

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 069**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2010 E 10722044 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2430450**

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

30 Prioridad:

**15.05.2009 EP 09006609**

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

**11.09.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANDRES, HERBERT;  
KARL, JOHANN;  
KLOECKNER, JULIA;  
ROESSLER, MARKUS;  
TACKE, MICHAEL y  
THIEROLF, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 493 069 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

CYBP como marcador del cáncer de pulmón

5 La presente invención, se refiere a un procedimiento de ayuda en la valoración del cáncer de pulmonar o de pulmón (= LC –[del inglés, lung cancer]-) y, de una forma particular, en la valoración del carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC – [del inglés, no-small cell lung carcinoma]-). Ésta da a conocer el uso de la “proteína de unión a las calciclinas” (CYBP – [del inglés, calcyclin-binding protein]-), como un marcador del LC, de una forma particular, del NSCLC. De una forma adicional, ésta se refiere, de una forma especial, a un procedimiento para valorar el  
10 cáncer de pulmón, a partir de una muestra de líquido, derivada de un individuo, procediendo a la medición de la CYBP, en la citada muestra. La medición de la CYB, puede utilizarse, por ejemplo, en la detección temprana del cáncer de pulmón, o en el cuidado de pacientes los cuales experimentan una cirugía.

15 El cáncer, permanece como un desafío mayor, en la salud pública, a pesar del progreso en cuanto a lo referente a la detección y a la terapia. Entre los varios tipos de cáncer, el LC (cáncer de pulmón), es un cáncer frecuente en el mundo occidental, y se encuentra entre las causas más frecuentes de la mortalidad relacionada con el cáncer. Esto de debe, en gran parte, al vacío de diagnóstico, para la detección de la enfermedad. El LC, es ampliamente asintomático en sus etapas tempranas. La mayoría de los cánceres de pulmón, se detecten en un estado tardío o avanzado, cuando la enfermedad, se ha convertido ya en inoperable.

20 La mayoría de tumores de LC, pueden dividirse en carcinoma de pulmón de célula pequeña (SCLC- [del inglés, small cell lung carcinoma]-) y carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC – [del inglés, no-small cell lung carcinoma]-). El SCLC, es el responsable para un porcentaje del 20 – 25% de todos los casos de cáncer de pulmón. El SCLC, es un tipo neuroendocrino agresivo de LC, y tiene un pronóstico o prognosis muy pobre, incluso si éste se detecta en etapas tempranas. El SCLC, es raramente susceptible de un tratamiento curativo mediante resección. Debido a la velocidad mediante la cual progresa la enfermedad, la categorización del SCLC, de una forma general, se realiza mediante la utilización de únicamente dos etapas, es decir, enfermedad limitada y extensiva, más bien que mediante un sistema más complejo de clasificación por etapas, del tipo TNM (sistema de clasificación de tumores malignos - véase posteriormente, más abajo). Aproximadamente un porcentaje del 75 – 80% de los casos de LC, se  
25 agrupan en la clase de NSCLC, que incluye al carcinoma de células escamosas (carcinoma = CA), al adeno CA (adenocarcinoma – el cual comprende las subclases de CA acinar [carcinoma de células acinares], al CA papilar [carcinoma papilar], al tumor broncoalveolar, al tumor sólido, y a los subtipos mezclados), y al carcinoma de células grandes (comprendiendo a las subclases consistentes en los tumores de células gigantes, al CA de células claras, al CA adenoescamoso y a CA indiferenciado). Si se detecta en etapas tardías, el NSCLC, tiene también una prognosis muy pobre. La clasificación del cáncer, en etapas, es la clasificación de la enfermedad en términos de extensión, de progresión, y tipos de células y de grado de tumor. Esta clasificación, agrupa a los pacientes afectados de cáncer, de tal forma que puedan realizarse generalizaciones a propósito de la prognosis y de la elección de la terapia.

40 Hoy en día, el sistema de clasificación TNM, es el sistema de clasificación mayormente utilizado, basado en la extensión anatómica del cáncer. Ésta representa un sistema de un sistema de clasificación uniforme por etapas, internacionalmente aceptado. Existen tres variables básicas, en este tipo de clasificación: T (la extensión del tumor primario), N (el estatus de los ganglios o nódulos linfáticos regionales), y M (la presencia o la ausencia de metástasis distantes). Los criterios de la TNM, han sido publicados, por parte de la UICC (International Union Against Cancer), Edición, 1997 (Sobin, L.H., y Fleming, I.D., TNM 80 (1997) 1803-4).

45 La resección quirúrgica del tumor primario, es ampliamente aceptada, como el tratamiento de elección para las etapas primarias del NSCLC. Con la progresión del NSCLC y, de una forma más específica, la transición de la etapa IIIa (T3N1M0, T1N2M0, T2N2M0, T3N2M0) a IIIb (T4N0M0, T4N1M0, T4N2M0); se precipita y acontece un significativo cambio en el planteamiento del problema, por parte del médico especialista. No obstante, si el cáncer se detecta durante etapas más tempranas, (Ia – IIIa; de una forma preferente, hasta la etapa T3N1M0), la tasa de supervivencia, varía entonces en un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 35 % y un 80 %. La detección en la etapa ((T1N0M0); pequeño tamaño del tumor, sin metástasis), tiene, evidentemente, la mejor prognosis, con una tasa de supervivencia que va hasta un porcentaje del 80%.

55 La cirugía, se utiliza raramente, si es que alguna vez se utiliza, en el gobierno y control del NSCLC, en las etapas IIIb-IV. La etapa IV, corresponde a la metástasis distante, a saber, la propagación de la enfermedad, más allá de los ganglios linfáticos regionales. La tasa de supervivencia a cinco años, en las etapas tardías III y IV, cae a un porcentaje que es inferior a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 15 % y un 1 %, respectivamente.

60 La cuestión que es especialmente importante, es que, la diagnosis temprana del NSCLC, se traduce en un prognosis mucho mejor. Los pacientes diagnosticados como afectados por el NSCLC en una etapa tan tempranas como la correspondiente a la etapa Ia (T1 N0M0), Ib (T2N0M0), IIa (T1N1M0), IIb, (T3N0M0), y IIIa (T3N1M0), si se tratan de una forma apropiada, tienen una oportunidad de tasa de supervivencia a los 5 años, correspondiente a un porcentaje del 80 %, después de un transcurso de tiempo de 5 años, a partir de la diagnosis. Este hecho, debe compararse con

el de una tasa de supervivencia, a los 5 años, correspondiente a un porcentaje inferior a un 1 %, para pacientes diagnosticados una vez que, la metástasis distante, se encuentre ya presente.

5 En el sentido de la presente invención, una valoración temprana del LC (cáncer de pulmón), se refiere a una valoración del tumor, en etapas tumorales comprendidas entre la etapa Ia y la etapa IIIa, de la forma que se ha definido anteriormente, arriba.

Se prefiere el hecho de que, el LC, se valore en una etapa comprendida entre la etapa Ia y la etapa IIIa.

10 La mayoría de los cánceres de pulmón, se detectan cuando éstos son sintomáticos. Los procedimientos usuales de detección, incluyen a la radiografía torácica (rayos x), a la tomografía espiral computada (TAC), a la citología de los esputos, y a broncoscopia. No obstante, existe una controversia con respecto a la idoneidad de estos medios para la exploración (rastreo) de masas.

15 Se encuentran un gran número de marcadores tumorales, en el suero, en uso clínico, para los cánceres de pulmón. El fragmento soluble 30 kDa de la citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), el antígeno carcinoembriogénico (CEA), la enolasa no específica (NSE), y el antígeno del carcinoma de células escamosas (SCC), son los marcadores más prominentes del cáncer de pulmón. No obstante, ninguno de estos marcadores, cumple con los criterios de sensibilidad y de especificidad que se requieren para una herramienta de exploración o rastreo (Thomas, L., Labor und Diagnose [Laboratorio y diagnosis] (2000) TH Books Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, Alemania).

20 Con objeto de que sea de utilidad clínica, un nuevo marcador de diagnóstico, como marcador individual, debería ser comparable a otros marcadores conocidos en el arte especializado de la técnica, o mejor. O bien, un nuevo marcador, debería conducir a un progreso en la sensibilidad y / o la especificidad del diagnóstico, tanto si éste se utiliza solo, como si éste se utiliza en combinación con uno o más marcadores distintos. La sensibilidad y / o la especificidad del diagnóstico, de un test de ensayo, se valoran mejor, mediante sus características operativas del receptor, lo cual se describirá en mayor detalle, más abajo, a continuación.

25 La sangre entera, el suero ó el plasma, son las fuentes más ampliamente utilizadas de muestras, en la rutina clínica. La identificación de un marcador tumoral de LC temprano, el cual fuera de ayuda en la detección fidedigna del cáncer, o que proporcionara una información temprana del pronóstico, podría conducir a un procedimiento, el cual sería de gran ayuda en la diagnosis y en el gobierno control de la enfermedad. Así, por lo tanto, existe una urgencia clínica, en cuanto al hecho de poder mejorar, in vitro, el gobierno y control del LC. Es especialmente importante, el hecho de mejorar la diagnosis temprana del LC, debido al hecho de que, los pacientes diagnosticados en etapas tempranas, tienen unas posibilidades de tasas de supervivencia, las cuales son mucho más altas, si éstas se comparan con las tasas de supervivencia de aquéllos pacientes diagnosticados en una etapa avanzada de la enfermedad. Especialmente, existe una necesidad urgente, en cuanto al hecho de poder disponer de procedimientos que permitan una supervisión de control, la cual sea fidedigna, para tratamiento del LC, procediendo a explorar a los individuos, para el LC, y realizando tests de ensayo, en cuanto a lo referente la recurrencia del cáncer de pulmón, después de

30 La utilidad clínica de los marcadores bioquímicos, en el cáncer de pulmón, se han revisado recientemente (Duffy, M.J., Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, - Revisiones criticas en la ciencia clínica de laboratorio -, 38 (2001) 225-262).

