluación de un cáncer, en particular CP o cáncer de colon, y más en particular NSCLC o cáncer colorrectal. La presente invención también se refiere al uso de una proteína ARMET y/o de fragmentos de la misma que se detectan en una muestra de suero o de plasma, en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario, donde un incremento de la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.

55 La presente invención también se refiere al uso de ARMET en la evaluación de varios tipos específicos de cáncer, en particular cáncer de pulmón, colon, mama y/u ovario.

60 La presente invención también se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario, donde en una muestra de suero o de plasma se detectan la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma y donde un incremento de la concentración de ARMET y/o fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.

65 En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario *in vitro*, que comprende medir en una muestra la concentración

de a) una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma, b) opcionalmente uno o más marcadores adicionales de cáncer, y (c) usar los resultados de la medición del paso (a) y opcionalmente del paso (b) en la evaluación del cáncer, donde dicha muestra es de suero o de plasma y donde un incremento de la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.

El término "medición" comprende preferentemente una medición cualitativa, semi-cualitativa o cuantitativa de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en una muestra. En una realización preferente, la medición es una medición semi-cuantitativa, es decir, se determina si la concentración de ARMET está por encima o por debajo de un valor de corte. Tal como apreciarán los expertos en la materia, en un ensayo de Sí- (presencia) o No- (ausencia), la sensibilidad del ensayo normalmente se ajusta para coincidir con el valor de corte. Un valor de corte puede determinarse, por ejemplo, a partir del ensayo en un grupo de individuos sanos. Preferentemente, el valor de corte se ajusta al resultado con una especificidad del 90 %, también preferentemente el valor de corte se ajusta al resultado con una especificidad del 95 %, o también preferentemente el valor de corte se ajusta al resultado con una especificidad del 98 %. Un valor por encima del valor de corte puede ser, por ejemplo, indicativo de la presencia de cáncer. En particular, un valor por encima del valor de corte puede ser indicativo, por ejemplo, de la presencia de cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conductos biliares. En una realización preferente adicional, la medición de ARMET es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales, la concentración de ARMET 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.

En otra realización preferente, el valor de corte se ajusta al resultado con una sensibilidad del 90 %, también se prefiere que el valor de corte se ajuste al resultado con una sensibilidad del 95 %, o también se prefiere que el valor de corte se ajuste al resultado con una sensibilidad del 98 %.

Un valor por debajo del valor de corte puede ser por ejemplo indicativo de la ausencia de cáncer. En particular, un valor por debajo del valor de corte puede ser por ejemplo indicativo de la ausencia de cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conductos biliares.

En una realización preferente adicional, la medición de ARMET es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales, la concentración de ARMET 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.

El papel biológico y la función de la proteína ARMET (rica en arginina, mutada en tumores en estadios tempranos, ARP, Swiss-PROT ID: P55145) sigue siendo desconocido en buena medida. La proteína ARMET, caracterizada por la secuencia proporcionada en SEC ID N°:1 (Fig. 6), es una proteína de 20,3 kDa. La proteína ARMET consiste en 179 aminoácidos, y lleva una secuencia señal predicha (aa 1-21). El gen correspondiente está localizado en la banda cromosómica 3p21.1 y se caracterizó por primera vez por Shridhar, V. et al. (*Oncogene* 12 (1996) 1931-1939). El gen está altamente conservado y se puede encontrar en muchas especies de mamíferos, como rata, ratón, vaca y hámster. ARMET se nombró de este modo porque los estudios iniciales sugirieron que ARMET era 50 aminoácidos más larga en el dominio N-terminal que lleva una región rica en arginina (Shridhar, V. et al., *Oncogene* 12 (1996) 1931-1939; Shridhar, R. et al., *Cancer Res.* 56 (1996) 5576-5578; Shridhar, V. et al., *Oncogene* 14 (1997) 2213-2216). Sin embargo, estudios más recientes indican la evidencia de un cuadro de lectura abierto más pequeño en la transcripción que no codifica para el tramo de arginina (Tanaka, H. et al., *Oncol. Rep.* 7 (2000) 591-593; Mizobuchi, N. et al., *Cell Struct. Funct.* 32 (2007) 41-50). Con la corrección del tamaño de la proteína correspondiente, el codón mutado descrito inicialmente (ATG₅₀) actualmente se ha identificado como un codón de iniciación.

Los primeros estudios del gen ARMET mostraron que una mutación específica (ATG₅₀ →AGG) estaba presente en determinadas subpoblaciones de muestras de numerosos tumores sólidos, como el carcinoma de células renales, cáncer de pulmón microcítico, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de mama y cáncer de páncreas (Shridhar, V. et al., *Oncogene* 12 (1996) 1931-1939; Shridhar, R. et al., *Cancer Res.* 56 (1996) 5576-5578; Shridhar, V. et al., *Oncogene* 14 (1997) 2213-2216). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que no existe correlación entre los polimorfismos de ARMET y el cáncer de páncreas (Piepoli, A. et al., *World J. Gastroenterology* 12 (2006) 6343-6348). En el documento WO 2004/108964 se analiza la expresión génica diferencial de secuencias de nucleótidos en más de 200 genes. Como uno de esos genes se ha encontrado ARNm de ARMET mediante análisis por RT-PCR. En Drach, et al. 2007. *Blood* 110 (2007) 141A se realizan análisis de proteómica en células primarias de mieloma y estudios de las expresiones aberrantes de numerosos genes. Se menciona a ARMET como uno de esos genes desregulados. Mizobuchi, et al., *Cell Structure and Function* 32 (2007) 41-50 muestran datos de la inducción de la expresión de ARMET mediante la acumulación de proteínas desestructuradas en el RE.

Petrova, P. et al. (*J. Mol. Neurosci.* 20 (2003) 173-188) purificaron el producto del gen ARMET a partir de medio acondicionado de una línea celular de astrocitos mesencefálicos de tipo-1 de rata y lo denominaron MANF (Factor Neurotrófico derivado de Astrocitos Mesencefálicos). Estudios más recientes demuestran que ARMET está regulado al alza por medio de la "respuesta a proteínas desestructuradas" (RPD), un proceso que se activa una vez que las proteínas desestructuradas se acumulan en el retículo endoplásmico (RE) (Tanaka, H. et al., *Oncol. Rep.* 7 (2000)

591-593; Apostolou, A. et al., Exp. Cell Res. 314 (2008) 2454-2467). En base a este estudio, ARMET se caracteriza como un nuevo mediador secretado de la ruta adaptativa de RPD.

5 Además de los estudios en la mutación de ATG₅₀, no se encuentran en la bibliografía estudios adicionales que relacionen ARMET con el diagnóstico o el pronóstico del cáncer.

Especialmente, aún no se ha informado de la sobreexpresión asociada a tumores, ni en el análisis transcripcional ni en estudios para la presencia de la proteína.

10 Tal como se usa en el presente documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado que se asocia con él en esta sección.

15 Los artículos “un”, “uno” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, “un marcador” significa un marcador o más de un marcador. La expresión “al menos” se usa para indicar que opcionalmente, pueden estar presentes uno o más objetos adicionales. A modo de ejemplo, un panel de marcadores que comprende al menos (los marcadores) ARMET y CYFRA 21-1 puede comprender opcionalmente uno o más marcadores adicionales.

20 La expresión “uno o más” denota de 1 a 50, preferentemente de 1 a 20, y también preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15.

25 El término “marcador” o la expresión “marcador bioquímico”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una molécula para su uso como una diana para analizar una muestra de ensayo de un paciente. Son ejemplos de dichas dianas moleculares proteínas o polipéptidos. Se contempla que las proteínas o polipéptidos que se usan como un marcador en la presente invención incluyen variantes de dichas proteínas que se dan de manera natural así como fragmentos de dicha proteína o dicha variante, en particular, fragmentos detectables inmunológicamente. Los fragmentos detectables inmunológicamente preferentemente comprenden al menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la materia reconocería que las proteínas liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular pueden dañarse, por ejemplo, durante la inflamación, y podrían degradarse o escindir-se en dichos fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que posteriormente puede activarse por medio de proteólisis. Tal como el experto en la materia apreciará, las proteínas o los fragmentos de las mismas también pueden estar presentes como parte de un complejo. Dicho complejo también puede usarse como un marcador en el sentido de la presente invención. Las variantes de un polipéptido marcador están codificadas por el mismo gen, pero pueden diferir en su punto isoeléctrico (=PI) o peso molecular (=MW), o ambos, por ejemplo, como resultado de un procesamiento alternativo del ARNm o pre-ARNm. La secuencia de aminoácidos de una variante es idéntica en un 95 % o más a la secuencia del marcador correspondiente. Además, o como alternativa, un polipéptido marcador o variante del mismo puede portar una modificación postraduccional. Son ejemplos de modificaciones postraduccionales glicosilación, acilación, y/o fosforilación.

40 ARMET:

45 Las proteínas ARMET, en particular las formas solubles de las proteínas ARMET y/o fragmentos de las mismas, se detectan en las muestras apropiadas. Preferentemente, la muestra procede de un sujeto humano, por ejemplo un paciente con un tumor, una persona con riesgo de tener un tumor o una persona que se sospecha que tiene un tumor. También ARMET se detecta preferentemente en una muestra de suero o de plasma.

50 En una realización preferente según la presente invención, se determina la concentración de una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma. En una realización, el marcador ARMET se mide específicamente en una muestra mediante el uso de un agente de unión específico.

55 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor de ARMET, una lectina que se una a ARMET o un anticuerpo para ARMET. Un agente de unión específico tiene al menos una afinidad de 10^7 l/mol por su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico preferentemente tiene una afinidad de 10^8 l/mol o también preferentemente de 10^9 l/mol por su molécula diana. Tal como apreciará el experto en la materia, el término específico se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para ARMET. Preferentemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta a la molécula diana tiene como resultado una afinidad de unión que es como máximo de solamente el 10 % o menor, solamente el 5 % o menor, solamente el 2 % o menor, o solamente el 1 % o menor que la afinidad de la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferente cumplirá ambos de los criterios mínimos anteriores para la afinidad, así como para la especificidad.

60 Un agente de unión específico es preferentemente un anticuerpo que reacciona con ARMET. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígenos de dichos anticuerpos, anticuerpos de cadena simple, así como a construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

65

Se puede usar cualquier fragmento de anticuerpo que reúna los criterios anteriores para un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan por el estado de los procedimientos de la técnica, por ejemplo, tal como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, 11, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, libro completo, especialmente las páginas 43-78). Además, el experto en la materia será bien consciente de los métodos basados en inmunoabsorbentes que pueden usarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante estos medios se puede potenciar la calidad de los anticuerpos policlonales y por lo tanto su rendimiento en inmunoensayos (Tijssen, P., anteriormente citado, páginas 108-115).

Para conseguir los objetivos divulgados en la presente invención, se pueden usar anticuerpos policlonales producidos en conejos. Sin embargo, claramente también se pueden usar anticuerpos policlonales de especies diferentes, por ejemplo, oveja o cabra, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cualquier cantidad que se requiera con propiedades constantes, representan herramientas ideales para el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. La generación y el uso de anticuerpos monoclonales para ARMET en un método según la presente invención, respectivamente, representan otras realizaciones preferentes.

Como el experto en la materia apreciará ahora que ARMET se ha identificado como un marcador que es útil en la evaluación del cáncer, preferentemente cáncer de pulmón o de colon, se pueden usar varios procedimientos de inmunodiagnóstico para alcanzar un resultado comparable a los objetivos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden usar estrategias alternativas para generar anticuerpos. Dichas estrategias comprenden, entre otras, el uso de péptidos sintéticos que representan un epítipo de ARMET para la inmunización. De manera alternativa, se puede usar inmunización con ADN, también conocida como vacunación con ADN.

Para la medición, la muestra obtenida a partir de un individuo se incuba con el agente de unión específico para ARMET en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión y ARMET. No es necesario que se especifiquen dichas condiciones, dado que el experto en la materia puede identificar fácilmente sin ningún esfuerzo inventivo dichas condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo de agente de unión y ARMET se mide y se usa en la evaluación del cáncer, preferentemente del cáncer de pulmón. Tal como el experto en la materia podrá apreciar existen numerosos métodos para medir la cantidad del complejo de agente unión específico y ARMET, todos ellos descritos en detalle en los libros de texto relevantes (cf., por ejemplo, Tijssen P., anteriormente citado, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

Preferentemente, ARMET se detecta en un formato de ensayo tipo sándwich. En dicho ensayo, por un lado se usa un primer agente de unión específico para capturar ARMET y por otro lado se facilita un segundo agente de unión específico, el cual está marcado para ser detectable directa o indirectamente. Los agentes de unión específicos usados en un formato de ensayo tipo-sándwich pueden ser anticuerpos que se dirigen específicamente contra ARMET. La detección puede llevarse a cabo mediante el uso de diferentes anticuerpos de captura y marcados, es decir, anticuerpos que reconocen diferentes epítopos de la proteína ARMET.

