

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 642**

21 Número de solicitud: 201300502

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

**24.05.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**26.12.2014**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (50.0%)**  
**Campus Universitario, s/n**  
**36310 Vigo (Pontevedra) ES y**  
**SERVICIO GALEGO DE SAÚDE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ BERROCAL, Francisco Javier;**  
**RODRÍGUEZ GIRONDO, Mar;**  
**BLANCO PRIETO, Sonia;**  
**VÁZQUEZ IGLESIAS, Lorena;**  
**PÁEZ DE LA CADENA TORTOSA, María;**  
**FERNÁNDEZ VILLAR, Alberto;**  
**BOTANA RIAL, María Isabel y**  
**REPRESAS REPRESAS, Cristina**

54 Título: **Procedimiento para el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante test en suero**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al desarrollo de un procedimiento para realizar el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante test en suero. Este método consiste en la determinación en suero de la concentración de las proteínas CD26 soluble (sCD26) y Calprotectina mediante tests fiables y de carácter mínimamente invasivo. La variación conjunta de ambas proteínas incrementa su capacidad diagnóstica y constituye un potencial marcador para el diagnóstico de esta neoplasia.

La aplicación de este procedimiento en el ámbito clínico-sanitario supone una herramienta de gran utilidad que proporciona al médico datos objetivos sobre la probabilidad de que un individuo padezca cáncer de pulmón, sirviendo como un complemento a las pruebas diagnósticas que se llevan a cabo habitualmente.

**ES 2 525 642 A2**

**DESCRIPCIÓN****PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE TEST EN SUERO****SECTOR DE LA TÉCNICA**

5 El sector de la técnica al que hace referencia la invención se encuadra en el ámbito sanitario, específicamente en el de Oncología Pulmonar.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10 El Cáncer de Pulmón (CP) lidera la mortalidad por cáncer en España, estimándose en el año 2012 unas 20.000 muertes a causa de esta neoplasia. Es el tercer cáncer en incidencia, estimando para ese mismo año unos 24.500 casos; y la proximidad entre ambas cifras refleja su mal pronóstico (Sánchez *et al*, 2010). Así, la supervivencia global a 5 años es del 15%, cifra que puede alcanzar un 80% cuando el diagnóstico se realiza en un estadio temprano de la enfermedad y ésta es operable (SEPAR, 2011). Desafortunadamente, sólo un 24% de los pacientes son diagnosticados cuando el cáncer es localizable, mientras que el 44% se diagnostican cuando éste ya se ha diseminado (Botana-Rial *et al*, 2007).

20 Desde el punto de vista de estadificación, pronóstico y tratamiento, el CP se clasifica en dos grandes tipos histológicos: el carcinoma pulmonar de células no pequeñas o no microcítico (CPNM), que representa el 85% de los casos de CP, y el carcinoma pulmonar de célula pequeña o microcítico (CPM), que incluye el 15% restante. Dentro del CPNM los subtipos histológicos más frecuentes son el adenocarcinoma (43,6%) y el carcinoma escamoso (29,2%) (Botana-Rial *et al*, 2007).

25 La alta mortalidad del CP, asociada a una detección tardía, pone de manifiesto la importancia de un diagnóstico precoz. Sin embargo, la mayoría de pacientes son asintomáticos y los síntomas aparecen cuando la enfermedad se halla en un estado avanzado y sin opción de tratamiento quirúrgico curativo. Los síntomas más comunes son dolor torácico, disnea, hemoptisis, cansancio, debilidad muscular y pérdida de peso. Tras la sospecha de cáncer de pulmón, la confirmación requiere la realización de distintas pruebas, como radiografía de tórax o tomografía computarizada. A menudo la determinación definitiva de la presencia de cáncer exige la obtención de una biopsia. Otras técnicas para el correcto diagnóstico son la  
30 broncoscopia, resonancia magnética, mediastinoscopia o tomografía por emisión de positrones (PET) (Protocolo de diagnóstico y tratamiento del Cáncer de Pulmón el Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, 2008). Muchas de estas técnicas diagnósticas son caras y resultan traumáticas para el paciente.

35 Un test sérico de bajo coste y carácter mínimamente invasivo sería un complemento idóneo a estas técnicas. A día de hoy no existen pruebas en suero útiles para diagnosticar de forma temprana el CP, aunque en clínica se emplean varios biomarcadores como el Antígeno Carcinoembrionario (CEA), la Citoqueratina 19 (CYFRA 21-1), la enolasa específica neuronal

(NSE) y el Antígeno de Células Escamosas (SCC). Su utilidad reside en el pronóstico, seguimiento o monitorización del tratamiento en pacientes ya diagnosticados.

Por otro lado, dada la complejidad tumoral, actualmente se acepta que la estrategia para intentar mejorar el diagnóstico es la combinación de varios posibles marcadores.

5 Anteriormente, algunos inventores del procedimiento comprobaron la eficacia de esta aproximación en CP (Lemos-González *et al*, 2007).