35 El CYFRA 21-1, se contempla, de una forma usual, como siendo el mejor de los marcadores tumorales conocidos hoy en día, para el cáncer de pulmón. A pesar del hecho de no ser órgano-específico, éste se encuentra, de una forma predominante, en el tejido pulmonary. La sensibilidad del CYFRA 21-1, para el cáncer de pulmón, se describe como siendo de un porcentaje del 46 – 61 %, a una especificidad correspondiente a un porcentaje del 95 %, hacia otros cánceres de pulmón, benignos. Los niveles incrementados en suero, de CYFRA 21-1, están también asociados con enfermedades hepáticas pronunciadas, benignas, la insuficiencia renal y el cáncer invasivo de la vesícula. Se recomienda el test de ensayo de CYFRA 21-1, como vigilancia o seguimiento de control de la terapia post-operatoria.

40 El CEA, pertenece al grupo de los antígenos carcinofetales, usualmente producidos durante la embriogénesis. El CEA, es un marcador no órgano-específico y, de una forma predominante, éste se utiliza para el gobierno y control del cáncer colorrectal. Aparte de las malignidades o neoplasias, también otras enfermedades benignas, tales como la cirrosis, la bronquitis, la pancreatitis, y enfermedades autoinmunes, se encuentran asociadas con unos niveles incrementados del CEA en el suero. A un porcentaje del 95 % de especificidad hacia las enfermedades benignas del pulmón, su sensibilidad, para el cáncer de pulmón, según se reporta, es el correspondiente a un porcentaje del 29 – 44 %. Un uso preferido de CEA, es el consistente en la vigilancia o seguimiento de control de la terapia del cáncer de colon.

45 El NSE, es un marcador tumoral para el SCLC. De una forma general, los niveles incrementados de NSE en el suero, se encuentran asociados con tumores neuroectodérmicos y neuroendocrinos. Los niveles incrementados en

suero, se encuentran, también, en los pacientes con enfermedades benignas del pulmón, y con enfermedades cerebrales, tales como la meningitis, y otras enfermedades inflamatorias del cerebro, y lesiones traumáticas en la cabeza. Mientras que, la sensibilidad para el SCLC, a un porcentaje de especificidad del 95 %, según se reporta, es del 60 – 87 %, los resultados del test de ensayo del NSE, para el NSCLC, es reducida (una sensibilidad correspondiente a un porcentaje del 7 – 25 %). El NSE, se recomienda para el seguimiento (vigilancia) del control del SCLC.

El proGRP, es un marcador tumoral de utilidad en el diagnóstico y control del SCLC. Los niveles incrementados en suero, se encuentran, también, en pacientes con enfermedades pulmonares / pleurales, no malignas tales como la fibrosis pulmonar idiopática o sarcoidosis. Mientras que, la sensibilidad para el proGRP, en el sector del SCLC (a una especificidad de un 95 %), según se reporta, es del 47 – 86 %, los resultados del test de ensayo de proGRP, en el sector del NSCLC, es reducido, debido que, según se reporta, la sensibilidad, es inferior a un porcentaje del 10 %.

El SCC, se identificó, originalmente, en el CA de células escamosas del cérvix. La sensibilidad del SCLC, para el LC, es generalmente baja (de un porcentaje del 18 – 27 %). Así, por lo tanto, el test de ensayo de SCC, se contempla como no siendo apropiado para la exploración de rastreo. No obstante, debido a la alta sensibilidad para el CA de células escamosas, un uso preferido para el SCC, es el consistente en el seguimiento de control de la terapia, incluso a pesar del hecho de que, el CYFRA 21 – 1, proporciona, generalmente, unos resultados mejores.

En un estudio de sondeo inmunohistoquímico, Zhai et al. (Journal of Histochemistry and Cytochemistry, vol. 56(8): 765-772, 2008) procedieron a analizar el perfil de la expresión de la proteína CacyBP en una amplia gama de tejidos normales y de carcinomas humanos, mediante inmunohistoquímica, procediendo a la tinción de un anticuerpo anti-CacyBP, monoclonal. En este estudio, se observó la tinción de la CacyBP, en una gran variedad de adenocarcinomas y de carcinomas escamosos. El porcentaje de tinción positiva, era el máximo, en los carcinomas nasofaríngeos (71 %), en los adenocarcinomas de páncreas (70 %), en los carcinomas de mama (63 %) y en los sarcomas osteogénicos (63%). A título comparativo, únicamente un porcentaje de aproximadamente un 45 % de las muestras de adenocarcinoma de pulmón, y de un 50 % de las muestras de carcinomas escamosos, se habían tinto.

Con respecto a los perfiles de los marcadores, y con la intención de obtener una diagnosis improvisada el cáncer de pulmón, se publicó un procedimiento (Schneider, J. et al. Int. J. Clin. Oncol. 7 (2002) 145 - 151), mediante la utilización de algoritmos clasificación basados en la lógica de coincidencias, para combinar los niveles en suero de CYFRA 21-1, de NSE y de proteína C-reactiva (CRP), el cual es un marcador de inflamación, general. Los autores, reportan sobre una sensibilidad correspondiente a un porcentaje del 92 %, a una especificidad del 95 %. No obstante, en este estudio, por ejemplo, la sensibilidad del CYFRA 21 – 1, como un marcador de tumor individual, según se reporta, es de un porcentaje del 72 %, a una especificidad del 95 %, el cual significativamente mayor que en muchos otros estudios reportados. Así, Duffy, M.J., en Critical Reviews (Revisión crítica), en Clinical Laboratory Sciences 38 (2001) 225 – 262, reportan una sensibilidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos porcentajes situados entre un 46% y un 61%. Estos resultados del rendimiento, inusualmente altos, logrados por parte de Schneider et al., dan lugar a algunas dudas y pueden ser debidos a diversos factores. En primer lugar, la colectividad de los pacientes de control, parece ser de una mayor juventud que la del colectivo de pacientes, a saber, los grupos no se encuentran bien emparejados en cuanto a lo referente a la edad y, el colectivo de pacientes, comprende muchas etapas tardías. En segundo lugar, e incluso más crítico, los resultados del algoritmo, se controla en las muestras del grupo de estudio, las cuales se habían utilizado para la determinación de los condicionantes de cualificación de la lógica de coincidencias. Así, se este modo, estos condicionantes de cualificación son, hablando de una forma estricta, de una clase que puede calificarse como “hechos a medida”, para este grupo, y no son aplicables a un grupo de validación independiente. Bajo unas circunstancias normales, debe esperarse el hecho de que, el mismo algoritmo, aplicado a un grupo de validación independiente, más grande, y bien equilibrado, conduciría a unos resultados del rendimiento reducidos en su totalidad.

El documento de solicitud de patente internacional WO 2005 / 032 495 A2, está dirigido a los perfiles de expresión genética para el cáncer de pulmón, a los “microarrays” (micromatrices), que comprenden las secuencias de se ácidos nucleicos que representan los perfiles de expresión genética, y a procedimientos para la utilización de dichos perfiles y microarrays de expresión genética.

Schneider (Advances in Clinical Chemistry, - Avances en la química clínica -, Academic Press, London, GB, vol. 42 páginas 1 - 41, 2006), se refiere a rol interpretativo de marcadores tumorales en la detección de los cánceres de pulmón.

El documento de solicitud de patente internacional WO 2009 / 006 323 A2, se refiere a procedimientos y a combinaciones de marcadores para la exploración de rastreo para la predisposición al cáncer de pulmón.

Era la finalidad de la presente invención, el investigar si se puede identificar un marcador bioquímico, el cual pueda utilizarse en la valoración del LC.

De una forma sorprendente, se ha encontrado el hecho de que, la utilización del marcador CYBP (proteína de unión a las calciclinas), CacyPB, proteína de interacción Siah, proteína de unión S100A6), de una forma particular, el CYBP humano (hCYBP), pueden superar, por lo menos parcialmente, algunos de los problemas de los marcadores actualmente conocidos, en el estado actual del arte de la técnica especializada.

5

El ámbito de la presente invención, se define en las reivindicaciones anexas.

La presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el cáncer de pulmón, in vivo, el cual comprende el proceder a medir, en una muestra, la presencia y / o la concentración de CYPB, y la utilización el resultado de la medición, de una forma particular, la concentración determinada, en la valoración del cáncer de pulmón

10

En las formas preferidas de presentación, el nuevo marcador CYBP, puede utilizarse para los propósitos de gobierno y control, así como para los propósitos de exploración de rastreo.

15

Cuando se utiliza en el seguimiento de control de pacientes, el procedimiento en concordancia con la presente invención, puede ayudar en la valoración de la carga tumoral, en la eficacia del tratamiento y en la recurrencia tumoral, en el seguimiento de los pacientes. Los niveles incrementados de CYBP, se encuentran directamente correlacionados con la carga tumoral. Después de la quimioterapia, el incremento del CYBP durante un corto período de tiempo (desde algunas pocas horas hasta los 14 días), puede servir como un indicador de la muerte de las células tumorales. En el seguimiento de los pacientes (desde los 3 meses hasta los 10 años), un incremento en el CYBP, puede utilizarse como un indicador para la recurrencia tumoral.