Un "marcador de cáncer" y, en particular, un "marcador de cáncer de pulmón" y "marcador de cáncer de colon" en el sentido de la presente invención es cualquier marcador que si se combina con el marcador ARMET añade información relevante en la evaluación de la enfermedad cancerosa, en la evaluación del cáncer en general o en la evaluación de ciertos tipos de cáncer, por ejemplo, en la evaluación del CP o del CCR. La información se considera relevante o de valor añadido si a una especificidad dada la sensibilidad, o si a una sensibilidad dada la especificidad, respectivamente, para la evaluación del cáncer se puede mejorar incluyendo dicho marcador en una combinación de marcadores que ya comprenden al marcador ARMET. En la realización preferente de la evaluación del cáncer, la mejora de la sensibilidad o de la especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de $p = 0,05$; $0,02$; $0,01$ o menor. Preferentemente, dichos uno o más marcadores adicionales se seleccionan del grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y NNMT.

El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra biológica obtenida para el propósito de la evaluación *in vitro*. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestra de paciente preferentemente puede comprender cualquier fluido corporal. Las muestras preferentes son sangre completa, suero, plasma, lavado bronquioalveolar (LBA), fluido del revestimiento epitelial (FRE) o esputo, siendo el plasma o el suero los más preferentes.

Las expresiones "muestra de tejido" y/o "sección de tejido", tal como se usan en el presente documento, se refieren a una muestra biológica tomada a partir de un paciente durante la cirugía, las resecciones terapéuticas o una biopsia (por ejemplo, biopsia incisional, biopsia excisional, biopsia de núcleo o una biopsia por aspiración con aguja) que implica la extracción de células o tejidos para el propósito de la evaluación *in vitro*. Cuando se realiza un análisis según la presente invención, el material de la muestra de tejido se usa bien directamente o bien como un "lisado tisular". Una "muestra de tejido" tal como se usa en el presente documento se refiere también a láminas finas de tejido que habitualmente se realizan usando un microtomo. En cualquier realización de método divulgada en la que esté implicada una muestra biológica, dicha muestra biológica puede (pero no necesariamente es) montarse en un portaobjetos de microscopio, es una sección de tejido (tal como una sección de tejido fijada con formalina y embebida en parafina), y/o es un tejido neoplásico (tal como un cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer gástrico, o glioblastoma).

Un "lisado tisular", "lisado celular", "lisado", "muestra de lisado", "extracto tisular" o "extracto celular" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una muestra y/o un material de una muestra biológica que comprende tejido o células lisadas, es decir, en el que se ha roto la integridad estructural del tejido o de las células. Para liberar el contenido de las células o de una muestra de tejido, el material se trata habitualmente con enzimas y/o con productos químicos para disolver, degradar o romper las paredes celulares y las membranas celulares de dichos tejidos o células. El experto en la materia está completamente familiarizado con los métodos apropiados para obtener lisados. Este proceso está abarcado por el término "lisis".

La expresión "evaluación del cáncer" y en particular "evaluación del cáncer de pulmón o del cáncer de colon" se usa para indicar que el método según la presente invención ayudará (solo o junto con otros marcadores o variables, por ejemplo, los criterios expuestos por la UICC (véase lo anterior)) al médico a establecer o confirmar la ausencia o presencia de cáncer, en particular de CP o de CCR o ayudará al médico en el pronóstico, la detección de recurrencias (seguimiento de los pacientes después de la cirugía) y/o supervisión del tratamiento, especialmente de la quimioterapia.

Tal como el experto en la materia apreciará, cualquiera de dichas evaluaciones se hace *in vitro*. La muestra del paciente se desecha tras el procedimiento. La muestra del paciente se usa únicamente para el método de diagnóstico *in vitro* de la invención y el material de la muestra del paciente no se vuelve a transferir al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida, por ejemplo, sangre completa, suero o plasma.

A menos que se indique lo contrario, los términos técnicos se usan según el uso convencional. Pueden encontrarse definiciones de los términos comunes en biología celular y molecular en Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287 9); Kendrew, J. et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9); y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8).

En una realización preferente, la invención se refiere a un método para la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP, *in vitro* mediante marcadores bioquímicos, que comprende medir la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en una muestra y usar la concentración determinada en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En otra realización preferente, la presente invención se refiere a un método para evaluar el CP *in vitro* por medio de marcadores bioquímicos, que comprende medir la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en una muestra y usar la concentración determinada en la evaluación de CP.

Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han sido capaces de detectar un incremento de la concentración del marcador ARMET en un porcentaje significativo de muestras procedentes de pacientes con cáncer, en particular con cáncer de pulmón, colon, mama u ovario. Aún más sorprendentemente, han sido capaces de demostrar que el incremento de la concentración de ARMET en dicha muestra obtenida a partir de un individuo puede usarse en la evaluación de un cáncer, en particular de las enfermedades cancerosas anteriormente mencionadas.

El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único evento o proceso podría causar la respectiva enfermedad como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos el diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende por completo como sucede en el caso de numerosos tipos de cáncer, por ejemplo para CP. Tal como el experto en la materia apreciará, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con un 100 % de especificidad y al mismo tiempo con un 100 % de sensibilidad para una enfermedad multifactorial dada, por ejemplo para CP. Más bien, los marcadores bioquímicos, por ejemplo, CYFRA 21-1, CEA, CA 125, ProGRP_-SCC o, tal como se muestra en el presente documento, ARMET pueden usarse para evaluar con cierta probabilidad o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, ausencia o la severidad de una enfermedad. Por lo tanto, en el diagnóstico clínico de rutina, generalmente se consideran conjuntamente varios síntomas clínicos y marcadores biológicos en el diagnóstico, tratamiento y gestión de la enfermedad subyacente.

Los marcadores bioquímicos se pueden determinar bien individualmente o bien, en una realización preferente de la invención, se pueden medir simultáneamente usando un chip o una tecnología de matriz basada en microesferas. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan después independientemente, por ejemplo, usando un valor de corte para cada marcador, o se combinan para su interpretación.

En una realización adicional preferente, la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario según la presente invención se realiza por un método que comprende la medición en una muestra de suero o de plasma de la concentración de a) una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma, b) uno o más marcadores adicionales de cáncer y c) el uso del resultado de la medición, por ejemplo, la concentración determinada en la etapa (a) y en la etapa (b), respectivamente, en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.

En la evaluación del cáncer, el marcador ARMET será ventajoso en uno o más de los siguientes aspectos: cribado; ayuda al diagnóstico; pronóstico; supervisión de la terapia tal como quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

Cribado:

5 Se define al cribado como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar a individuos, por ejemplo, individuos de riesgo, para indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de cáncer. Preferentemente, la población de cribado se compone de individuos que se sabe que tienen un riesgo de cáncer más elevado que la media. Por ejemplo, una población de cribado para el cáncer de pulmón se compone de individuos que se sabe que tienen un riesgo de cáncer de pulmón más elevado que la media, como fumadores, ex-fumadores y trabajadores expuestos al uranio, cuarzo o amianto.

10 En la realización preferente, como muestra en el cribado para cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, se muestra un fluido corporal tal como plasma, o suero.

15 Para numerosas enfermedades, ningún marcador bioquímico único en la circulación reunirá siempre los criterios de especificidad y sensibilidad que se requieren para los propósitos del cribado. Esto parece ser también cierto para el cáncer y, en particular, para el cáncer de pulmón. Es de esperar que tenga que usarse un panel de marcadores que comprende una pluralidad de marcadores en el cribado del cáncer. Los datos que se establecen en la presente invención indican que el marcador ARMET formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado para los propósitos del cribado. La presente invención, por lo tanto, se refiere al uso de ARMET como un marcador de un panel de marcadores de cáncer, es decir, un panel de marcadores que comprende ARMET y uno o más marcadores adicionales para los propósitos del cribado de cáncer. En particular, la presente invención se refiere al uso de ARMET como un marcador de un panel general de marcadores de cáncer. Dicho panel de marcadores comprende el marcador ARMET y uno o más marcadores adicionales, por ejemplo, marcadores generales de cáncer y/o marcadores para los tipos de cáncer mencionados anteriormente.

25 También es probable que ARMET contribuya a los paneles de marcadores para ciertos tipos específicos de cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, cuello uterino, cabeza y cuello, endometrio, melanoma, vejiga, riñón, páncreas, próstata, esófago, estómago y/o conductos biliares.

30 Los tipos preferentes de cáncer para la evaluación con un panel de marcadores que comprende ARMET son cáncer de pulmón, colon, mama u ovario.

Otros tipos preferentes de cáncer para la evaluación con un panel de marcadores que comprende ARMET son cáncer de pulmón (CP) o cáncer colorrectal (CCR).

35 Un tipo de cáncer preferente para la evaluación con un panel de marcadores que comprende ARMET es el cáncer de pulmón (CP).

40 Un tipo de cáncer preferente para la evaluación con un panel de marcadores que comprende ARMET es el cáncer de colon (CCR).

45 Los presentes datos además indican que ciertas combinaciones de marcadores serán ventajosas en el cribado de cáncer. Por ejemplo, en referencia a la realización preferente de cribado para CP o CCR, la presente invención también se refiere al uso de un panel de marcadores que comprende ARMET y CYFRA 21-1, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y CEA, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y NSE, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y CA 19-9, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y CA 125, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y PSA, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y ProGRP, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y SCC, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y NNMT, o de un panel de marcadores que comprende ARMET y dos o más marcadores seleccionados del grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y/o NNMT.

50 Ayuda al diagnóstico:

55 Los marcadores además pueden ayudar al diagnóstico diferencial de enfermedades benignas frente a malignas en un órgano en particular, ayudar a distinguir entre diferentes tipos histológicos de un tumor, o establecer un valor basal de un marcador antes de la cirugía de un cáncer.

60 Actualmente, los métodos importantes que se usan en la detección del cáncer de pulmón son la radiología y/o exploraciones por tomografía computarizada (TC). Los nódulos pequeños, es decir, regiones pequeñas de tejido sospechoso se pueden visualizar por estos métodos. Sin embargo, muchos de estos nódulos - más del 90 % con TC - representan cambios tisulares benignos, y solamente una minoría de los nódulos representa tejido canceroso. El uso del marcador ARMET puede ayudar en la diferenciación de enfermedad benigna frente a enfermedad maligna.

65 En una realización preferente, el marcador ARMET se usa en un método inmunohistológico a fin de establecer o confirmar los distintos tipos histológicos de cáncer de pulmón, colon, mama y/u ovario, preferentemente CP.

Dado que ARMET como marcador único puede ser superior, por ejemplo en el caso del CP, a otros marcadores como CEA o NSE, es de esperar que ARMET se use como una ayuda al diagnóstico, especialmente mediante el establecimiento de un valor basal antes de la cirugía. La presente invención, por lo tanto, se refiere también al uso de ARMET para el establecimiento de un valor basal antes de la cirugía para el cáncer.

5

Pronóstico:

Los indicadores pronósticos se pueden definir como las características clínicas, patológicas, o bioquímicas de los pacientes de cáncer y sus tumores, que predicen con una cierta probabilidad el desenlace de la enfermedad. Su uso principal es ayudar a planear racionalmente el tratamiento de los pacientes, es decir, evitar el infra-tratamiento de las enfermedades agresivas y el sobre-tratamiento de las enfermedades indolentes, respectivamente. Molina, R. et al., Tumor Biol. 24 (2003) 209-218 evaluaron el valor pronóstico de CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SSC y NSE en NSCLC. En su estudio, los niveles séricos anormales de los marcadores NSE, CEA, y LDH (lactato deshidrogenasa) parecían indicar una supervivencia más corta.

15

Como ARMET por si solo contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes de cáncer, por ejemplo los pacientes de CP o CCR, de los controles sanos, se espera que pueda ayudar en la evaluación del pronóstico de los pacientes que padecen cáncer, preferentemente de CP o CCR. El nivel preoperatorio de ARMET se combinará más probablemente con uno o más marcadores adicionales de cáncer y/o del sistema de estadificación TNM. En una realización preferente, ARMET se usa en el pronóstico de pacientes de CP o CCR.

20

Supervisión de la quimioterapia:

Merle, P. et al., Int. J. of Biological Markers 19 (2004) 310-315 han evaluado las variaciones de los niveles séricos de CYFRA 21-1 en pacientes con NSCLC localmente avanzado tratado con quimioterapia de inducción. Concluyen que la supervisión temprana de los niveles séricos de CYFRA 21-1 puede ser una herramienta pronóstica útil para la respuesta tumoral y la supervivencia en los pacientes en el estadio III de NSCLC. Además, ciertos informes han descrito el uso de CEA en la supervisión del tratamiento de pacientes con CP (Fukasawa, T. et al., Cancer & Chemotherapy 13 (1986) 1862-1867). La mayoría de estos fueron retrospectivos, no-aleatorios y contenían un pequeño número de pacientes. Como en el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios con CEA sugirieron: a) que los pacientes con una disminución en los niveles de CEA mientras recibían quimioterapia generalmente tenían un mejor desenlace que los pacientes en los que no disminuían los niveles de CEA y (b) para casi todos los pacientes, el incremento en los niveles de CEA se asociaba con la progresión de la enfermedad.