Otro aspecto a considerar es la inespecificidad que pueden presentar los potenciales marcadores si experimentan alteraciones de sus niveles en patologías benignas. Los inventores del procedimiento objeto de esta patente han demostrado que una combinación de marcadores  
10 resulta una herramienta útil para un diagnóstico más efectivo del CP, no sólo frente a controles sanos, sino discriminando también patologías benignas del pulmón.

Para su evaluación en suero de pacientes con CP, pacientes con patología benigna del pulmón y controles sanos, se seleccionaron 2 potenciales marcadores. La selección de estos marcadores se basó en su valor descrito en la literatura científica para la discriminación de CP o su  
15 implicación en distintos aspectos del proceso tumoral. Los 2 marcadores escogidos para buscar una combinación eficiente para el diagnóstico fueron la glicoproteína CD26 y la Calprotectina. Entre éstos, el CD26 presentó un descenso significativo de sus niveles asociado a la presencia de CP, registrándose para la Calprotectina un aumento significativo de sus niveles. La obtención de la *Receiver Operating Characteristics Curve*, curvas ROC, estimó un valor de AUC (*Area Under the Curve*) de 0,698 para el CD26, y 0,765 para la Calprotectina.  
20

La presente invención muestra que los niveles séricos de CD26 y Calprotectina, medidos en suero de pacientes con CP y sujetos control, se relacionan con la presencia de esta neoplasia; y la combinación de los niveles de CD26 y Calprotectina permite obtener un aumento significativo en el valor de AUC respecto a estos marcadores evaluados de manera individual. Esta variación  
25 conjunta hacen de esta combinación un potencial marcador para el diagnóstico de esta neoplasia.

## BIBLIOGRAFÍA

30 Botana-Rial MI, Fernández-Villar A, Repesas-Repesas C *et al*. Cáncer de Pulmón en el área sur de Galicia. Cambios epidemiológicos y clínicos en la última década. *Pneuma* 2007; 9: 13-8.

Lemos-González Y, Rodríguez-Berrocal FJ, Cordero OJ *et al*. Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 96(10): 1569-78.

35 Protocolo de diagnóstico y tratamiento del cáncer de pulmón. Complejo Hospitalario Universitario de Vigo. Disponible en: <http://intranetchuvi>.

Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R *et al*. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 3: iii30-36.

SEPAR, Página web de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. Disponible en: [http://www.separ.es/noticias/SEPAR\\_Alta\\_mortalidad\\_dificil\\_diagnostico\\_en\\_el\\_cancer.html](http://www.separ.es/noticias/SEPAR_Alta_mortalidad_dificil_diagnostico_en_el_cancer.html).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 La presente invención describe un procedimiento para el diagnóstico del cáncer de pulmón más ventajoso que los empleados actualmente en el ámbito clínico. Este procedimiento consiste en la determinación en suero de los niveles de las proteínas CD26 (sCD26) y calprotectina. La realización de esta prueba no supone al individuo más molestia que la extracción de sangre, técnica de extensa implementación, mínimamente invasiva y de fácil aplicación.

10 La determinación de los niveles de sCD26 y calprotectina solubles se realiza mediante ensayos inmunoenzimáticos específicos siguiendo la técnica de ELISA tipo sándwich.

Los inventores del procedimiento objeto de esta patente han demostrado que los perfiles séricos de sCD26 y calprotectina difieren en pacientes de cáncer de pulmón respecto a sujetos sanos o con patologías pulmonares no neoplásicas. Los pacientes de cáncer de pulmón  
15 presentan niveles de sCD26 inferiores a los detectados en los sujetos control, mientras que los niveles de calprotectina se ven aumentados en los pacientes con cáncer. Al considerar simultáneamente los cambios en ambas proteínas, se incrementa la capacidad de diferenciación de sujetos que padecen cáncer frente a los que no.

La determinación de los niveles séricos de sCD26 y calprotectina puede ofrecer al médico datos  
20 objetivos sobre la probabilidad de que un individuo padezca cáncer de pulmón. Este resultado puede complementar otras pruebas que se utilizan actualmente en el ámbito clínico para el diagnóstico de esta neoplasia. El resultado positivo de la prueba descrita en la presente invención puede confirmarse de modo definitivo realizando una biopsia.

## 25 DESCRIPCIÓN DE UN MODO DE REALIZACIÓN

El procedimiento que proponemos comienza con la obtención de una muestra de sangre en aquellos individuos con sospecha de cáncer de pulmón; ésta es una prueba de fácil realización lo que permitiría su inclusión en cualquier revisión clínica rutinaria. Para la obtención del suero se recogen estas muestras en tubos con EDTA y se centrifugan a 2000g durante 15 minutos. El  
30 suero así obtenido se conserva a  $\leq -20^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación de las proteínas mencionadas.