20

En una forma preferida de presentación, el procedimiento de diagnóstico en concordancia con la presente invención, se utiliza para propósitos de exploración de rastreo. A saber, éste se utiliza para valorar sujetos sin una diagnosis previa de LC, procediendo a medir el nivel de CYBP y correlacionando el nivel medido con la presencia o la ausencia de LC.

25

La presente invención, está también dirigida al un procedimiento para valorar el LC, in vitro, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende la medición, en una muestra, de la presencia y / o concentración de CYBP y de uno o más marcadores adicionales, distintos, de LC, y la utilización de los resultados de medición, de una forma particular, las concentraciones determinadas, en la valoración del LC. Se prefiere el hecho de que, uno o más de estos marcadores de LC, se seleccione de entre el grupo consistente en CYFRA 21 – 1, CEA, NSE, proGRP y SCC.

30

La presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende CYBP y uno o más marcadores adicionales, en la valoración del LC, en donde, un marcador adicional preferido, se selecciona de entre el grupo consistente en CYFRA 21 – 1, CEA, NSE, proGRP y SCC.

35

La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende, por lo menos CYBP y CYFRA 21 – 1, en la valoración del LC.

40

La presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende CYBP y CEA, en la valoración del LC.

45

La presente invención, se refiere, también, al uso de un panel de marcadores, el cual comprende CYBP y SCC, en la valoración del LC.

Aquí, en este documento de solicitud de patente, se da también a conocer un equipo, a modo de "kit", para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente el CYBP y, de una forma opcional, los reactivos auxiliares para realizar la valoración.

50

Se da también a conocer, de una forma adicional, un equipo, a modo de "kit", para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente el CYBP y el CYFRA 21 - 1, respectivamente y, de una forma opcional, los reactivos auxiliares para realizar la valoración.

55

Se da también a conocer un equipo, a modo de "kit", para la realización de los procedimientos en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente el CYBP, y uno o más marcadores distintos, adicionales, para el cáncer de pulmón.

60

También se da a conocer de una forma adicional, un equipo, a modo de "kit", para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente el CYBP y el CEA, respectivamente, y de una forma opcional, los reactivos auxiliares para realizar la valoración.

65

Asimismo, también, se da a conocer un equipo, a modo de "kit", para la realización del procedimiento en concordancia con la presente invención, el cual comprende por lo menos los reactivos requeridos para medir específicamente el CYBP y el SCC, respectivamente y, de una forma opcional, los reactivos auxiliares para realizar la valoración.

En una forma preferida de presentación de la presente invención, ésta se refiere a un procedimiento para valorar el cáncer de pulmón, in vitro, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de a) CYBP, en una muestra de fluido corporal, y b), de una forma opcional, de uno o más marcadores distintos, adicionales, del cáncer de pulmón, y c) la utilización de los resultados de la medición, de una forma particular, de las concentraciones determinadas en la etapa (a) y, opcionalmente, en la etapa (b), en la valoración del cáncer de pulmón.

El término "medición", comprende una medición cualitativa o cuantitativa del CYBP en una muestra. En una forma preferida de presentación, la medición, es una medición cualitativa o semicualitativa, es decir, se determina el hecho consistente en si el CYBP se encuentra presente o ausente, se determina el hecho consistente en si la concentración se encuentra por encima o se encuentra por debajo de un valor de corte. Tal y como podrán apreciar aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, en un ensayo de "Si" (presencia) o "No" (ausencia), la sensibilidad del ensayo, se ajusta, usualmente, para adaptarse al valor de corte. Un valor de corte, puede determinarse, por ejemplo, a partir de la realización de un test de ensayo, de un grupo de individuos sanos. De una forma preferible, el valor de corte, se ajusta para obtener, como resultado, una especificidad correspondiente a un porcentaje del 90 %, prefiriéndose, también que el valor de corte, se ajuste para obtener, como resultado, una especificidad correspondiente a un porcentaje del 95%, ó prefiriéndose, también que el valor de corte, se ajuste para obtener, como resultado, una especificidad correspondiente a un porcentaje del 98%. La presencia de un valor que se encuentre por encima del valor de corte, puede por ejemplo ser indicativo de la presencia de un cáncer de pulmón. En una forma de presentación preferida, adicional, la medición, es una medición cuantitativa. En esta forma de presentación, la concentración de CYPB, se correlaciona con una cuestión de diagnóstico subyacente, tal como, por el ejemplo, la etapa de la enfermedad, la progresión de la enfermedad, o la respuesta a la terapia.

La calciclina (S100A6), es una proteína de unión al calcio, la cual pertenece a la familia de las proteínas S100 (revisada en Zimmer et al., Brain Res. Bull. 37 (1995), 417 - 429; Heizmann y Cox, Biometals 11 (1998), 383-397). Su gen, se descubrió en base a su expresión ciclo-dependiente de las células (Calabretta et al., J. Biol. Chem. 261 (1986), 12628-12632). Este gen, se expresa, a su máximo nivel, durante la transición entre la fase G<sub>0</sub> a S, del ciclo celular, pero, su expresión, se desregulariza en leucemia mieloide aguda (Calabretta et al., Proc. Natl. Sci USA 83 (1986), 1495-1498). La proteína, se purificó, en primer lugar, y ésta se caracterizó, a partir de células tumorales ascites de Ehrlich (EAT) (Kuznicki y Filipek, Biochem. J. 247 (1987), 663-667; Kuznicki et al., Biochem.J. 263 (1989), 951-956). Más tarde, se encontró que, la calciclina, se expresaba a altos niveles, en fibroblastos y células epiteliales, en las células con una alta actividad proliferativa, y aquéllas que experimentaban diferenciación (Leonard et al., Mol. Cell. Biol. 7 (1987),3156-3167; Guo et al., Cell Growth Differ. 1 (1990), 333 - 338; Tonini et al., Cancer Res. S1 (1991), 1733-1737, Kuznicki et al., Exp. Cell. Res. 200 (1992), 425-430).

Se han identificada varias posibles proteínas diana, de la calciclina. La calciclina, ha mostrado interactuar, in vitro, de una forma Ca<sup>2+</sup>-dependiente, con la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, anexina II (Filipek et al., Eur. J. Biochem. 195 (1991), 795-800), *anexina VI* (Zeng et al., Int. J. Biochem.25 (1993), 1019-1027), *anexina XI* (Tokumitsu et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 186 (1992), 1227-1235) caldesmon (Mani et al., Biochemistry 2 (1993),11217-11223), y CacyBP (proteína de unión a la calciclina) (Filipek y Kuznicki, J. Neurochem.70 (1998), 1793-1798; Filipek y Wojda, Biochem. J. 320 (1996), 585-587). A pesar de que se han determinado las estructuras tridimensionales de la calciclina en la ausencia o presencia del calcio (Potts et al., Nat. Struct. Biol. 2 (1995), 790-796), la base estructural para las interacciones diana y su rol interpretativo putativo como un sensor de calcio, en la célula, continúan no estando claras.

La proteína de unión CacyBP, se identificó, se purificó y caracterizó, inicialmente, a partir de las células EAT (*Filipek y Wojda (1996)*, mencionado anteriormente, arriba). La secuenciación de aminoácidos de los fragmentos quimotripticos, sugería el hecho de que, ésta, era una nueva proteína, de tal forma que, ésta, se clonó a partir de una biblioteca de cDNA del cerebro del ratón, y se procedió a su secuenciación (*Filipek y Kuznicki (1998)*, mencionado anteriormente, arriba). La secuencia de aminoácidos de la CYBP humana (Swiss PROT Q9HB71), se encuentra representada en la SEQ ID NO:1. Excepto en cuanto a lo referente la hipotética proteína recientemente presentada, la cual se trata, aparentemente, de un homólogo humano de la CacyBP, la secuencia de nucleótidos de la CacyBP, revela que no hay homología a cualquier otra secuencia depositada en las bases de datos estándar. La cacyBP recombinante, se expresó en *Escherichia coli* y, se mostró que existía su interacción con la calciclina, a una concentración fisiológica de calcio (*Filipek y Kuznicki (1998)*, mencionado anteriormente, arriba). Estudios realizados recientemente, han revelado el hecho de que, la CacyBP, se encuentra presente, en unos altos niveles, en el cerebro del ratón y de la rata, de una forma particular, en las células neuronales (Jastrzebska et al., J. Histochem. Cytochem. 48 (2000), 1195-1202).

La proteína de unión CYBP, puede encontrarse involucrada en la ubiquitinación dependiente del calcio y la subsiguiente degradación proteosómica de las proteínas diana. Probablemente, ésta sirve como puente molecular,

en los complejos de ubiquitina E3. Ésta participa en la degradación mediatizada por la ubiquitina de la beta-catenina (CTNNB1).

5 La proteína de unión CYBP, interactúa con las proteínas de la familia S100, consistentes en las S100A1, S100A6, S100B, S100P y S100A12, a concentraciones fisiológicas de calcio. Ésta es un componente de algún complejo amplio de E3, por lo menos compuesto por UBE2D1, SIAH1, CACYBP/SIP, SKP1, APC y TBL1X. Ésta interactúa, directamente, con SIAH1, SIAH2 y SKP1.

10 La CYBP, se encuentra localizada en el núcleo y en el citoplasma, a unas bajas concentraciones de calcio. En las células del neuroplasma, después de la inducción del ácido retinóico (RA), y del incremento de calcio, ésta se encuentra localizada en ambos, el núcleo y el citoplasma. La fracción nuclear, puede encontrarse fosforilada.