25

30

Se espera que ARMET sea al menos tan buen marcador para la supervisión de la quimioterapia como CYFRA 21-1 o CEA, respectivamente. La presente invención, por lo tanto, se refiere al uso de ARMET en la supervisión de pacientes de cáncer, y preferentemente pacientes de cáncer de pulmón (CP) o cáncer de colon (CCR), bajo quimioterapia. En la supervisión de la terapia, en una realización preferente se combinarán las mediciones para ARMET y para al menos un marcador seleccionado del grupo que consiste en CYFRA 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y/o NNMT y se usarán en la evaluación del cáncer de pulmón (CP).

40

Seguimiento:

Una gran parte de los pacientes de CP que se someten a una resección quirúrgica que aspiran a la eliminación completa del tejido canceroso, más tarde desarrollan recurrencia o enfermedad metastásica (Wagner, H. Jr., Chest 117 (2000) S110-S118; Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). La mayoría de estas recidivas ocurren dentro de los primeros 2-3 años después de la cirugía. Dado que la enfermedad recurrente/metastásica es invariablemente letal si se detecta demasiado tarde, la investigación se ha centrado considerablemente en las recidivas del cáncer en un estadio temprano y por lo tanto potencialmente tratable.

50

En consecuencia, numerosos pacientes de cáncer, por ejemplo pacientes de CP se someten a un programa de vigilancia postoperatoria que incluye frecuentemente la supervisión regular de CEA. Se ha mostrado que la supervisión seriada con CEA un año después de la resección quirúrgica detecta una recurrencia/enfermedad metastásica temprana con una sensibilidad de aproximadamente el 29 %, a una especificidad de aproximadamente el 97 %, incluso en ausencia de signos o síntomas sospechosos (Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. 75 (2003) 973-980). Por lo tanto, el seguimiento de los pacientes con CP después de la cirugía es uno de los campos más importantes de uso para un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad de ARMET en los pacientes de CP investigados, parece probable que ARMET, solo o en combinación con uno o más marcadores adicionales, sea de gran ayuda en el seguimiento de los pacientes de CP, especialmente en pacientes de CP después de la cirugía. El uso de un panel de marcadores que comprende ARMET y uno o más marcadores adicionales de CP en el seguimiento de los pacientes de CP representa una realización preferente adicional de la presente invención.

55

60

La presente invención, en una realización preferente, se refiere al uso de ARMET en el campo del diagnóstico del cáncer. Preferentemente, ARMET se usa en la evaluación del cáncer de pulmón, colon, mama u ovario, respectivamente.

65

En otra realización preferente adicional, la presente invención se refiere al uso de ARMET como una molécula marcadora de cáncer, por ejemplo para cáncer en general o para tipos específicos de cáncer tales como cáncer de pulmón, colon, mama u ovario, en combinación con una o más moléculas marcadoras adicionales de cáncer. Las moléculas marcadoras adicionales pueden ser moléculas marcadoras generales inespecíficas del tipo de cáncer y/o moléculas marcadoras específicas del tipo de cáncer, por ejemplo moléculas marcadoras de cáncer de pulmón o de colon. ARMET y dicho al menos un marcador adicional se usan en la evaluación del cáncer, por ejemplo, cáncer de pulmón o de colon en una muestra líquida que se obtiene de un individuo. Los marcadores de cáncer adicionales preferentes seleccionados con los que se puede combinar la medición de ARMET son Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 125, CA 19-9, PSA, ProGRP, SCC y NNMT. En particular, son marcadores preferentes seleccionados para el CP con los que se puede combinar la medición de ARMET CYFRA 21-1, CEA, CA 19-9, SCC, CA 125, ProGRP y/o NSE. Aún más preferentemente, el panel de marcadores que se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP comprende ARMET y al menos una molécula marcadora que se selecciona del grupo que consiste en CYFRA 21-1 y CEA.

Tal como el experto en la materia apreciará, existen numerosas maneras de usar las mediciones de dos o más marcadores a fin de mejorar la cuestión diagnóstica bajo investigación. En un enfoque muy simple, pero no obstante efectivo con frecuencia, se asume un resultado positivo si la muestra es positiva para al menos uno de los marcadores investigados. Esto puede, por ejemplo, ser el caso de cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como el SIDA.

Frecuentemente, sin embargo, se evalúa la combinación de marcadores. Preferentemente, los valores que se miden para los marcadores de un panel de marcadores, por ejemplo para ARMET y CYFRA 21-1, se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores de los marcadores se pueden combinar por cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica. Los métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad emplean métodos como Análisis Discriminante (AD) (es decir, AD lineal, cuadrático, regularizado), métodos de Kernel (es decir, SVM), Métodos no paramétricos (es decir, Clasificadores basados en k vecinos más cercanos), PLS (Mínimo cuadrático parcial), Métodos basados en Árboles (es decir, Regresión Lógica, CART, Métodos de Árbol de decisión, Métodos de Potenciación y Empaquetado), Modelos Lineales Generalizados (es decir, Regresión Logística), Métodos de análisis de Componentes Principales (es decir, SIMCA), Modelos Aditivos Generalizados, Métodos de Lógica Difusa, Redes Neuronales y métodos basados en Algoritmos Genéticos. El experto en la materia no tendrá problema en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. Preferentemente el método que se usa para correlacionar la combinación de marcadores de la invención, por ejemplo, con la ausencia o presencia de CP se seleccionan de DA (es decir, Análisis Discriminante Lineal, Cuadrático, Regularizado), Métodos de Kernel (es decir SVM), Métodos no paramétricos (es decir, Clasificadores basados en k vecinos más cercanos), PLS (Mínimo cuadrático parcial), Métodos basados en Árboles (es decir, Regresión Lógica, CART, Métodos de Árbol de decisión, Métodos de Potenciación y Empaquetado), o 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. of 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 in Statistics (2001); Breiman, L., et al., Classification and regression trees, California: Wadsworth (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 preferente de la invención usar un corte multivariado optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo enfermos de sanos. 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 por medio de sus características de funcionamiento del receptor (ROC) (véase especialmente Zweig, M.H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). La gráfica ROC es una representación de todos los pares de sensibilidad/especificidad resultantes de la variación constante del umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados.

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

En cada caso, las gráficas ROC representan el solapamiento entre las dos distribuciones mediante la representación de la sensibilidad frente a 1 - la especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje "y" está la sensibilidad, o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados del ensayo verdaderos positivos)/(número de resultados del ensayo verdaderos positivos + número de resultados del ensayo falsos negativos)]. Esto se ha citado también como positividad en presencia de una enfermedad o afección. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje "x" está la fracción de falsos positivos, o 1 - la especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados verdaderos negativos + número de resultados falsos positivos)]. Este 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 el uso de los resultados del ensayo de dos subgrupos distintos, la gráfica de ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la gráfica ROC representa un par de sensibilidad /1 – especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con una discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de resultados) tiene una gráfica ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, donde la fracción de verdaderos positivos es 1,0, o del 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). La gráfica teórica para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayoría de las gráficas están entre estos dos extremos (si la gráfica ROC está completamente debajo de la diagonal de 45°, esto se remedia fácilmente mediante la reversión de los criterios para la “positividad” desde “mayor que” a “menor que” o viceversa). Cualitativamente, cuanto más cerca esté la gráfica de la esquina superior izquierda, mayor será precisión global del ensayo.

Una manera preferente de cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. Tal parámetro global, por ejemplo, es el llamado “error total” o, como alternativa, el “área bajo la curva = AUC”. La medida global más común es el área debajo de la gráfica ROC. Por convenio, este área es siempre $> 0,5$ (si no es así, se puede revertir la norma de decisión para que así sea). Los valores varían entre 1,0 (separación perfecta de los valores del ensayo en los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia distributiva aparente entre los dos grupos de valores del ensayo). El área no depende solamente de una porción particular de la gráfica, tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90 % de la especificidad, sino de la gráfica entera. Esta es una expresión cuantitativa descriptiva del grado de proximidad de la gráfica ROC a la perfecta (área = 1,0).

Combinando las mediciones de ARMET con otros marcadores como CYFRA 21-1 o CEA, o con otros marcadores de CP aún por descubrir, ARMET conduce y conducirá, respectivamente, a mejoras adicionales en la evaluación del CP.

En una realización preferente, la presente invención se refiere a un método para la mejora de la precisión del diagnóstico del cáncer, por ejemplo, CP frente a controles sanos, mediante la medición en una muestra de la concentración de al menos ARMET y CYFRA 21-1, y opcionalmente de CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y/o NNMT, respectivamente, y la correlación de las concentraciones determinadas con la presencia o ausencia de cáncer, por ejemplo, CP, dando como resultado la mejora que más pacientes se clasifiquen correctamente como afectados de cáncer, por ejemplo CP frente a los controles sanos, en comparación con una clasificación basada en cualquier marcador único investigado individualmente.

En un método preferente según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y CYFRA 21-1, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y NSE, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y CA 19-9, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y CA 125, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y PSA, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y ProGRP, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y SCC, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En un método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET y NNMT, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

5 En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

10 En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y NSE, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

15 En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y CA 19-9, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

20 En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y CA 125, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y PSA, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

25 En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y ProGRP, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

30 En otro método preferente adicional según la presente invención, se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y SCC, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

35 En otro método preferente adicional según la presente invención se determina al menos la concentración de los biomarcadores ARMET, CYFRA 21-1, y NNMT, respectivamente, y la combinación de marcadores se usa en la evaluación del cáncer, por ejemplo, CP.

Los siguientes ejemplos, listado de secuencias y las figuras se proporcionan para ayudar en el entendimiento de la presente invención.

40 Descripción de la figuras

Figura 1 muestra análisis de transferencia de Western de lisados tisulares de cáncer de pulmón. Se analizaron 15 µg de proteína total de 10 lisados tisulares de adeno CA (panel A) y 10 lisados celulares de CA de células escamosas (panel B) y los lisados tisulares que correspondían al control se analizaron como se describe en el Ejemplo 5. M = marcador de peso molecular; T = lisado tisular de tumor; N = lisado celular que corresponde al control; rec Ag = ARMET producida recombinantemente; las flechas indican la localización de ARMET.

50 B = panel B, muestra tumoral;
A = panel A, muestra control.

Figura 2 muestra la gráfica de las características de funcionamiento del receptor (gráfica ROC) de ARMET en muestras de CP con un AUC de 0,86 para la evaluación de 366 muestras obtenidas de pacientes con CP en comparación con 50 muestras control obtenidas de individuos obviamente sanos.

55 Figura 3 muestra la gráfica de las características de funcionamiento del receptor (gráfica ROC) de ARMET en muestras de CCR con un AUC de 0,75 para la evaluación de 50 muestras obtenidas de pacientes con CCR en comparación con 50 muestras control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 4 muestra la gráfica de las características de funcionamiento del receptor (gráfica ROC) de ARMET en muestras de CM con un AUC de 0,86 para la evaluación de 49 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de mama en comparación con 50 muestras control obtenidas de individuos obviamente sanos.

60 Figura 5 muestra la gráfica de las características de funcionamiento del receptor (gráfica ROC) de ARMET en muestras de CO con un AUC de 0,91 para la evaluación de 43 muestras obtenidas de pacientes con cáncer de ovario en comparación con 50 muestras control obtenidas de individuos obviamente sanos.

Figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína ARMET humana (SEC ID N°:1).

65 Figura 7 Anticuerpo policlonal K4344 (Pab K4344), Pulmón normal P1381-TN20, a un aumento de 200 x.

Figura 7a Pab K4344, pulmón normal P1381-TN20, a un aumento de 200 x.

- Figura 8 Pab K4344, Adenocarcinoma pulmonar 725006.8, a un aumento de 200 x.
 Figura 8a Pab K4344, Carcinoma escamoso pulmonar F060010, a un aumento de 200 x.
 Figura 8b Pab K4344, Adenocarcinoma pulmonar 725006.1, a un aumento de 200 x.
 Figura 9 Pab K4344, Colon normal F07-2538A3.
 5 Figura 9a Pab K4344, Carcinoma de colon F08-0978.
 Figura 10 Pab K4344, Mama normal 06-1143.
 Figura 10a Pab K4344, Carcinoma mamario 06-1786.
 Figura 11 Pab K4344, Carcinoma de laringe (AST 292).
 Figura 11a Pab K4344, Carcinoma de ovario (TriStar 2n).
 10 Figura 12 Pab K4344, Melanoma (TriStar 4g).
 Figura 12a Pab K4344, Carcinoma pancreático (Tristar 5K).

Descripción de las secuencias

- 15 SEC ID N°: 1 muestra la secuencia según la Figura 6. La secuencia proteica de ARMET humana (base de datos SwissProt, número de acceso: P55145).
 SEC ID N°: 2 muestra un cebador directo sintetizado LC56for-EcoRI.
 SEC ID N°: 3 muestra un cebador inverso LC56rev-BamHI.
 20 SEC ID N°: 4 muestra una extensión del péptido sintetizado.