Los niveles circulantes de sCD26 y calprotectina se determinan mediante el empleo de inmunoensayos ELISA de tipo sándwich, comercialmente disponibles en las casas eBioScience y HyCult Biotechnology, que proporcionan placas de 96 pocillos recubiertas con un anticuerpo específico y todos los reactivos necesarios. Los ensayos se realizan de acuerdo a las  
35 recomendaciones del fabricante, siendo el protocolo general idéntico en ambos: la muestra de suero convenientemente diluida se añade a la placa de ELISA y se incuba para permitir la unión de la proteína a su anticuerpo. La adición de un segundo anticuerpo marcado con biotina y que reconoce la proteína en otro epítipo diferente completa el sándwich. La cuantificación

espectrofotométrica se consigue mediante el acoplamiento de una reacción enzimática colorimétrica; así, a continuación de la biotina se añade a la placa estreptavidina conjugada con peroxidasa y en un último paso el sustrato de la enzima peroxidasa obteniendo un producto coloreado. La reacción se para mediante la adición de una sustancia ácida a la placa de ELISA.

- 5 Una vez finalizada la reacción, la lectura de la absorbancia se lleva a cabo en un lector de placas con filtro de 450 nm y corrección de 570 nm si fuera necesario.

Las concentraciones de sCD26 y calprotectina, expresadas ambas en ng/mL, se calculan a partir de una curva patrón que relaciona los datos de absorbancia de un conjunto de estándares con su concentración conocida.

- 10 La valoración de los niveles de sCD26 y calprotectina en los pacientes de CP y en el grupo control formado por sujetos sanos y sujetos con afecciones benignas (neumonía) muestra que ambos niveles son significativamente diferentes en los pacientes con CP respecto al resto. Para el sCD26, los niveles medios en pacientes con CP fueron de 375,42 ng/mL (136-1192 ng/mL), lo que supone un descenso significativo en referencia al grupo control con valores medios de
- 15 487,37 ng/mL (122-988 ng/mL). La calprotectina, por el contrario, experimenta un incremento de sus niveles asociada a la presencia de CP, pasando los niveles medios de 150,42 ng/mL (33,13-421,23 ng/mL) en el grupo control a 238,33 ng/mL (48,33-482,89 ng/mL). En cuanto a su capacidad de discriminación, el valor de AUC fue de 0,698 (95% CI: 0,608-0,789) y 0,765 (95% CI: 0,68-0,851) para sCD26 y calprotectina, respectivamente.
- 20 Mediante regresión logística multivariante se obtiene la probabilidad de padecer cáncer de pulmón, en función de la valoración conjunta de ambos marcadores, utilizando la siguiente expresión:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = -0.583 + 0.012CALPROTECTINA - 0.003CD26$$

donde  $p$  es la probabilidad de presentar Cáncer de Pulmón

- 25 Este modelo que considera ambas moléculas como un marcador combinado mejora las capacidades individuales de discriminación, obteniéndose una AUC de 0,804 (95% CI: 0,722-0,885). A su vez, este modelo permite seleccionar un punto de corte que resulte en los parámetros óptimos de sensibilidad y especificidad. Así, a un individuo al que se le hayan determinado las concentraciones de ambos marcadores:
- 30
- Si presenta una probabilidad > 0,52 (punto de corte óptimo), se considera un valor positivo de la prueba y con una probabilidad de padecer cáncer de pulmón del 81% (sensibilidad).
  - Una probabilidad inferior a ese valor clasifica a la prueba como negativa y con una probabilidad del 79% (especificidad) el individuo no presentará un cáncer de pulmón.
- 35 Las estimaciones de AUC, sensibilidad y especificidad realizadas en la presente invención han sido corregidas usando técnicas de validación cruzada, específicamente mediante *leave-one-out-cross-validation* (LOOCV), para evitar el optimismo esperable al ajustar y predecir en el

mismo conjunto de datos. Esto garantiza que los resultados obtenidos en nuestra muestra poblacional sean aplicables a nuevos individuos.

5 El interés de la presente invención radica en la distinción del cáncer de pulmón de sujetos control (individuos sanos o con enfermedades benignas de pulmón), en función de los niveles de ambos marcadores, pero esta combinación es superior en términos de eficiencia cuando es evaluada frente a un grupo control considerando únicamente individuos sanos. En esta situación las AUC obtenidas son de 0,788 (95% CI: 0,694-0,882) para sCD26 y 0,828 (95%CI: 0,733-0,923) para calprotectina, con una AUC combinada de 0,862 (95%CI: 0,777-0,947), alcanzando valores de sensibilidad y especificidad del 83 y 87%, respectivamente.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante test en suero humano que comprende la determinación de la concentración en suero de las proteínas sCD26 y calprotectina.
- 5 2. Procedimiento para el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante test en suero humano, según reivindicación 1, que se caracteriza por determinar la concentración de las proteínas sCD26 y calprotectina, mediante inmunoensayos ELISA tipo sándwich.
- 10 3. Procedimiento para el diagnóstico de cáncer de pulmón mediante test en suero humano, según reivindicaciones 1-2, que consiste en la utilización conjunta de la determinación de la concentración de sCD26 y calprotectina, y la comparación de los valores obtenidos con un punto de corte seleccionado, de 0.52, por encima del cual un individuo es probable que sea diagnosticado con cáncer de pulmón, y por debajo del cual el diagnóstico de malignidad sería infrecuente.