15 No hay ninguna sugerencia, en el arte especializado de la técnica, en cuanto al hecho de si, una determinación sensitiva y específica de la CYBP, en extractos de tejidos y en los fluidos corporales, permitiría una valoración del cáncer de pulmón. De una forma sorprendente, se encontró, en la presente invención, el hecho de que, la determinación de la cantidad de CYBP, en un fluido corporal, permite la valoración del cáncer de pulmón. La CYBP, puede medirse, con una alta sensibilidad, en los fluidos corporales, tales como la sangre, el suero o el plasma. De una forma adicional, los inventores, descubrieron el hecho de que es posible una valoración fidedigna del LC, mediante la medición de la CYBP, en una muestra de líquido, procedente de un individuo, es decir, que no se requiere una muestra de tejido o de biopsia, en la diagnosis del LC, cuando se utiliza la proteína CYBP, como marcador. De una forma todavía más sorprendente, se encontró el hecho de que, un incremento en el nivel de CYBP, según se medía a partir de un fluido corporal, de un individuo, se encuentra asociado con el cáncer de pulmón.

25 Tal y como resultará obvio, para una persona experta en el arte especializado de la técnica, la presente invención, no debe considerarse como encontrándose limitada a la proteína CYBP en su longitud total, de la SEQ ID NO:1. Mediante la presente invención, se abarcan, también los fragmentos fisiológicos o artificiales de la CYBP, modificaciones secundarias de la de la CYBP, así como también las variantes alélicas de la CYBP. Los fragmentos artificiales, abarcan, de una forma preferible, un péptido producido sintéticamente o mediante técnicas recombinantes, el cual comprende por lo menos un epítipo de interés de diagnóstico, consistente en por lo menos 6 aminoácidos contiguos, según se derivan de la secuencia dada a conocer en la SEQ ID NO:1. Dicho fragmento, puede utilizarse, de una forma ventajosa, para la generación de anticuerpos, o como un patrón estándar en un inmunoensayo. De una forma más preferible, el fragmento artificial, comprende por lo menos dos epítopos de interés apropiado, para configurar un inmunoensayo del tipo "sándwich".

35 Tal y como se utiliza aquí, en este documento, cada uno de los términos que se mencionan a continuación, tienen el significado asociado en esta sección.

40 Los artículos "un" y "una", se utilizan aquí, en este documento, para hacer referencia a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A título de ejemplo, "un marcador", significa un marcador o más de un marcador. El término "por lo menos", se utiliza aquí, en este documento, para indicar el hecho de que, de una forma opcional, pueden encontrarse presentes uno o más objetos. A título de ejemplo, un panel de marcador el cual comprende por lo menos (los marcadores) CYBP y CYFRA 21-1, puede comprender, de una forma opcional, uno o más marcadores adicionales distintos.

45 La expresión "uno o más", significa de 1 a 50, se una forma preferible, de 1 a 20, prefiriéndose, también, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, ó 15.

50 El término "marcador" o "marcador bioquímico", tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una molécula a ser utilizada como diana u objetivo, para analizar un muestra de ensayo de un paciente. En una forma de presentación, los ejemplos de tales tipos de dianas moleculares, son proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador, en la presente invención, se contemplan como incluyendo variantes de origen natural de dichas proteínas, así como también, fragmentos de dicha proteína o de dicha variante, de una forma particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables, comprenden, de una forma preferible, por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos del citado polipéptido marcador. Una persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocerá el hecho de que, las proteínas las cuales se liberan por parte de las células, o que se encuentran presentes en la matriz extracelular, pueden dañarse, por ejemplo, durante la inflamación, o que podrían degradarse o segmentarse en dichos fragmentos. Ciertos marcadores, se sintetizan en una forma activa, los cuales pueden subsiguientemente activarse mediante proteólisis. Tal y como podrán apreciar aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, proteínas o fragmentos de éstos, pueden también encontrarse presentes, como una parte de un complejo. En el sentido de la presente invención, tal tipo de complejo, puede también utilizarse como un marcador. Las variantes de un polipéptido marcador, se codifican mediante el mismo gen, pero, éstas, difieren en cuanto a lo referente a su punto isoelectrico (=PI) o su peso molecular (=MW), o ambos, por ejemplo, como resultado de un proceso alternativo del RNA ó pre-mRNA. La secuencia de aminoácidos de una variante es, en un

porcentaje del 95 %, ó más, idéntica a la correspondiente secuencia del marcador. De una forma adicional, o de una forma alternativa, un polipéptido marcador, o una variante de éste, puede portar una modificación post-translacional. Las modificaciones post-translacionales preferidas, son la glicosilación, la acilación / o la fosforilación.

- 5 De una forma preferible, el marcador CYBP, se mide, de una forma específica, a partir de una muestra, mediante la utilización de un agente de unión específico.

10 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para la CYBP, una lecitina de unión a la CYBP, o un anticuerpo a la CYBP. Un agente de unión específico, tiene por lo menos una afinidad de  $10^7$  l / mol, para su correspondiente molécula diana. El agente de unión específico tiene, de una forma preferible, una afinidad de  $10^8$  l / mol, ó de una forma también preferida, de  $10^9$  l/ml, para su molécula diana. Tal y como apreciará por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, el término específico, se utiliza para indicar el hecho de que, otras biomoléculas presentes en la muestra, no se unen, de una forma significativa, al agente de unión específico para la CYBP. De una forma preferible, el nivel de unión a una biomolécula, distinta de la molécula diana, tiene como resultado un afinidad de unión, la cual es, como mucho, de únicamente un porcentaje del 10 % ó inferior, o de únicamente un porcentaje del 5 % ó inferior, o de únicamente un porcentaje del 2 % ó inferior, o de únicamente un porcentaje del 1 % ó inferior, con respecto a la afinidad de la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico, el cual satisfará ambos criterios mínimos anteriormente citados, arriba, tanto en cuanto a lo referente a la afinidad como en cuanto a lo referente a la especificidad.

20 Un agente de unión específico es, de una forma preferible, un anticuerpo reactivo con la CYBP. El término anticuerpo, se refiere a un anticuerpo policlonal o a un anticuerpo monoclonal, a fragmentos de unión al antígeno de tales tipos de anticuerpos, a anticuerpos de cadena individual, así como a construcciones genéticas que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

25 Puede utilizarse cualquier fragmento que retenga los criterios anteriormente mencionados, arriba, de un agente de unión específico. Los anticuerpos, se generan según el estado actual de la técnica de los procedimientos correspondientes al arte de la técnica especializada se describen, por ejemplo, en Tijssen (Tijssen, P., *Practice and theory of enzyme immunoassays*, 11, (Práctica y teoría de los inmunoensayos de enzimas, 11), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, en la totalidad del libro y, especialmente, en las páginas 43 - 78). De una forma adicional, las personas expertas en el arte especializado de la técnica, están informadas sobre los procedimientos basados en los inmunoabsorbentes, los cuales pueden utilizarse para un aislamiento específico de los anticuerpos. Mediante la utilización de estos procedimientos, puede mejorarse la calidad de los anticuerpos policlonales y, así, de este modo, su rendimiento, en los inmunoensayos. (Tijssen, P., mencionado anteriormente, arriba, páginas 108 - 35 115).

40 En cuanto a lo referente a los logros alcanzados, según se da a conocer en la presente invención, para su ejecución, pueden utilizarse los anticuerpos policlonales que se han hecho crecer en conejos. No obstante, y de una forma evidente, pueden también utilizarse anticuerpos policlonales, procedentes de diferentes especies, tales como, por ejemplo, ratas o conejillos de indias, así como también anticuerpos monoclonales. Puesto que, los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualesquiera cantidades requeridas, con unas propiedades constantes, éstos representan unas herramientas de trabajo ideales, en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica. La generación y el uso de anticuerpos monoclonales a la CYBP, en un procedimiento en concordancia con la presente invención, representan, respectivamente, todavía otras formas preferidas de representación.

45 Tal y como podrán apreciar aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, ahora que la CYBP ha sido idéntica como un marcador, el cual es de utilidad en la valoración del cáncer de pulmón, pueden utilizarse varios procedimientos de inmunodiagnóstico, para alcanzar un resultado comparable a los logros de la presente invención. Así, por ejemplo, pueden utilizarse unas estrategias alternativas, para generar anticuerpos. Tales tipos de estrategias, comprenden, entre otros, el uso de péptidos sintéticos, que representen un epítipo de la CYBP, para la inmunización. De una forma alternativa, puede utilizarse la inmunización del DNA, también conocida como la vacunación de DNA.

50 Para los efectos de medición, la muestra obtenida, procedente de un individuo, se incuba con un agente de unión específico para la CYBP, bajo unas condiciones que sean apropiadas, para la formación de un complejo de agente de unión y la CYBP. Tales tipos de condiciones, no necesitan ser especificadas, debido al hecho de que, la persona experta en el arte especializado de la técnica, puede fácilmente identificar, sin ningún esfuerzo inventivo, tales tipos de condiciones apropiadas de incubación. La cantidad del complejo de agente de unión y la CYBP, se mide y se utiliza, en la valoración del cáncer de pulmón. Tal y como podrá apreciarse por parte de la persona experta en el arte especializado de la técnica, existen numerosos procedimientos para medir la cantidad de complejo específico de agente de unión y la CYBP, todos ellos descritos en detalle, en libros de texto relevantes (compárese, por ejemplo, con Tijssen P., mencionado anteriormente, arriba, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), *Immunoassay*, Academic Press, Boston (1996)).

De una forma preferible, la CYBP, se detecta en un formato de ensayo del tipo sándwich. En tal tipo de ensayo, se procede a utilizar un agente de unión específico, para capturar la CYP, por un lado, y un segundo agente de unión específico, el cual se encuentra marcado, para poder ser directamente o indirectamente detectable, por otro lado.