Ejemplo 1

Identificación de ARMET como un marcador potencial de cáncer de pulmón:

- 25 Fuentes de tejido:

A fin de identificar proteínas específicas de tumor como marcadores diagnósticos potenciales para el cáncer de pulmón, se realiza el análisis de dos tipos de tejidos diferentes usando métodos de proteómica.

- 30 En total, se analizan especímenes de tejido de 11 pacientes que padecen cáncer de pulmón (CP). Se recogen dos tipos de tejido diferentes de cada paciente a partir de resecciones terapéuticas: tejido tumoral (>80 % tumor) (T) y tejido adyacente sano (N). Este último sirve como muestra del control sano correspondiente. Los tejidos se congelan de forma instantánea inmediatamente después de la resección y se almacenan a -80 °C antes del procesamiento. Los tumores se diagnostican mediante criterios histopatológicos.

- 35 Preparación de los tejidos:

- Se cortan 0,8-1,2 g de tejidos congelados en trozos pequeños, se transfieren al recipiente de molienda enfriado de un molino mezclador de bolas y se congelan completamente mediante nitrógeno líquido. El tejido se pulveriza en el molino de bolas, se disuelve en 10 veces su volumen (p/v) de tampón de lisis (citratato-Na 40 mM, MgCl₂ 5 mM, 1 % de Genapol X-080, 0,02 % de Azida-Na, sin EDTA Complete® [Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Cat. 1.873.580]) y posteriormente se homogeneiza en un vaso homogeneizador Wheaton® (20 x suelto, 20 x ajustado). El homogeneizado se somete a centrifugación (10' a 5.000 x g), el sobrenadante se transfiere a otro vial y se vuelve a someter a centrifugación (15' a 20.000 x g). El sobrenadante resultante contiene las proteínas solubles y se usa para un posterior análisis.

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

- La concentración de proteína de la fracción de proteína soluble se determina usando el ensayo de Bradford. Se diluyen 400 µg de cada muestra con tampón de carga de Laemmli a una concentración de 2 mg/ml y se incuban a 95 °C durante 10 min. La electroforesis en gel (3 x 120 µg por muestra, 10-20 % de Tris-HCl de BioRad, 16 x 16 cm) se realizó siguiendo el manual de instrucciones de BioRad para "geles prefabricados grandes" (30 min - 25 mA, 2,5 h - 35 mA). Después de la separación de las proteínas, se incubó el gel con metanol al 50 %/ácido acético al 10 % durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de una incubación de 1 h con DTT 20 mM/NH₄HCO₃ 100 mM para la reducción y de 2 h con acetamida de yodo 100 mM/NH₄HCO₃ 100 mM para la alquilación. La tinción del gel se lleva a cabo durante toda la noche a temperatura ambiente con metanol al 20 %/azul de Coomassie al 20 % (kit de tinción Novex).

- La región entre los 6 y 31 kDa, tal como se indica por marcadores de proteínas, se corta y se rebana en trozos de un tamaño de 1 mm. El destañido total del gel se consigue mediante la incubación con NH₄HCO₃ 0,1 M/acetronitrilo al 30 %. Después de lavar con agua, los trozos de gel se secan en una Speedvac a 45 °C y 10 mbar. La digestión con tripsina (apta para proteómica, Roche Diagnostics GmbH) se realiza durante toda la noche a temperatura ambiente seguida de la extracción con acetronitrilo al 35 %/ácido fórmico al 0,1 %. La solución de extracción se evapora en una Speedvac y la muestra se resuelve en 100 µl de acetronitrilo al 5 %/ácido acético al 0,5 %/ácido fórmico al 0,1 %.

Análisis por LC-ESI-MSMS:

5 La digestión triptica (100 µl) se separa mediante una HPLC bidimensional (MudPIT) en un sistema Nano-LC (Ultimate, Famos, Switchos; LC Packings, Idstein, Alemania). La separación se realiza con columnas bidimensionales auto-empaquetadas (Sílice fundida: PicoFrit 75 µm, New Objective; RP: ProntoSil 120-5-C18 AQ+, Bischoff; SCX: Partisil 10, Whatman). Se generan 11 fracciones SCX mediante la elución en fases con cantidades crecientes sucesivamente de NH₄Ac (de 0 a 1.500 mM). Estas se separan posteriormente en la parte RP de la columna y se analizan en línea usando escaneos dependientes de datos con una trampa de iones ESI-MS (LCQ deca XP; Thermo Electron, Massachusetts, E.E.U.U.; véanse los parámetros en la tabla X). Para cada muestra se realizan tres series.
10 Los datos brutos se procesan con un sistema no comercial de manejo de datos propio de Roche que usa Sequest como algoritmo de base (véase los parámetros en la Tab. X). Se combinaron las listas resultantes de péptidos identificados y proteínas de las series de réplicas.

15 La proteína ARMET se identifica con ayuda de las secuencias identificadas y que se dan en la Tab. 2.

Detección de ARMET como un marcador potencial de cáncer de pulmón:

20 Para cada paciente, se comparan las proteínas identificadas y el número de péptidos correspondientes de la muestra del tumor con los resultados que corresponden del tejido adyacente normal. De esta manera, se descubre que la proteína ARMET está presente específicamente o es muy abundante en tejido tumoral y no es detectable o es difícilmente detectable en el tejido sano control.

Tabla 1: Adquisición de datos por MSMS y parámetros de búsqueda de bases de datos

Adquisición de datos por MSMS	Exclusión MS	350-2000 Da para iones precursores
	Recuento de repeticiones	2
	Duración de la repetición	0,25 min
	Tamaño de lista de exclusión	50
	Duración de la exclusión	5 min
	Amplitud de la masa de exclusión	bajo 0,5 Da, alto 1,5 Da
Sequest	Número de iones	30
	Intensidad mínima de los iones	10.000 unidades
	Tolerancia de masa del precursor	1,5 Da
	Tolerancia de masa del fragmento	1,5 Da
	X _{corr}	>1,8; 2,3, 2,8 (z = 1; 2; 3)
	dCn	> 0,1
	Sp	> 500
Bases de datos		Humangp (ensamblada por Roche Bioinformatics)

25 La proteína ARMET está fuertemente sobre-representada en tejido tumoral de pacientes que padecen cáncer de pulmón. Las siguientes secuencias peptídicas de la proteína ARMET se identifican mediante la búsqueda en el formulario de la base de datos "LCQ-MS²-data" en tejido tumoral:

30 Usando el método descrito anteriormente se han identificado las siguientes secuencias derivadas de ARMET.

Tabla 2: Secuencias identificadas por ESI-MSMS

Secuencia identificada	Tramo de aminoácidos de ARMET (cf. SEC ID N°: 1)
• DRDVTFSPATIENELIK	• 43-59
• DVTFSPATIENELIK	• 45-59
• IINEVSKPLAHHIPVEK	• 85-101
• LCYYIGATDDAATK	• 71-84

Secuencia identificada	Tramo de aminoácidos de ARMET (cf. SEC ID N°: 1)
• QIDLSTVDLK	• 121-130

Ejemplo 2

5 Generación de anticuerpos para la proteína marcadora de cáncer ARMET

Se genera un anticuerpo policlonal para la proteína marcadora de cáncer de pulmón ARMET, para el uso del anticuerpo en la medición de los niveles séricos, plasmáticos y sanguíneos de ARMET mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo, transferencia de Western y ELISA.

10

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

A fin de generar anticuerpos contra ARMET, se produce el antígeno recombinante en *E. coli*: Por lo tanto, la región que codifica ARMET se amplifica por PCR a partir del clon de ADNc de longitud completa IRAUp969D0638D obtenido del German Resource Center for Genome Research (RZPD, Berlín, Alemania) usando los cebadores:

15

Cebador directo LC56for-*EcoRI*:

20 5' acgtacgtagaattcattaaagaggagaaattaactatATGAGAGGA TCGCATCACCATCACCATCACATTGAAGGCCG-TAGGAGGATGTGGGCC ACGCAG (SEC ID N°: 2 / *EcoRI* – sitio subrayado, nucleótidos codificantes en letra mayúscula),

Cebador inverso LC56rev-*BamHI*:

25 5' acgtacgtggatcctcattaCAAATCGGTCCGTGCACTGG (SEC ID N°: 3 / *BamHI* - sitio subrayado, nucleótidos codificantes en letra mayúscula).

El cebador inverso se caracteriza (además de por los sitios de clonación para *EcoRI* y los de unión a ribosomas) por oligonucleótidos que codifican un péptido de extensión MRGSHHHHHHIEGR N-Terminal (SEC ID N°: 4) que se introduce en fase con la proteína ARMET. El fragmento de PCR digerido por *EcoRI/BamHI* se liga en el correspondiente fragmento del vector pQE-30 (Qiagen, Hilden, Alemania) que posteriormente se utiliza para transformar células competentes *E.coli* XL1-blue. Después del análisis de la secuencia, el plásmido se utiliza para transformar células competentes *E.coli* BL21 para la expresión bajo el promotor de T5 inducible por IPTG de las series de vectores pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

35

Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-ARMET, se precipitaron por centrifugación 11 cultivos bacterianos que se indujeron durante toda la noche y los precipitados celulares se lisaron mediante resuspensión en tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0, clorhidrato de guanidinio 7 M, imidazol 5 mM, tioglicerol 20 mM. El material insoluble se precipita por centrifugación y el sobrenadante se aplica a una cromatografía de afinidad por metales inmovilizados en ácido nitriloacético-Ni (Ni-NTA): la columna se lava con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis, seguido de lavados con a) tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, urea 8 M, tioglicerol 20 mM; b) tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,5 %, tioglicerol 20 mM; y c) tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 8,0, SDS al 0,1 %, tioglicerol 20 mM. Finalmente, el antígeno unido se eluye usando tampón de fosfato de sodio 100 mM, pH 5,0, SDS al 0,1 %, tioglicerol 20 mM, bajo condiciones ácidas, y se almacena en el mismo tampón a 4 °C.

40

45

Generación de anticuerpos policlonales

a) Inmunización

50

Para la inmunización, se prepara una nueva emulsión de la solución de proteína (100 µg/ml de la proteína ARMET) y adyuvante completo de Freund a una proporción 1:1. Se inmuniza cada conejo con 1 ml de la emulsión en los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrae sangre y el suero anti-ARMET resultante se usa para posteriores experimentos tal como se describe en los ejemplos 3 y 4.

55

b) Purificación de IgG (inmunoglobulina G) a partir de suero de conejo mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato de amonio.

60

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

La inmunoglobulina del sobrenadante se precipita con agitación vigorosa mediante la adición por goteo de una solución de sulfato de amonio 4 M hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogen por centrifugación (8.000 x g, 15 min, 4 °C).

Se desecha el sobrenadante. El precipitado se disuelve en NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializa exhaustivamente. El dializado se centrifuga (13.000 x g, 15 min, 4 °C) y se filtra (0,2 μm).

Biotinilación de IgG policlonal de conejo:

Se lleva IgG policlonal de conejo a 10 mg/ml en NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG se añaden 50 μl de Biotina-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 min a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex 200 (NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogen las fracciones que contienen IgG biotinilada. Los anticuerpos monoclonales se biotinilan según el mismo procedimiento.

Digoxigenilación de IgG policlonal de conejo:

Se lleva IgG policlonal de conejo a 10 mg/ml en NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, NaCl 30 mM, pH 7,5. Por cada ml de solución de IgG se añaden 50 μl de digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico-éster de N-hidroxisuccinimida (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, N° de Cat. 1.333.054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 min a temperatura ambiente, la muestra se cromatografía en Superdex 200 (NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogen las fracciones que contienen IgG digoxigenilada. Los anticuerpos monoclonales se marcan con digoxigenina según el mismo procedimiento.

Ejemplo 3

ELISA para la medición de ARMET en muestras humanas de suero, de plasma o de otros fluidos corporales.

Para la detección de ARMET en suero o plasma humano, se desarrolla un ELISA tipo "sándwich". Para la captura y la detección del antígeno, se conjugan alícuotas del anticuerpo policlonal anti-ARMET (véase el Ejemplo 2) con biotina y digoxigenina, respectivamente.

Se incuban placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas de estreptavidina con 100 μl de anticuerpo policlonal anti-ARMET biotinilado durante 60 min a 10 μg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1 %, NaCl al 0,9 % y Tween 20 al 0,1 %. Después de la incubación, las placas se lavan tres veces con NaCl al 0,9 %, Tween 20 al 0,1 %. Después, se incuban los pocillos durante 2 h con una dilución seriada de la proteína recombinante (véase el Ejemplo 2) como antígeno patrón, o con muestras de plasma diluidas de pacientes. Después de unir ARMET, las placas se lavan tres veces con NaCl al 0,9 %, Tween 20 al 0,1 %. Para la detección específica de ARMET unida, los pocillos se incuban con 100 μl de anticuerpo policlonal anti-ARMET digoxigenilado durante 60 min a 10 μg/ml en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1 %, NaCl al 0,9 % y Tween 20 al 0,1 %. Después de eso, las placas se lavan tres veces para eliminar el anticuerpo no unido. En un siguiente paso, los pocillos se incuban con 20 mU/ml de conjugados anti-digoxigenina-POD (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Cat. 1633716) durante 60 min en fosfato 10 mM, pH 7,4, BSA al 1 %, NaCl al 0,9 % y Tween 20 al 0,1 %. Posteriormente, las placas se lavan tres veces con el mismo tampón. Para la detección de los complejos antígeno-anticuerpo, los pocillos se incuban con 100 μl de solución ABTS (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, N° de Cat. 11685767) y se miden las DO después 30-60 min a 405 nm con un lector de ELISA.

Ejemplo 4

ARMET como un marcador sérico de cáncer de pulmón

Se usan muestras procedentes de 366 pacientes de cáncer de pulmón bien caracterizados (148 adeno-CA, 87 CA de células escamosas, 44 CA microcítico, 87 CA pulmonares distintos) con la clasificación UICC dada en la Tabla 3.

Tabla 3: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	167
UICC III	112
UICC IV	58
No estadificados	29
Donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de ARMET en las muestras de CP de la Tabla 3 se evalúa en comparación con 50 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos (= cohorte control), con un AUC de 0,86 (Fig. 2).

Ejemplo 5

5

ARMET como un marcador sérico de cáncer colorrectal (CCR)

Se usan muestras procedentes de 50 pacientes de cáncer colorrectal bien caracterizados con la clasificación UICC dada en la Tabla 3.

10

Tabla 4: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	26
UICC III	17
UICC IV	6
No estadificados	1
Donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de ARMET en las muestras de CCR de la Tabla 4 se evalúa en comparación con 50 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos (= cohorte control), con un valor de AUC de 0,75 (Fig. 3)

15 Ejemplo 6

ARMET como un marcador sérico de cáncer de mama (CM)

Se usan muestras procedentes de 49 pacientes de cáncer de mama bien caracterizados con la clasificación UICC dada en la Tabla 3.

20

Tabla 5: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	26
UICC III	11
UICC IV	13
Donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de ARMET en las muestras de CM de la Tabla 5 se evalúa en comparación con 50 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos (= cohorte control), con un valor de AUC de 0,86 (Fig. 4).

25

Ejemplo 7

ARMET como un marcador sérico de cáncer de ovario (CO)

Se usan muestras procedentes de 43 pacientes de cáncer de ovario (CO) bien caracterizadas con la clasificación UICC dada en la Tabla 3.

30

Tabla 6: Población de estudio

Estadio según la UICC	Número de muestras
UICC I/II	12
UICC III	21
UICC IV	10
Donantes de sangre obviamente sanos	50

El nivel de ARMET en las muestras de CO de la Tabla 6 se evalúa en comparación con 50 muestras control obtenidas a partir de individuos obviamente sanos (= cohorte control), con un valor de AUC de 0,91 (Fig. 5)

Ejemplo 8

Transferencia de Western para la detección de ARMET en tejidos humanos con cáncer de pulmón (CP) usando un anticuerpo policlonal tal como se genera en el Ejemplo 2.

Se preparan lisados tisulares de muestras de tumores y muestras control tal como se describe en el Ejemplo 1, en "preparación de los tejidos"

La SDS-PAGE y la transferencia de Western se llevan a cabo usando reactivos y equipamiento de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania. Para cada muestra de tejido ensayada, se diluyen 15 µg de lisado tisular en tampón de carga de la muestra reductor con SDS NuPAGE® (Invitrogen) y se calientan durante 10 min a 95 °C. Las muestras se hacen correr en geles NuPAGE® (Tris-Glicina) al 4-12 % en el sistema tampón de carga de electroforesis MES. La mezcla de proteínas separada por el gel se transfiere a membranas de nitrocelulosa, usando el módulo de transferencia XCell II™ de Invitrogen y el sistema de tampón de transferencia NuPAGE®. Las membranas se lavan 3 veces con PBS/Tween-20 al 0,05 % y se bloquean con tampón de bloqueo Roti®-Block (A151.1; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemania) durante 2 h. El anticuerpo primario, suero policlonal de conejo Anti-ARMET (cuya generación se describe en el Ejemplo 2), se diluye a 1:10.000 en tampón de bloqueo Roti®-Block y se incuba con la membrana durante 1 h. Las membranas se lavan 6 veces con PBS/Tween-20 al 0,05 %. El anticuerpo primario de conejo unido específicamente se marca con un anticuerpo policlonal de oveja anti-IgG de conejo conjugado con POD, diluido a 10 mU/ml en tampón de bloqueo Roti®-Block 0,5 x. Después incubar durante 1 h, las membranas se lavan 6 veces en PBS/Tween al 0,05 %. Para la detección del anticuerpo anti-conejo unido conjugado con POD, la membrana se incuba con el sustrato para transferencia de Western Lumi-Light^{PLUS} (Orden-Nº. 2.015.196, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) y se expone a una película autorradiográfica.

La intensidad de señal para ARMET está incrementada en 18 de 20 de los lisados tisulares de tumores que se obtienen a partir de 20 pacientes diferentes de CP (Fig. 1). Por lo tanto, el incremento de la abundancia de ARMET en tejido tumoral, tal como se detecta por MALDI en el Ejemplo 1, se confirma claramente mediante análisis de transferencia de Western.

Ejemplo 9

ARMET en fluido del revestimiento epitelial (FRE) – micromuestreo broncoscópico.

El micromuestreo broncoscópico (BMS) ofrece la posibilidad de recoger el fluido del revestimiento epitelial (FRE) cerca de pequeños nódulos pulmonares de una manera en gran medida no invasiva. Posteriormente, es posible medir las concentraciones de marcadores tumorales en FRE a fin de identificar nódulos malignos.

La sonda de BMS (Olympus Medical Systems Corp. Tokio, Japón, Nº de Cat.: BC-402C) se inserta en los pulmones a través del broncoscopio, y consiste en una vaina externa de polietileno y una sonda interna de algodón adosada a una guía de acero inoxidable. La sonda interna se hace avanzar hasta la proximidad del nódulo y se realiza el BMS durante unos pocos segundos. Más tarde, la sonda interna se retira hacia dentro de la vaina externa y ambos dispositivos se retiran simultáneamente. La punta de algodón se corta y se congela directamente a -80 °C. Para la determinación, el FRE se eluye de la punta de algodón y posteriormente se puede analizar. La concentración de ARMET se determina en FRE con el ELISA tal como se describe en el Ejemplo 2.

Ejemplo 10

Inmunotinción de ARMET con Pab K4344

Se obtuvieron tejidos embebidos en parafina del banco de tumores de Roche (MML, Pharma Research Penzberg). Los tejidos se cortaron en secciones seriadas de 2 µm, se desparafinaron en xileno (3 x 5 min) y se rehidrataron a través de una serie de graduaciones de etanol, seguidas de dos pasos de lavado con agua desionizada y PBS (1 x 2 min). La recuperación del antígeno se realizó con Reprivit pH 4,0 (Biogenex) durante 20 min a 97 °C-100 °C. Las láminas se dejaron enfriar durante 20 min y se lavaron con PBS (2 x 1 min). La actividad peroxidasa endógena, se bloqueó mediante la incubación con H₂O₂ al 3 % en PBS durante 5 min, las láminas después se aclararon dos veces con PBS, seguido de una vez con TBT + Tween 20 (LabVision 1666789) durante 3 minutos. El bloqueo de la unión inespecífica de inmunoglobulina se realizó con suero de caballo al 1 % en PBS (suero bloqueante de caballo, kit Vectastain ABC, Elite Universal, Vector PK6200) durante 20 minutos a temperatura ambiente. La biotina endógena se bloqueó con el sistema bloqueante de biotina (Dako X0590) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la tinción específica de ARMET, las secciones se incubaron con el anticuerpo policlonal K4344 diluido a 3 µg/ml en diluyente de anticuerpo (Dako S2022) durante toda la noche a 4°C. Las láminas se lavaron con TBS + Tween 20 (LabVision 1666789) (3 x 2 min) y después se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado (1 gota en 5 ml de PBS + suero de caballo al 1 %) (kit Vectastain ABC, Elite Universal, Vector PK6200) durante 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar con

TBS + Tween 20 (3 x 2 min), las secciones se incubaron con reactivo ABC (1 gota de reactivo A más 1 gota de reactivo B en 5 ml de PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. Las láminas se lavaron con TBS + Tween 20 (2 x 2 min) y finalmente se hicieron reaccionar con la solución cromógena de diaminobencidina (DAB plus, LabVision TA-125-HDX) durante 10 min. Después de aclarar con agua destilada, se tiñeron con hematoxilina y se montaron.

5

La fracción de IgG de conejo se usó como control negativo (Dako X0903).

Tabla 7: expresión de ARMET en el tumor

Tumor	Nº de casos ensayados	Expresión de Armet		
		Positivo	Débil	Negativo
Pulmón	29	24	1	4
Colon	20	17	2	1
Mama	16	14	1	1
Cabeza y cuello	20	18	1	1
Melanoma	12	11	0	1
Páncreas	8	8	0	0
Riñón	7	7	0	0
Ovario	11	11	0	0
Próstata	11	11	0	0

LISTADO DE SECUENCIAS

10

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

<120> ARMET como marcador de cáncer

15

<130> 25734 WO

<150> EP08022238

<151> 2008-12-22

20

<160>4

<170> PatentIn versión 3.3

25

<210> 1

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 490 613 T3

Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu Ser Val Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser
 20 25 30

Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe
 35 40 45

Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala
 50 55 60

Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His
 85 90 95

Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln
 100 105 110

Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp
 115 120 125

Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp
 130 135 140

Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys
 145 150 155 160

Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg
 165 170 175

Thr Asp Leu

5 <210>2
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador directo LC56for-EcoRI

<400> 2

acgtacgtga attcattaa gaggagaaat taactatg agaggatcgc atcaccatca 60
 ccatcacatt gaaggccgta ggaggatgtg ggccacgcag 100

ES 2 490 613 T3

5 <210>3
<211> 40
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso LC56rev-BamHI

10 <400> 3
acgtacgtgg atcctcatta caaatcggtc cgtgcactgg 40

15 <210>4
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Péptido

20 <400> 4

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para evaluar el cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario *in vitro*, que comprende medir en una muestra la concentración de:
- 10 (a) proteína ARMET (rica en arginina, mutada en tumores en fase tempranas) y/o fragmentos de la misma.
(b) opcionalmente uno o más marcadores adicionales de cáncer, y
(c) usar el resultado de la medición de la fase (a) y opcionalmente de la fase (b) en la evaluación del cáncer, donde dicha muestra es suero o plasma, y donde un incremento de la concentración de una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.
- 15 2. El método según la reivindicación 1, caracterizado además por que el cáncer es cáncer de pulmón.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado además por que dichos uno o más marcadores adicionales de la fase (b) se seleccionan del grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y/o NNMT.
- 20 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además por que la concentración se mide mediante un método inmunológico.
- 25 5. Uso de una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma detectados en una muestra de suero o plasma en la evaluación del cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario, en el que un aumento de la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.
- 30 6. El uso de la reivindicación 5 en la evaluación del cáncer de pulmón y/o del cáncer de colon.
7. El uso de la reivindicación 5 en la evaluación del cáncer de pulmón, en particular el cáncer no microcítico de pulmón (NSCLC).
- 35 8. Uso de un anticuerpo dirigido contra una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma en la evaluación de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario, en el que la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma se detectan en una muestra de suero o de plasma y en el que un aumento en la concentración de la proteína ARMET y/o de los fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.
- 40 9. Uso de un panel de marcadores que comprende una proteína ARMET y/o fragmentos de la misma y opcionalmente uno o más marcadores adicionales de cáncer en la evaluación de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario, en el que la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma se detectan en una muestra de suero o plasma, y en el que un aumento de la concentración de la proteína ARMET y/o fragmentos de la misma es indicativo de cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de mama o cáncer de ovario.
- 45 10. El uso del panel de marcadores según la reivindicación 9, caracterizado además por que los uno o más marcadores adicionales opcionales se seleccionan del grupo que consiste en Cyfra 21-1, CEA, NSE, CA 19-9, CA 125, PSA, ProGRP, SCC y/o NNMT.
11. El uso del panel de marcadores según las reivindicaciones 9 a 10 en la evaluación del cáncer de pulmón, particularmente NSCLC.