5 En una forma preferida de presentación, la medición de la CYBP, en una muestra, se lleva a cabo mediante la utilización de un inmunoensayo del tipo sándwich, en donde se procede a utilizar placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina. Se utiliza un anticuerpo policlonal, biotinilado, a la CYBP, como anticuerpo de captura, y se utiliza un anticuerpo policlonal, digoxigenilado, a la CYBP, como segundo compañero de unión específica. En complejo del tipo sándwich formado, se visualiza, finalmente, mediante un conjugado anti-digoxigenina de peroxidasa del rábano picante, y un sustrato de peroxidada apropiado.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, arriba, la CYBP, puede medirse a partir de una muestra líquida, obtenida de una muestra de un individuo. No se requiere ninguna muestra de tejido ni ninguna muestra de biopsia, para aplicar el marcador CYBP en la diagnosis del LC.

15 En una forma preferida de presentación del procedimiento en concordancia con la presente invención, éste se practica con plasma, como un material de muestra líquido.

20 Un “marcador del cáncer de pulmón”, en el sentido de la presente invención, es cualquier marcador, el cual, si se combina con el marcador CYBP, añade una información relevante, en la valoración del LC. La información, se considera como relevante o de un valor añadido si, a una especificidad dada, puede mejorarse la sensibilidad, o si a una sensibilidad dada, puede mejorarse la especificidad, respectivamente, para la valoración del LC, mediante la inclusión del citado marcador a una combinación de marcadores, que comprende ya el marcador CYBP. De una forma preferible, la mejora en la sensibilidad o en la especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa, a un nivel de significancia de  $p = 0,05, 0,02, 0,01$  ó inferior. De una forma preferible, el uno o más marcadores adicionales distintos del LC, se seleccionan de entre el grupo consistente en CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC.

30 El término “muestra”, tal y como éste se utiliza aquí, en este documento de solicitud de patente, se refiere a una muestra biológica, obtenida para el propósito de la evaluación in vitro. En los procedimientos en concordancia con la presente invención, la muestra o la muestra de un paciente, puede comprender, de una forma preferible, un fluido corporal o un extracto de tejido. Las muestras de ensayo preferidas, incluyen a la sangre, al suero, al plasma, al esputo y al lavado bronquial. Las muestras preferidas, son la sangre entera, el suero, el plasma, el lavado bronquial o el esputo, siendo, el plasma, la muestra que es la mayormente preferida.

35 El término “valoración del cáncer de pulmón”, tal y como se utiliza aquí, en este documento, se usa para indicar el hecho de que, el procedimiento en concordancia con la presente invención, (solo, o conjuntamente con otros marcadores o variables, tales como, por ejemplo, los criterios presentados por parte de la UICC (Unión Internacional Contra el Cáncer – [de sus siglas en inglés]-) (véase anteriormente, arriba)), ayudarán por ejemplo al médico especialista, a establecer o a confirmar la ausencia o la presencia del LC, o ayudarán, por ejemplo, al médico especialista, en la prognosis, en la detección de la recurrencia (seguimiento de control de los pacientes, después de la cirugía), en la exploración de rastreo y / o el seguimiento de control del tratamiento, especialmente, de la quimioterapia.

45 Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, cualquier tipo de valoración de esta clase, se realiza in vitro. A continuación, la muestra del paciente, se desecha. La muestra del paciente, se utiliza solamente para el procedimiento de diagnóstico in vitro, en concordancia con la presente invención y, el material de la muestra del paciente, no se transfiere de vuelta al cuerpo del paciente. La muestra, es una muestra líquida de, por ejemplo, sangre entera, suero o plasma.

50 En una forma preferida de presentación, la presente invención, se refiere a un procedimiento para valorar el LC in vitro, mediante marcadores bioquímicos, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de CYBP, y la utilización de la concentración determinada, en la valoración del LC.

55 Los inventores de la presente invención, han sido capaces, de una forma sorprendente, de detectar el marcador de proteína CYBP, en un significativo porcentaje de muestras derivadas de pacientes con LC. De una forma todavía más sorprendente, éstos han sido capaces de demostrar el hecho de que, la presencia y / o la concentración de CYBP, en tal tipo de muestra obtenida de procedencia de un individuo, puede utilizarse en la valoración del cáncer de pulmón.

60 El escenario ideal para la diagnosis, sería una situación, en donde, un evento o proceso individual, causaría la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, la diagnosis correcta, puede ser muy dificultosa, especialmente, cuando, la etiología de la enfermedad, no se entiende en su totalidad, tal como es el caso para el LC. Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, ningún marcador bioquímico, es un diagnóstico con un porcentaje del 100 % de especificidad y, al mismo

5 tiempo, con un porcentaje del 100 % de sensibilidad, para una enfermedad multifactorial dada, como, por ejemplo, para el LC. Más bien, los marcadores bioquímicos, como, por ejemplo, los consistentes en los CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP, SCC y, tal y como se muestra aquí, el CYBP, pueden utilizarse para valorar, con una cierta probabilidad, o valor predictivo, por ejemplo, la presencia, la ausencia, o la gravedad de una enfermedad. Así, por lo tanto, en la diagnosis clínica de rutina, generalmente, se consideran varios síntomas y marcadores biológicos, conjuntamente, en la diagnosis, el tratamiento y el gobierno y control de la enfermedad subyacente.

10 Los marcadores bioquímicos, pueden determinarse individualmente o, en una forma preferida de la presente invención, éstos pueden medirse simultáneamente, mediante la utilización de un chip o de tecnología de matrices (arrays) a base de cuentas. Las concentraciones de los biomarcadores, se interpretan, entonces, bien ya sea independientemente, como por ejemplo, mediante la utilización de un corte individual, para cada marcador, o bien, éstas se combinan, para la interpretación.

15 En una forma adicionalmente preferida de presentación, la valoración del LC, en concordancia con la presente invención, se lleva a cabo en un procedimiento el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de a) la CYBP, en una muestra de fluido corporal, y b), de uno o más marcadores distintos, adicionales, del cáncer de pulmón, y c) la utilización de los resultados de la medición, por ejemplo, las concentraciones determinadas en la etapa (a) y en la etapa (b), respectivamente, en la valoración del cáncer de pulmón.

20 En la valoración del cáncer del LC, el marcador CYBP, será ventajoso, en uno o más de los siguientes aspectos: exploración de rastreo; adyuvante de diagnóstico; prognosis; seguimiento de control de la terapia tal como la quimioterapia, radioterapia, e inmunoterapia.

25 Exploración de rastreo

La exploración de rastreo, se define como la aplicación sistemática de un test de ensayo para identificar individuos, tales como, por ejemplo, individuos de alto riesgo, para los indicadores de una enfermedad, tal como, por ejemplo, la presencia de un cáncer de pulmón. De una forma preferible, la población de exploración de sondeo, se encuentra compuesta por individuos que se conocen como encontrándose en un riesgo mayor, con respecto al riesgo medio, de cáncer de pulmón, tales como los fumadores, los exfumadores, y los trabajadores expuestos al uranio, al cuarzo o a los asbestos. En una forma preferida de presentación, se utiliza el esputo, como una muestra, en la exploración de rastreo del cáncer de pulmón.

35 Para muchas enfermedades, nunca, ningún marcador bioquímico, en la circulación, cumplirá con los criterios de sensibilidad y de especificidad requeridos para los propósitos de exploración de rastreo. Esto parece ser también ser cierto para el cáncer de pulmón. Debe esperarse el hecho de que deberá utilizarse un panel de marcadores el cual comprenda una pluralidad de marcadores, en la exploración de rastreo del LC. Los datos establecidos en la presente invención, indican el hecho de que el marcador CYBP, formará una parte integral de un panel de marcadores apropiado para los propósitos de exploración de rastreo para el LC. La presente invención, se refiere, por lo tanto, al uso de la proteína CYBP, como un marcador de un panel de marcadores del LC, es decir, un panel de marcadores que comprenda la CYBP, y uno o más marcadores adicionales para los propósitos de la exploración de rastreo del LC. Los marcadores adicionales preferidos, se seleccionan de ente CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC.

45 Adyuvante de diagnóstico

Los marcadores, pueden ser de ayuda en diagnosis diferencial de una enfermedad benigna o, respectivamente, maligna, en órgano particular, ayudando a distinguir entre diferentes tipos histológicos de tumor, o para establecer unos valores de línea de base de los marcadores, antes de la cirugía.

50 Hoy en día, los procedimientos importantes que se utilizan en la detección del cáncer de pulmón, son los consistentes en las exploraciones de radiología y / o de tomografía computerizada (CT). Los ganglios pequeños, es decir, pequeñas regiones de tejido suspendido, pueden visualizarse, mediante el empleo de estos procedimientos. No obstante, muchos de estos ganglios, - más de un porcentaje del 90 %, con la CT, representan cambios de tejidos benignos, y únicamente una minoría de los ganglios, representan tejido canceroso. El uso del marcador CYBP, puede ser de ayuda en la diferenciación de ganglios benignos, con respecto a los ganglios malignos.

60 En una forma preferida de presentación, el marcador CYBP, se utiliza en un procedimiento inmunohistológico, con objeto de establecer o confirmar diferentes tipos histológicos de LC.

Puesto que, el marcador consistente en la proteína CYBP, como marcador individual, puede ser superior a otros marcadores del LC, como el CEA o el NSE. Debe esperarse el hecho de que, el CYBP, se utilizará como un adyuvante de diagnóstico, especialmente, procediendo a establecer un valor de línea de base, antes de la cirugía. La presente invención, se refiere así, de este modo, al uso del marcador consistente en la proteína CYBP, para establecer un valor de línea de base, antes de la cirugía, para el LC.