Fig. 1

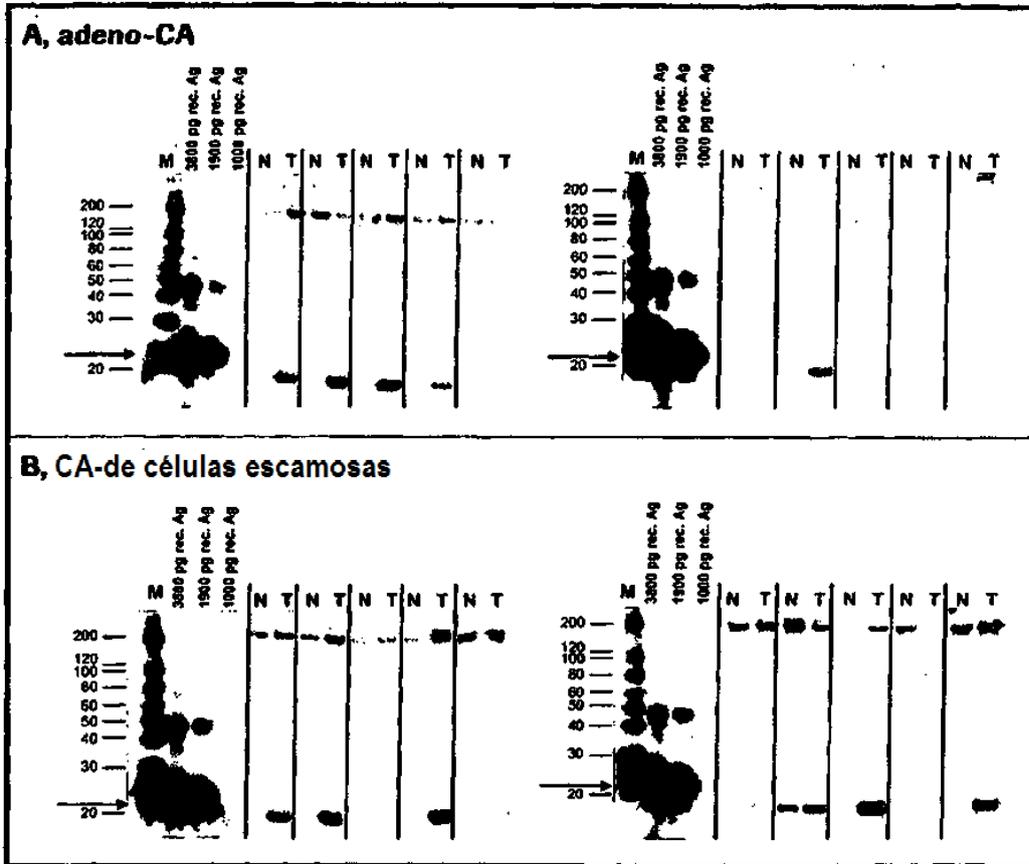


Fig. 2

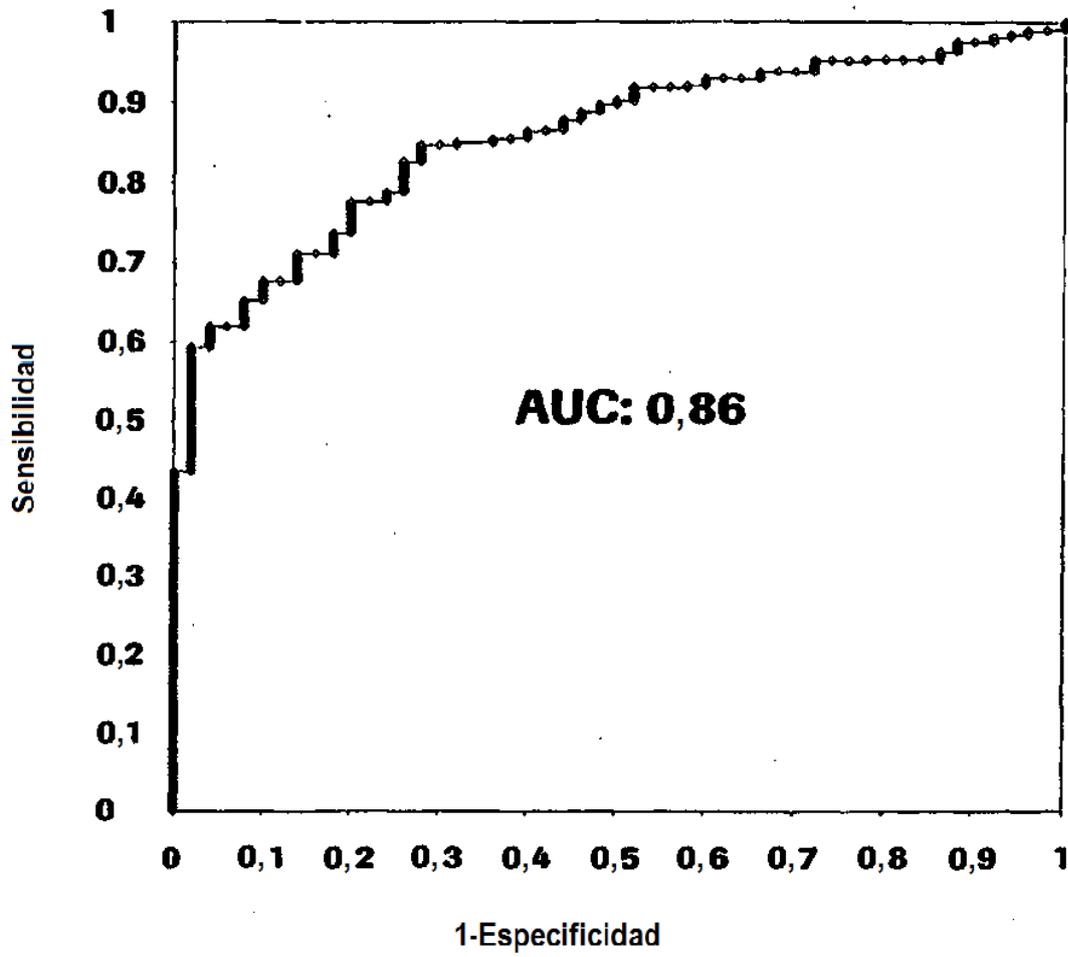


Fig. 3

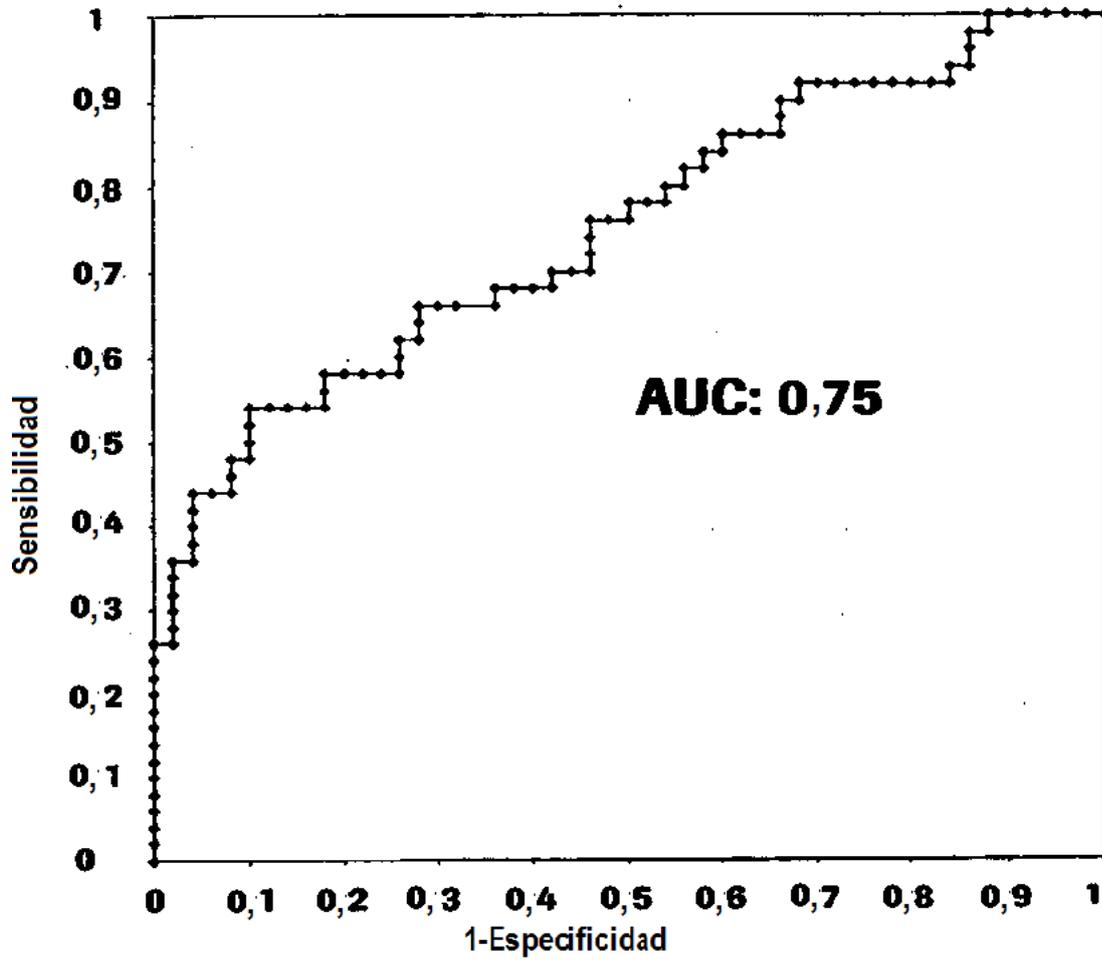


Fig. 4

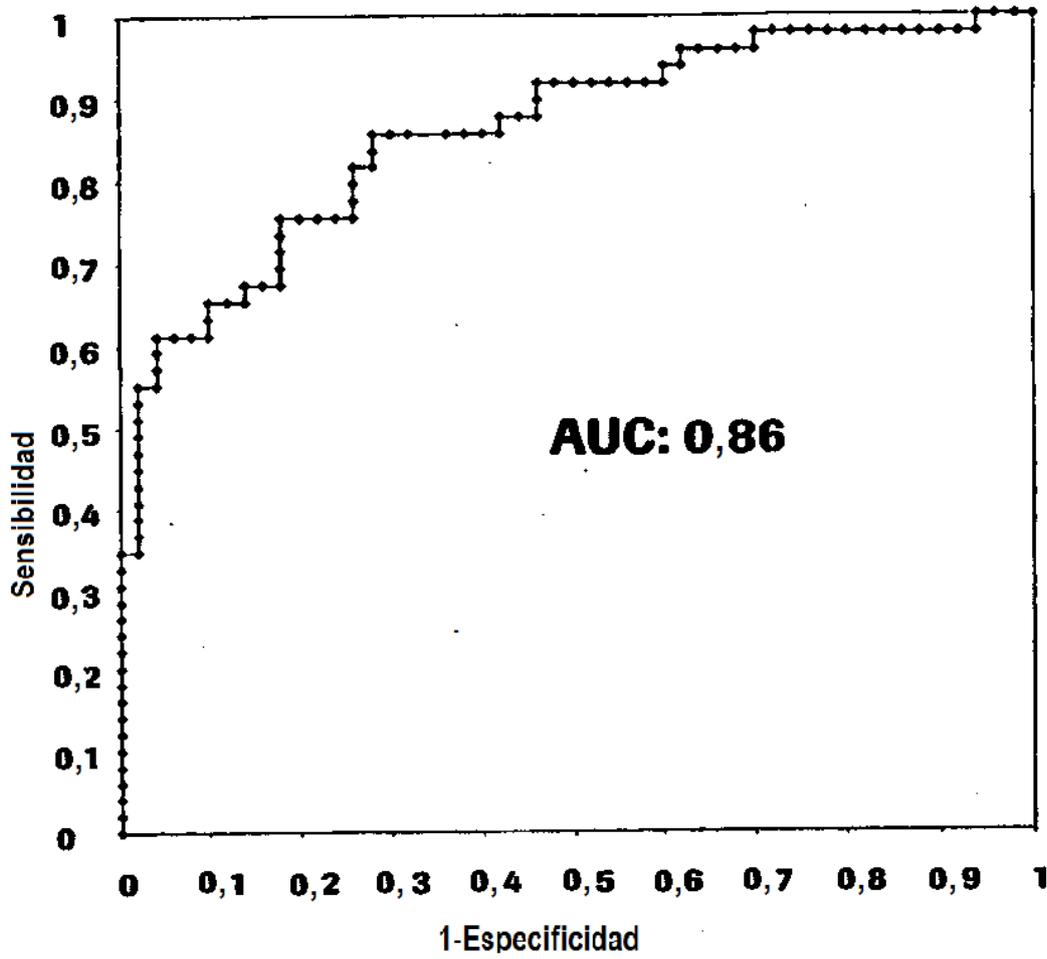


Fig. 5

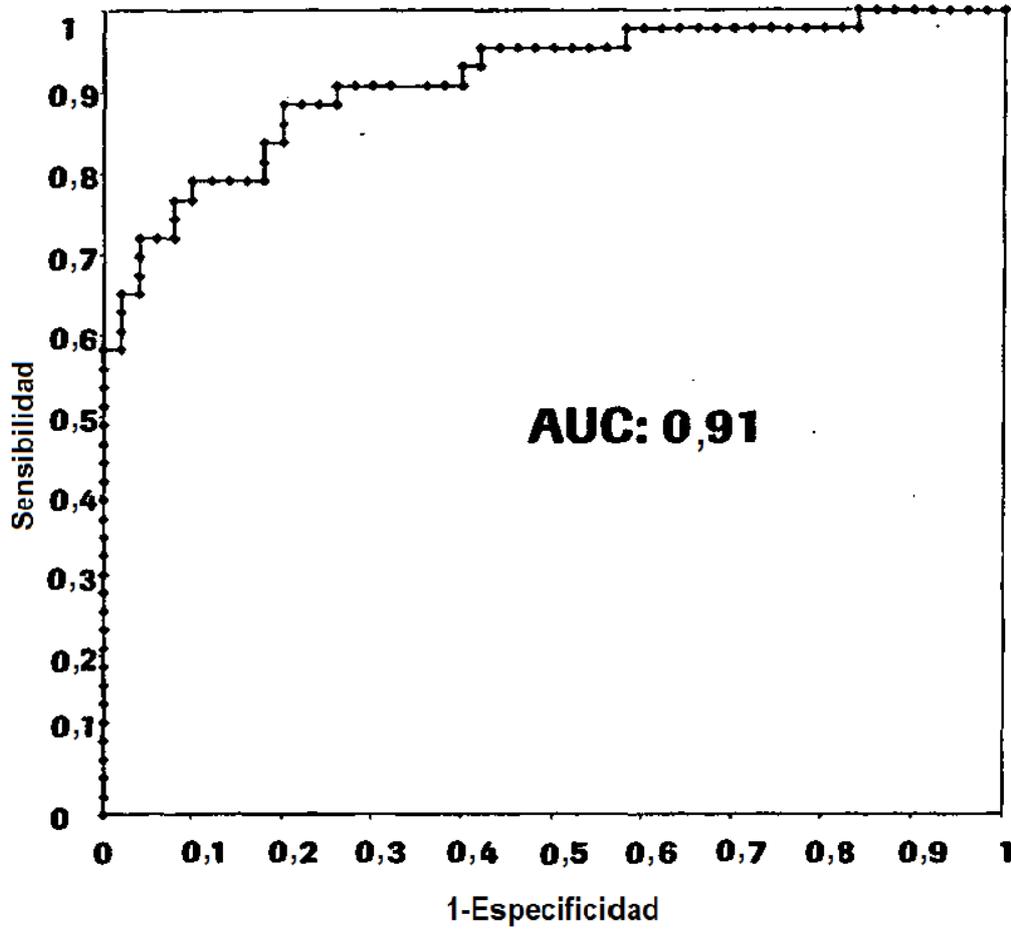


Fig. 6

1 MWATQGLAVA LALSVLPGR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTFSP
51 ATIENELIKF CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE
101 KICEKLLKKD SQICELKYDK QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG
151 CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASARTDL

Fig. 7

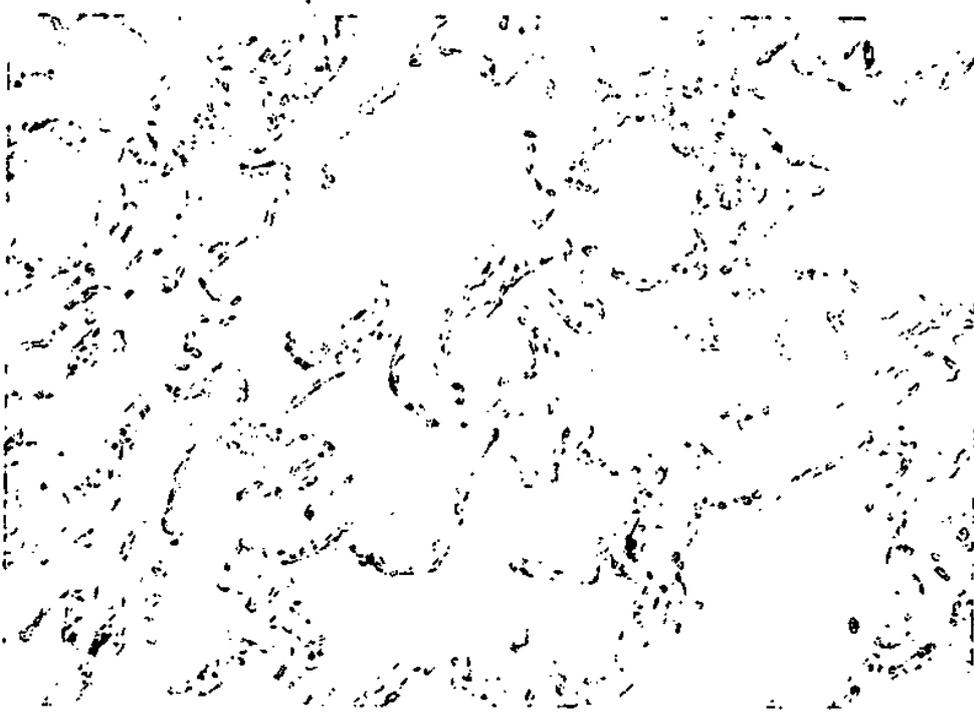


Fig. 7a

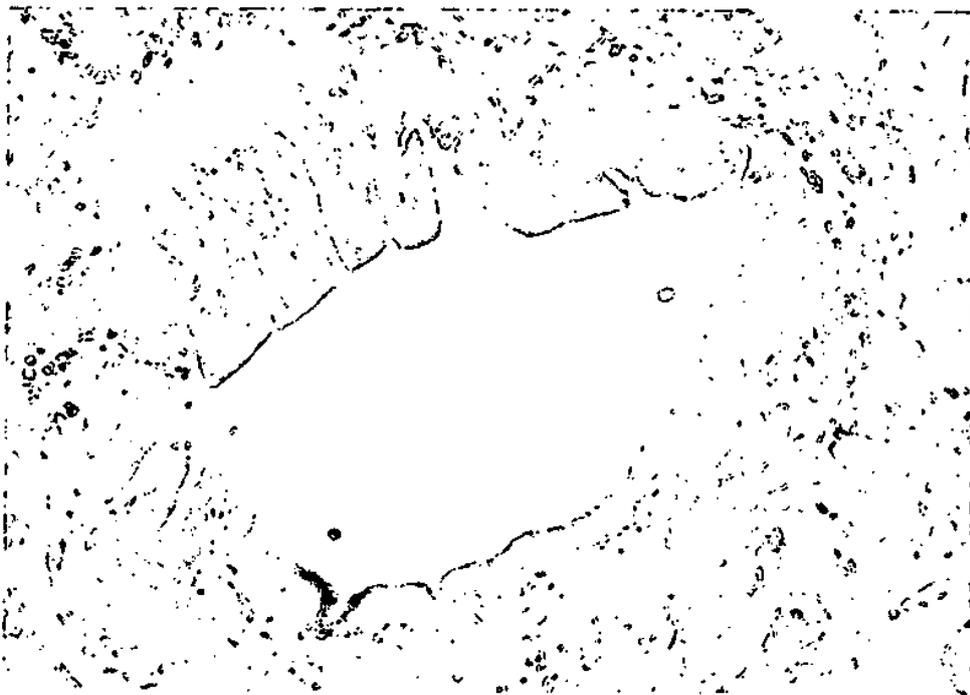


Fig. 8

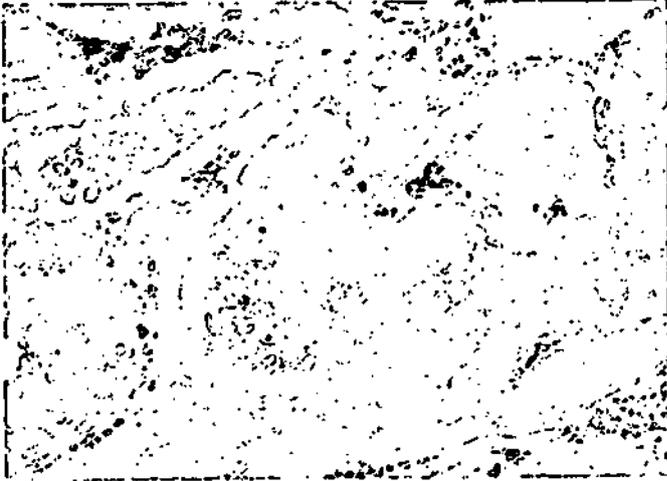


Fig. 8a

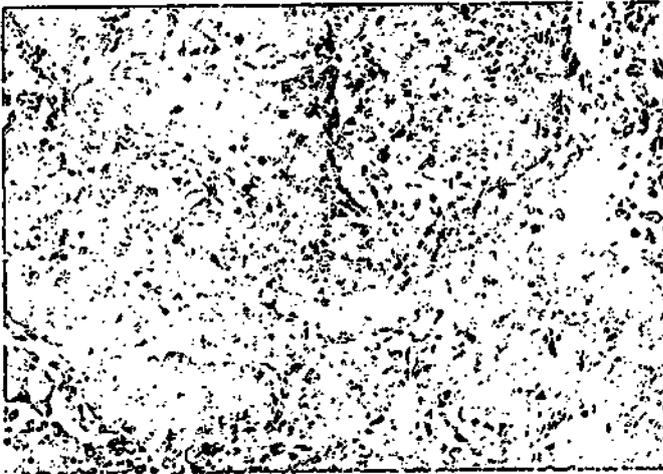


Fig. 8b

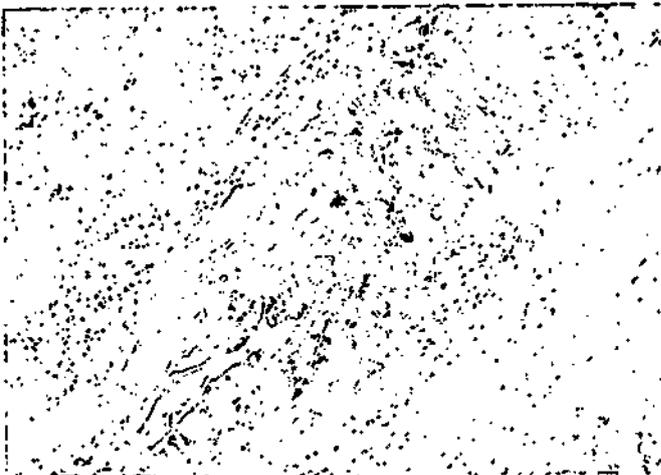


Fig. 9

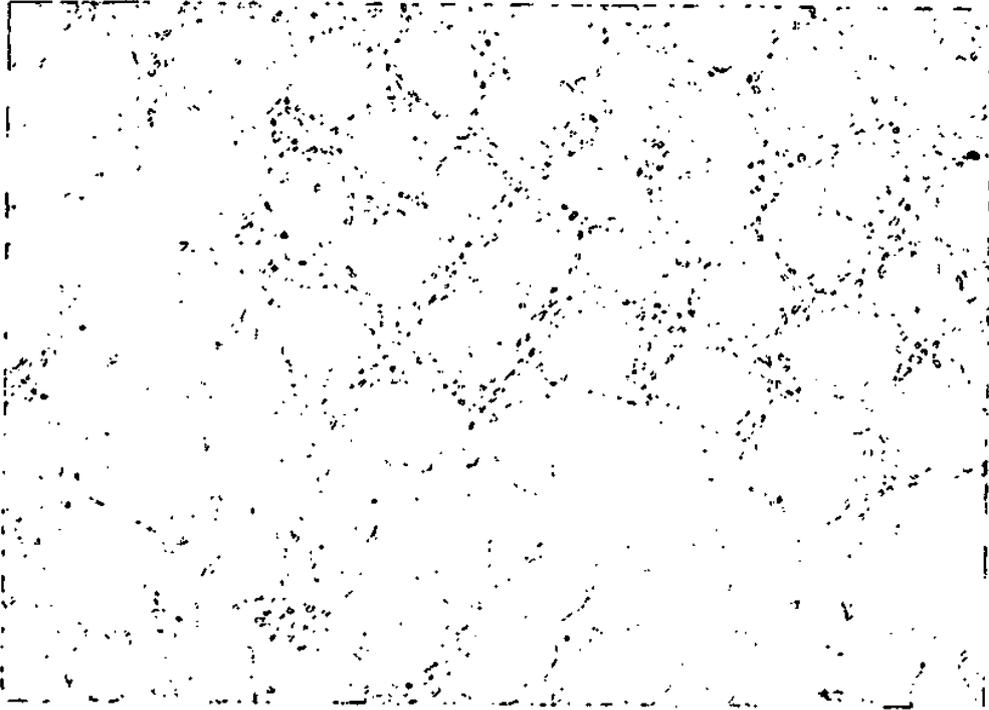


Fig. 9a