Prognosis:

Los indicadores de prognosis, pueden definirse como aspectos o rasgos distintivos clínicos, patológicos, o bioquímicos de pacientes afectados de cáncer y de sus tumores, aspectos éstos, los cuales predicen, con una cierta probabilidad, el desenlace o resultado de la enfermedad. Su uso principal, es el consistente en ayudar a planificar, racionalmente, el gobierno y control de la enfermedad, es decir, el evitar un tratamiento deficiente de la enfermedad agresiva y un tratamiento deficiente de las enfermedades indolentes o no dolorosas, respectivamente. Molina R. et al., Tumor Biol. (2003) 24:209-218 evaluaron el valor de pronóstico de los CEA, CA 125, CYFRA 21-1, SSC y NSE en el NSCLC. En su estudio, unos niveles en suero anormales, de los marcadores NSE, CEA, y LDH (lactato deshidrogenasa), parecían indicar una corta supervivencia.

Ya que, el CYBP solo, contribuye de una forma significativa a la diferenciación de los pacientes afectados de LC, con respecto a los controles sanos, debe esperarse el hecho de que, éste, ayudará en la valoración de la prognosis, en pacientes que sufren del LC. El nivel de CYBP, preoperatorio, se combinará, con la mayor probabilidad, con uno o más marcadores adicionales, distintos, para el LC y / o el sistema de clasificación por etapas TNM. En una forma preferida de presentación, el marcador CYBP, se utiliza en la prognosis de los pacientes con LC.

Seguimiento de control de quimioterapia:

Merle, P. et al., Int. J. of Biological Markers (2004) 19:310-315, han evaluado las variaciones del nivel en suero de CYFRA 21-1, en pacientes con NSCLC localmente avanzado, tratados con quimioterapia de inducción. Éstos concluyeron que, el seguimiento temprano de control de los niveles en suero de CYFRA 21-1, puede ser una herramienta de prognosis, de utilidad, para la respuesta tumoral y la supervivencia, en pacientes con NSCLC en la etapa III. De una forma adicional, los informes reportados, han descrito el uso del CEA, en el seguimiento de control del tratamiento de pacientes con LC (Fukasawa T. et al., Cancer & Chemotherapy (1986) 13:1862-1867). La mayor parte de estos estudios, eran retrospectivos, no aleatorios, y contenían un reducido número de pacientes. Tal y como es el caso de los estudios con CYFRA 21-1, los estudios con CEA, sugerían el hecho de que: a) los pacientes con un disminución en los niveles de CEA, mientras recibían quimioterapia, tenían, generalmente, un mejor desenlace o resultado, que aquéllos pacientes cuyos niveles de CEA, fracasaron en cuanto a lo referente a su descenso y b), para casi la totalidad de los pacientes, los incrementos en los niveles de CEA, se encontraban asociados con una progresión de la enfermedad.

Se espera el hecho de que, el marcador CYBP, será por lo menos tan bueno, como marcador para el seguimiento de control de la quimioterapia, como los son el CYFRA 21-1 y el CEA, respectivamente. Así, por lo tanto, la presente invención, se refiere también al uso del CYBP, en el seguimiento de control de pacientes con LC, que se están tratando con quimioterapia.

Seguimiento

Una gran porcentaje de pacientes con LC, los cuales experimentaron una resección quirúrgica, enfocada a una eliminación completa del tejido canceroso, desarrollaron, posteriormente, enfermedad recurrente o metastásica (Wagner, H., Chest (2000) 117:110-118; Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. (2003) 75:973-980). La mayoría de estas recaídas, acontecen dentro los primeros 2 – 3 años, después de la cirugía. Puesto que, la enfermedad recurrente / metastásica es invariablemente fatal, si ésta se detecta demasiado tarde, se han realizado considerables investigaciones, enfocadas a la recaída del LC, en una etapa temprana y, así, de este modo, potencialmente tratable.

Por consiguiente, muchos pacientes afectados de LC, experimentan un programa de seguimiento de control postoperatorio, el cual de una forma frecuente, incluye el seguimiento de control con CEA. El seguimiento de control en serie, con CEA, un año después de la resección quirúrgica, ha mostrado detectar una enfermedad postoperatoria recurrente / metastásica temprana, con una sensibilidad correspondiente a un porcentaje de aproximadamente un 29 %, a una especificidad correspondiente a un porcentaje de aproximadamente un 97 %, incluso en ausencia de síntomas o signos sospechosos (Buccheri, G. et al., Ann. Thorac. Surg. (2003) 75:973-980). Así, de este modo, el seguimiento de los pacientes con LC, después de la cirugía, es uno de los más importantes sectores de uso para un marcador bioquímico apropiado. Debido a la alta sensibilidad del CYBP, en los pacientes con LC investigados, es probable que, el CYBP solo, o en combinación con uno o más marcadores adicionales distintos, sea de gran ayuda en el seguimiento de pacientes con LC, especialmente, en los pacientes con LC, después de la cirugía. El uso de un panel de marcadores que comprenda el CYBP y uno o más marcadores adicionales distintos del LC, en el seguimiento de los pacientes con LC, representa una forma de presentación adicionalmente preferida de la presente invención.

La presente invención, en una forma preferida de presentación, se refiere al uso del CYBP, en el sector de diagnóstico del LC, en la valoración del LC, respectivamente.

En todavía otra forma preferida de presentación de la presente invención, ésta se refiere al uso de CYBP, como molécula marcadora para el cáncer de pulmón, en combinación con uno o más moléculas adicionales distintas, para el cáncer de pulmón, en la valoración del cáncer de pulmón, a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo. Los otros marcadores para LC seleccionados, preferidos, mediante los cuales se puede combinar la medición del CYBP, son los consistentes en CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP, y / o SCC. Todavía de una forma adicional, el panel de marcadores usado, en la valoración del LC, comprende el CYBP y, por lo menos, otra molécula marcadora, seleccionada de entre el grupo consistente en CYFRA 21-1 y CEA.

Tal y como podrá apreciar la persona experta en el arte especializado de la técnica, existen varias formas de utilizar las mediciones de dos más marcadores, con objeto de mejorar la cuestión de diagnóstico que se encuentra en investigación. En una propuesta de procedimiento, bastante sencillo, pero, no obstante, a menudo efectivo, se asume un resultado positivo, si por lo menos una de las muestras es positiva, para por lo menos uno de los marcadores investigados. Este puede por ejemplo ser en caso, cuando se procede a investigar una enfermedad infecciosa, como el SIDA.

No obstante y de una forma frecuente, se procede a evaluar la combinación de marcadores. De una forma preferible, los valores medidos para los marcadores de un panel de marcadores, como, por ejemplo, para el CYBP o para el CYFRA 21 – 1, combinan matemáticamente, y, el valor combinado, se correlaciona con la cuestión de diagnóstico subyacente. Los valores de los marcadores, pueden combinarse mediante cualquier estado apropiado del procedimiento matemático. Los procedimientos que son bien conocidos para correlacionar una combinación de marcadores, a un enfermedad, emplea procedimientos tales como los consistentes en el análisis discriminador (DA), (a saber, DA lineal, DA de los cuadrados, DA regularizado), procedimientos de Kernel (a saber, SVM), Procedimientos no paramétricos (a saber, clasificadores o algoritmos del vecino más próximo k), PLS (Mínimos cuadrados parciales (PLS, del inglés Partial Least Squares), Procedimientos basados en árboles de decisión (a saber, la Regresión logística, los procedimientos del tipo CART, los procedimientos aleatorios de bosques de decisión – Random Forest Method -, los procedimientos de Boosting / Bagging), los Modelos lineales generalizados (a saber, la Regresión logística), los procedimientos a base de componentes principales (a saber, SIMCA), Modelos aditivos generalizados, Procedimientos basados en la lógica difusa, Procedimientos basados redes neuronales y algoritmos genéticos. Las personas expertas en el arte especializado de la técnica, no tendrán problema alguno en la selección de un procedimiento apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención. De una forma preferible, el procedimiento apropiado, es el consistente en correlacionar la combinación de marcadores de la invención, como, por ejemplo, con la ausencia o la presencia de LC, se selecciona de entre los procedimientos consistentes en los análisis discriminante (DA)(el DA lineal, el DA de los cuadrados, el DA regularizado), procedimientos de Kernel (a saber, SVM), Procedimientos no paramétricos (a saber, clasificadores o algoritmos del vecino más próximo k), PLS (Mínimos cuadrados parciales (PLS, del inglés Partial Least Squares), Procedimientos basados en árboles de decisión (a saber, la Regresión logística, los procedimientos del tipo CART, los procedimientos aleatorios de bosques de decisión – Random Forest Method -, los procedimientos de Boosting / Bagging), o los Modelos lineales generalizados (a saber, la Regresión logística). Los detalles referentes a estos procedimientos estadísticos, se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., et al, J. of Computational and Graphical Statistics, - Estadísticas gráficas y de computación -, 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H. , J. of the American Statistical Association 84 (1989) 165-175; Hastie, Trevor, Tibshirani, Robert, Friedman, Jerome, The Elements of Statistical Learning, - Los elementos del aprendizaje estadístico -, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman, L., Friedman, J. H., Olshen, R. A., Stone, C. J. (1984) Classification and regression trees, - Clasificación y árboles de regresión -, Wadsworth; Breiman, L., Random Forests, - Procedimientos aleatorios de bosques de decisión -, Machine Learning, 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction, - La evaluación estadística de tests de ensayo médicos, para la clasificación y la predicción -, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); y Duda, R. O., Hart, P. E., Stork, D. G., Pattern Classification, - Clasificación de modelos patrón -, Wiley Interscience, 2ª Edición (2001).

Una forma preferida de presentación de la presente invención, es la consistente en el uso de un corte multivariante optimizado, para la combinación subyacente de marcadores biológicos, y con objeto de discriminar el estado A, con respecto al estado B, como por ejemplo, la discriminación de enfermo, con respecto a sano. En este tipo de análisis, los marcadores, ya no son independientes, sino que éstos, forman un panel de marcadores.

La precisión de un procedimiento de diagnóstico, se describe, de la mejor forma, por mediación de sus características operativas del receptor (ROC – [del inglés receiver-operating characteristics]–)(véase, especialmente, a dicho efecto, Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC, es un gráfico con todos los pares de sensibilidad / especificidad resultantes de variar de una forma continua el umbral de decisión de rango entero de los datos observados.

Los resultados clínicos de un test de ensayo de laboratorio, depende de su precisión de diagnóstico, o de la capacidad de clasificar sujetos de una forma correcta, en grupos clínicamente relevantes. Las mediciones precisas de diagnóstico de los tests de ensayo, capacitan para distinguir, de una forma correcta, dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Tales tipos de condiciones son, por ejemplo, la salud o la enfermedad, o enfermedad benigna con respecto a enfermedad maligna.

En cada caso, el gráfico ROC, representa el solapado entre dos distribuciones, procediendo a trazar el gráfico de la sensibilidad 1 con respecto a,  $1 -$  la especificidad del rango completo de los umbrales de decisión. En el eje de las y, se encuentra la sensibilidad o fracción positiva cierta [definida como (número de resultados del test de ensayo positivos, verdaderos) / (número de resultados del test de ensayo positivos, verdaderos + número de resultados del test de ensayo negativos, falsos)]. Este se ha referenciado, también, como siendo positivo, en presencia de una enfermedad o condición. Éste se calcula solamente a partir del subgrupo afectado. En el eje de las x, se encuentra la fracción positiva falsa, ó  $1 -$  la especificidad [definida como (número de resultados del test de ensayo positivos, falsos) / (número de resultados del test de ensayo negativos, verdaderos + número de resultados del test de ensayo positivos, falsos)]. Éste es un índice de la especificidad y éste se calcula, enteramente, a partir del subgrupo no afectado. Debido al hecho de que las fracciones positivas verdaderas y falsas, se calculan enteramente por separado, mediante la utilización de los resultados de los tests de ensayo, prudentes de los dos subgrupos diferentes, el gráfico ROC, representa un par sensibilidad /  $1 -$  especificidad, correspondiente a un umbral particular de decisión. Un test de ensayo con una discriminación perfecta (sin solapado en las dos distribuciones de resultados), tiene un gráfico ROC el cual pasa a través de la esquina superior izquierda, en donde, la fracción positiva verdadera, es del un 1,0 % ó de un 100 % (sensibilidad perfecta), y la fracción positiva falsa, es 0 (especificidad perfecta). El registro teórico para un test de ensayo, sin ninguna discriminación (distribuciones idénticas de los resultados para los dos grupos), es una línea en diagonal, a 45°, desde la esquina inferior izquierda, a la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos, se encuentran entre estos dos extremos. Si el gráfico ROC se encuentra completamente por debajo de esa diagonal a 45°, esto se remedia fácilmente, procediendo a invertir el criterio de "positividad" de "mayor de", por "menor de" o viceversa). Cualitativamente, cuanto más cercano se encuentra el gráfico, a la esquina superior izquierda, mayor es la precisión total del test de ensayo.

Una forma preferida de cuantificación la precisión del diagnóstico de un test de ensayo de laboratorio, es la consistente en expresar su resultado mediante un número individual. Un parámetro total de este tipo, es por ejemplo el denominado "error total" o, de una forma alternativa, "área bajo la curva = AUC". La medición global más usual, es el área que se encuentra bajo el gráfico ROC. Por convención, éste área, es siempre  $\leq 0,5$  (en el caso en que no lo sea, se puede proceder a invertir la norma de decisión, para realizarlo de este modo. los valores, se encuentran comprendidos dentro de un rango situado entre 1,0 (separación perfecta del los valores del test de ensayo, de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente de los dos grupos de test de ensayo). El área, no depende únicamente de una porción particular del gráfico, tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad a un 90 % de especificidad, sino del gráfico en su totalidad. Esto es una expresión descriptiva, cuantitativa, de cuán cercano es el gráfico ROC, con respecto al que es perfecto (área = 1,0).

En una forma preferida de presentación de la presente invención, ésta se refiere a un procedimiento para mejorar la precisión de diagnóstico para el LC, versus controles sanos, mediante la medición, en una muestra, de la concentración de por lo menos CYBP y CYFRA 21-1 y, opcionalmente, de CEA, proGRP, NSE, y / o SCC, respectivamente, y correlacionando las concentraciones determinadas para la presencia o ausencia de LC, resultando, la mejora, en que se clasifican correctamente más pacientes que sufren de LC versus controles sanos, al compararse con una clasificación basada en cualquier marcador individual investigado solos.

En una forma preferida de presentación en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores CYBP y CYFRA 21-1, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la medición del LC.

En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores CYBP y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la medición del LC.

En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores CYBP, CYFRA 21-1, y CEA, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la medición del LC.

En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores CYBP, CYFRA 21-1, y proGRP, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la medición del LC.

En un procedimiento preferido adicional en concordancia con la presente invención, se determina por lo menos la concentración de los biomarcadores CYBP, CYFRA 21-1, y SCC, respectivamente, y la combinación de marcadores, se usa en la medición del LC.

Los ejemplos que se facilitan a continuación, se proporcionan con objeto de ayudar a entender la presente invención, cuyo auténtico alcance, se establece en las reivindicaciones anexas. Se entenderá el hecho de que pueden realizarse modificaciones, en los procedimientos expuestos, sin apartarse del espíritu de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Generación de anticuerpos al marcador de cáncer de pulmón proteína CYBP

Se procede generar preparaciones de un anticuerpo policlonal al marcador de cáncer de pulmón proteína CYBP, para el uso posterior del anticuerpo en la medición de los niveles de CYBP, en el suero, en el plasma, y en la sangre, mediante ensayos de inmunodetección, tales como por ejemplo, los consistentes en el de transferencia Western y el ELISA.

#### Expresión de proteínas recombinantes en E. coli:

Con objeto de generar anticuerpos contra la proteína CYBP, se produce el antígeno recombinante en E. coli: Así, por los tanto, la región codificante de la proteína CYBP, se amplifica mediante PRC, a partir del clon del CYBP-cDNA, que codifica para los 227 aminoácidos, según se especifica en la SEQ. ID. NO: 1, mediante la utilización cebadores de avance e inversos.

Los cebadores de avance (aparte del los sitios de unión que clonan al EcoRI y de los sitios de unión ribosómica), representan oligonucleótidos que codifican para una extensión de péptido MRGSHHHHHHIEGR N-terminal (SEQ. ID NO: 2), introducida en la cadena del polipéptido CYBP. El fragmento de PCR digerido por *EcoRI/BamHI*, se liga en el correspondiente vector fragmento de vector pQE-30 (Qiagen, Hilden, Alemania), el cual se transforma subsiguientemente en células competentes de E.coli XL1-blue. Después del análisis se la secuencia, el plásmido, se transformó en células competentes de E.coli BL21, para la expresión, bajo el promotor T5 IPTG-inducible de la serie del vector pQE, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-CYBP, se procede a granular 1 l de un cultivo de bacterias inducido durante el transcurso de toda la noche y, el gránulo celular, se resuspende en tampón de fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, pH 7,5, que contiene 1 mg/ml de lisozima y tabletas de inhibidores de proteasa exentos de EDTA Complete®. Las células, se rompen mediante ultrasonificación (mediante ultra-sonidos) y, el material insoluble, se granula mediante centrifugación y, el sobrenadante, se aplica a cromatografía de afinidad de metales mediante el ácido Ni-nitriloacético (Ni-NTA). Se procede, a continuación, a lavar la columna, con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis, seguido por lavados con tampón fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, imidazol 20 mM, pH 7.4. Finalmente, se procede a unir el antígeno, con un gradiente de imidazol, de 20 a 500 mM, en tampón fosfato sódico 20 mM, cloruro sódico 500 mM, pH, 7,4, y se almacena en tampón HEPES 75 mM, cloruro sódico 100 mM, EDTA 1 mM, 6,5 % de sucrosa a una temperatura de 4°C.

#### Generación de anticuerpos policlonales

##### a) Inmunización

Para la inmunización, se procede a preparar una emulsión fresca de solución de proteína (100 µg / ml de proteína CIBP), y adyuvante de Freund, completo, a un factor de relación de 1 : 1. Cada conejo, se inmuniza con 1 ml de emulsión, en los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se procede a extraer sangre y, el suero anti-CYBP resultante, se utiliza de la forma que se describe abajo, a continuación.

##### b) Purificación de la Ig (inmunoglobulina G), a partir del suero del conejo, mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico

Se procede a diluir un volumen de suero del conejo, con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). El pH, se ajusta a un valor de 4,5, con Tris-base 2M. A continuación, se procede a añadir ácido caprílico (25 µl / ml de la muestra diluida), mediante procedimiento de goteo, bajo la acción de una agitación vigorosa. Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, se procede a centrifugar la muestra (13.00 x g, 30 minutos, 4°C), se desecha el gránulo y, el sobrenadante, se recolecta. El pH del sobrenadante, se ajusta a un valor de 7,5, mediante la adición de Tris-base 2M.