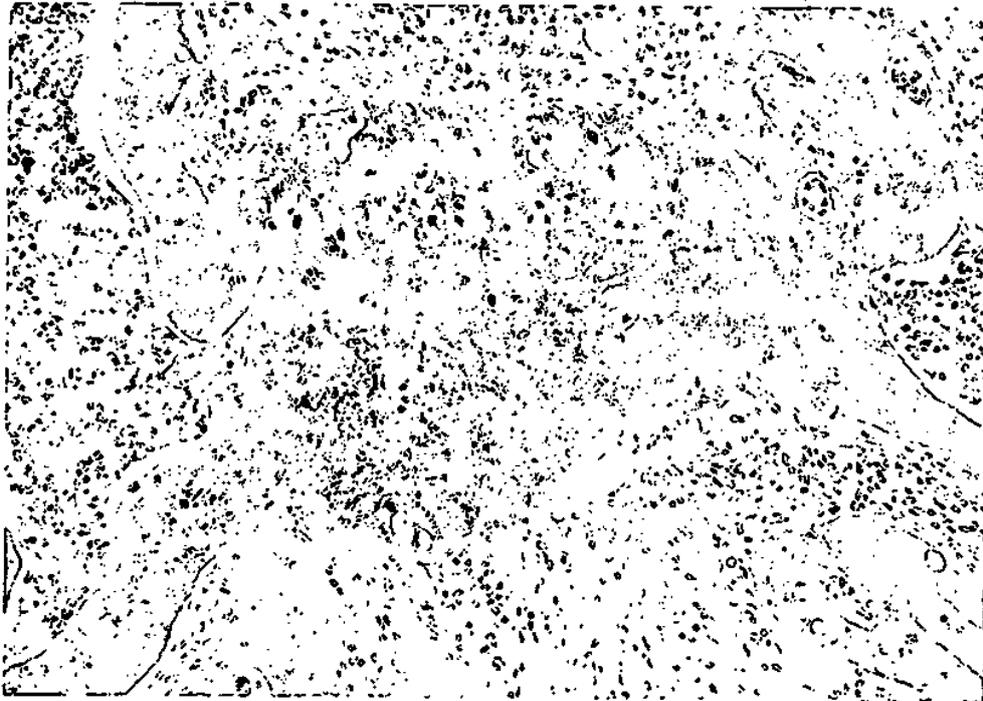


Fig. 10

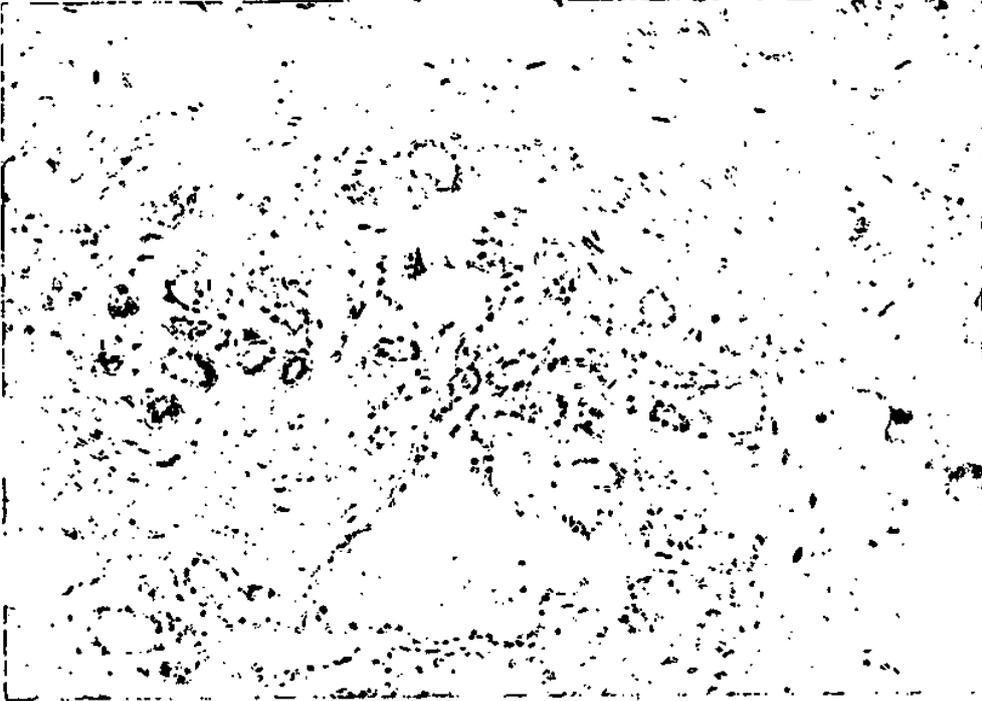


Fig. 10a

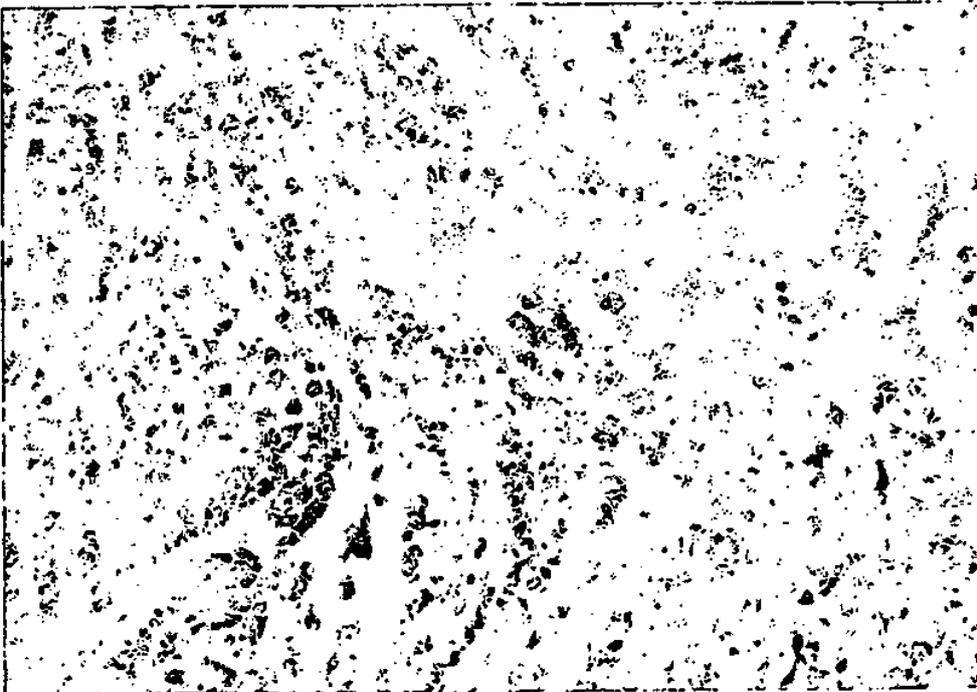


Fig. 11

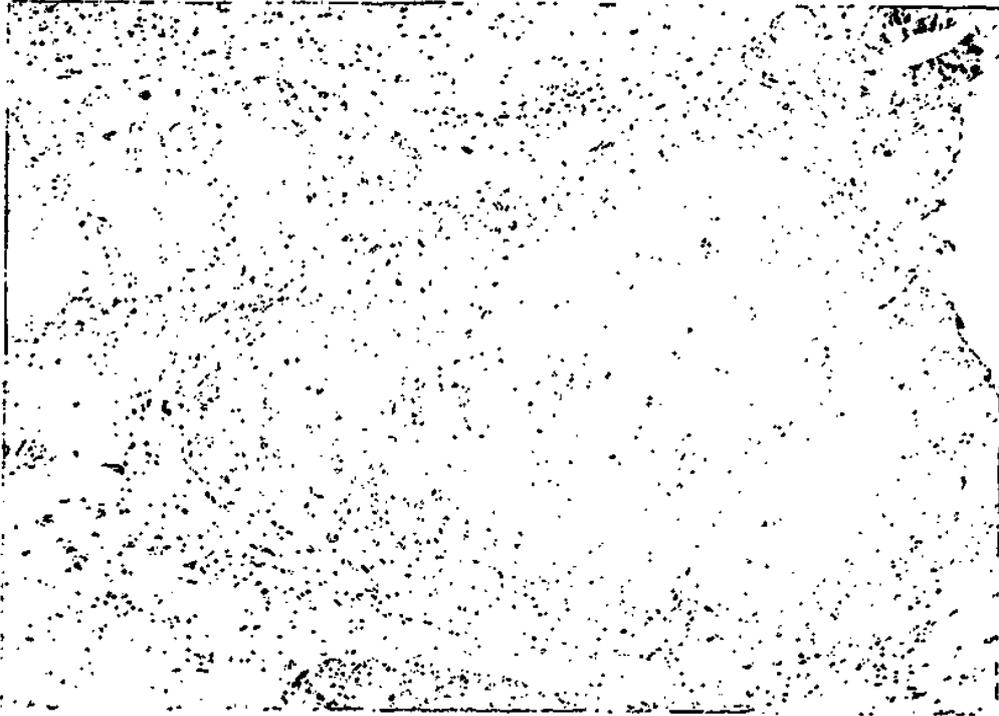


Fig. 11a

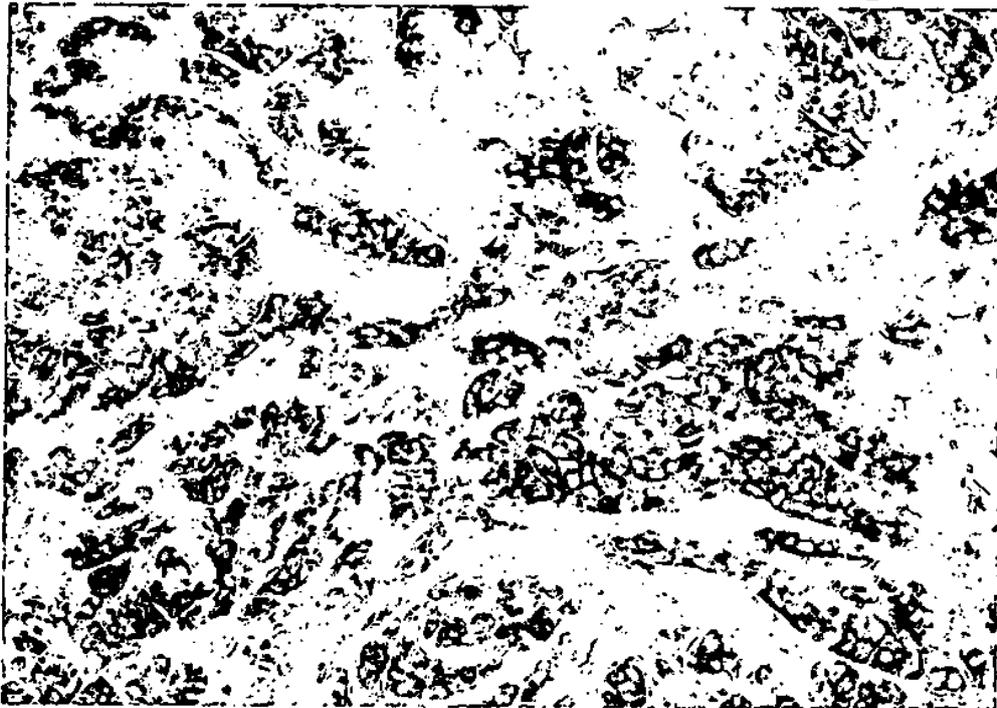


Fig. 12

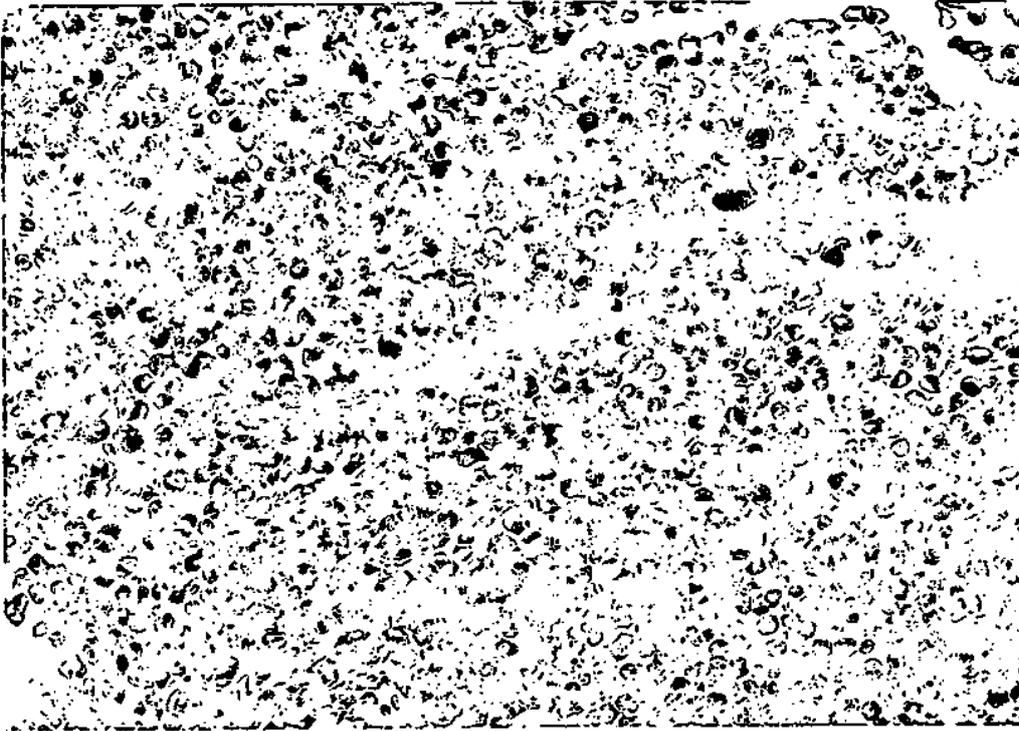


Fig. 12a