La inmunoglobulina en el sobrenadante, se precipita, bajo la acción de una agitación vigorosa, mediante la adición, por procedimiento de goteo, de solución 4 M de sulfato de amónico, a una concentración final de 2 M. Se procede a recolectar las inmunoglobulinas precipitadas, mediante centrifugación (8.000 x g, 15 minutos, 4°C).

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

##### c) Biotinilación de la Ig del conejo, policlonal

Se procede a llevar la IgG del conejo, policlonal, a un valor de solución de 10 mg /ml, en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. A continuación, se procede a añadir 50 µl de biotin-N-hidroxisuccinamida (3,6 mg / ml en DMSO), por ml de solución de de IgG. Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, a la temperatura ambiente, se procede a cromatografiar la muestra, sobre Superdex 200 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). A continuación, se procede a recolectar las fracciones que contienen la IgG biotinilada.

d) Conjugación con digoxigenina de la Ig del conejo, policlonal

Se procede a llevar la IgG del conejo, policlonal, a un valor de solución de 10 mg /ml, en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM. A continuación, se procede a añadir 50 µl de éster de N-hidroxisuccinamida del ácido digoxigenin-3-O-metilcarbonil-ε-aminocapróico (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, No. de Cat. 1 333 054) (3,8 mg / ml en DMSO), por ml de solución de de IgG. Después de un transcurso de tiempo de 30 minutos, a la temperatura ambiente, se procede a cromatografiar la muestra, sobre Superdex® 200 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM). A continuación, se procede a recolectar las fracciones que contienen la IgG biotinilada.

Ejemplo 2

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

Para la detección de la CYBP, en el suero o el plasma humano, se procede a desarrollar un ensayo ELISA sándwich. Para capturar el antígeno, se procede a conjugar anticuerpo policlonal anti-CYBP (véase el Ejemplo 1), con biotina, y éste se inmoviliza sobre una superficie recubierta con estreptavidina y, para la detección del antígeno, se procede a conjugar anticuerpo policlonal anti-CYBP, con digoxigenina.

Se procede a incubar placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina, con 100 µl de anticuerpo policlonal anti-CYBP, biotinilado (1 µg / ml) por pozo, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a la temperatura ambiente. A continuación, se procede a lavar las placas, tres veces, con PBS, Twenn 20 al 0,05 %. Después, los pozos, se incuban, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, con bien ya sea una dilución en serie de la proteína recombinante (véase el Ejemplo 1) como antígeno estándar, o bien ya sea con muestras plasma en EDTA, diluidas, procedentes de pacientes, conjuntamente con 5 µg / ml de anticuerpo policlonal anti-CYBP, conjugado con digoxigenina. La incubación, se llevó a cabo, en un tampón de incubación (PBS, que comprendía 0,1% TWENN y 1% BSA). A continuación, se procede a lavar las placas, tres veces, con objeto de eliminar los componentes no unidos. En una etapa siguiente, los pozos, se incuban con 20 mU/ml de conjugado de anti-biotin-digoxigenin-peroxidasa, durante un transcurso de tiempo de 6 minutos. A continuación, se procede a lavar las placas, tres veces, con el mismo tampón. Para la detección de complejos de antígeno-anticuerpo unidos, se procede a incubar los pozos, con 200 µl de solución de TMB (tetrametilbenzidina)(ROCHE Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, No. de catálogo 120 344 25 001), durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, y se para, mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1N, y se procede a medir la OD, a 4r0 nm (con una longitud de onda de 620 nm, como longitud de onda de referencia), con un lector ELISA.

Ejemplo 3

Población de estudio

Se utilizan muestras derivadas de 60 pacientes afectados de NSCLC, bien caracterizados (30 con adeno-CA, 20 con CA de células escamosas).

Se procede a evaluar los niveles de CYBP, CEA y CYFRA 21 - 1, en las muestras de LC.

Los resultados obtenidos, se muestran en la Tabla 1:

TABLA 1:

	CEA [mg/m]]	CYFRA 21-1 [mg/m]	CYBP (EDTA) [mg/m]
<b>Corte (95% de donantes de sangre)</b>	> 5,5	> 2,1	> 9,29
número de muestras	60	60	60
número de positivos	19	43	49
<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>32</b>	<b>72</b>	<b>82</b>
número de muestras Adeno	30	30	30
número de positivos Adeno	13	19	25
<b>Sensibilidad (%) Adeno</b>	<b>43</b>	<b>63</b>	<b>83</b>

Continuación TABLA 1:

	CEA [mg/m]	CYFRA 21-1 [mg/m]	CYBP (EDTA) [mg/m]
número de muestras escamosos	30	30	30
número de positivos escamosos	6	24	24
<b>Sensibilidad (%) escamosos</b>	<b>20</b>	<b>80</b>	<b>80</b>
<b>Corte (90% de donantes de sangre)</b>	> 3,9	> 1,6	>8,58
número de muestras	60	60	60
número de positivos	24	47	50
<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>40</b>	<b>78</b>	<b>83</b>

5 Con un valor de corte de 9,29 µg /ml, la sensibilidad de la CYBP, en todas las muestras de LC, es de un 82%, para las muestras de adenocarcinoma, de un 83%, y para las muestras de carcinoma de células escamosas, del 80%, respectivamente. Esta sensibilidad, era sorprendente, y es significativamente superior, que la sensibilidad para el CEA y el CYFRA 21-1.

10 Listado se secuencias

<110> F. Hoffmann – La Roche

15 <120> CYBP como marcador para cáncer de pulmón

<130> 43702P EP

<160> 2

20 <170> Patent In, versión 3.3

<210> 1

<211> 227

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

30 Ala Ser Glu Glu Leu Gln Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Val Leu Leu  
1 5 10 15

35 Glu Lys Ala Thr Arg Lys Arg Val Arg Asp Ala Leu Thr Ala Glu Lys  
20 25 30

40 Ser Lys Ile Glu Thr Glu Ile Lys Asn Lys Met Gln Gln Lys Ser Gln  
35 40 45

45 Lys Lys Ala Glu Leu Leu Asp Asn Glu Lys Pro Ala Ala Val Val Ala  
50 55 60

50 Pro Ile Thr Thr Gly Tyr Thr Val Lys Ile Ser Asn Tyr Gly Trp Asp  
65 70 75 80

5 Gln Ser Asp Lys Phe Val Lys Ile Tyr Ile Thr Leu Thr Gly Val His  
85 90 95

10 Gln Val Pro Thr Glu Asn Val Gln Val His Phe Thr Glu Arg Ser Phe  
100 105 110

15 Asp Leu Leu Val Lys Asn Leu Asn Gly Lys Ser Tyr Ser Met Ile Val  
115 120 125

20 Asn Asn Leu Leu Lys Pro Ile Ser Val Glu Gly Ser Ser Lys Lys Val  
130 135 140

25 Lys Thr Asp Thr Val Leu Ile Leu Cys Arg Lys Lys Val Glu Asn Thr  
145 150 155 160

30 Arg Trp Asp Tyr Leu Thr Gln Val Glu Lys Glu Cys Lys Glu Lys Glu  
165 170 175

35 Lys Pro Ser Tyr Asp Thr Glu Thr Asp Pro Ser Glu Gly Leu Met Asn  
180 185 190

40 Val Leu Lys Lys Ile Tyr Glu Asp Gly Asp Asp Asp Met Lys Arg Thr  
195 200 205

45 Ile Asn Lys Ala Trp Val Glu Ser Arg Glu Lys Gln Ala Lys Gly Asp  
210 215 220

50 Thr Glu Phe  
225

55 <210> 2  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Extensión péptido

<400> 2

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- Un procedimiento para valorar el cáncer de pulmón, in vitro, el cual comprende la medición, en una muestra, de la concentración de
- 10 a) CYBP, en una muestra de fluido corporal,  
b) de una forma opcional, de uno o más marcadores distintos, adicionales, del cáncer de pulmón, y  
c) la utilización de los resultados de la medición, en la etapa (a) y, opcionalmente, en la etapa (b), en la valoración del cáncer de pulmón, en donde, la detección de CYBP, es indicativa para cáncer de pulmón.
- 15 2.- El procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, los citados uno o más marcadores distintos, adicionales, se seleccionan de entre el grupo consistente en CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC.
- 20 3.- El procedimiento, según la reivindicación 2, en donde, el citado uno o más marcadores distintos, adicionales, es el CYFRA 21-1.
- 4.- El procedimiento, según la reivindicación 2, en donde, el citado uno o más marcadores distintos, adicionales, es el CEA.
- 25 5.- El procedimiento, según la reivindicación 2, en donde, el citado uno o más marcadores distintos, adicionales, es el SCC.
- 6.- Uso de CYBP, en la valoración del cáncer de pulmón, in vitro, en una muestra de fluido corporal, en donde, la detección de CYBP, es indicativa para el cáncer de pulmón.
- 30 7.- Uso de un panel de marcadores, el cual comprende CYBP y uno o más marcadores distintos, adicionales, para el cáncer de pulmón, en la valoración in vitro del cáncer de pulmón, en una muestra de fluido corporal, en donde, la detección de CYBP, es indicativa para el cáncer de pulmón.
- 35 8.- Uso del panel de marcadores según la reivindicación 7, en donde, el uno o más marcadores distintos, adicionales, se seleccionan de entre el grupo consistente en CYFRA 21-1, CEA, NSE, proGRP y SCC.
- 9.- Uso de un panel de marcadores según la reivindicación 8, el cual comprende, por lo menos, CYBP y CYFRA 21-1.
- 10.- El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el uso, según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde, el fluido corporal, es plasma.