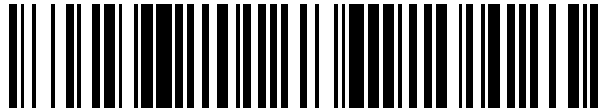


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 618**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11794755 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 2652504**

54 Título: **Método para discriminar entre carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada**

30 Prioridad:

14.12.2010 EP 10194916

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

04.03.2015

73 Titular/es:

**APOSCIENCE AG (100.0%)
Rauhensteingasse 4/3
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es:

ANKERSMIT, HENDRIK JAN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 530 618 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

Método para discriminar entre carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada

- 5 La presente invención se refiere a un método para discriminar entre carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada en un individuo que padece carcinoma pulmonar.

El cáncer de pulmón es el cáncer más frecuente en términos de mortalidad mundial. Se estima que la tasa de incidencia es de 1,2 millones, con una tasa de mortalidad de 1,1 millones de casos al año en todo el mundo. Es, de lejos, el cáncer más habitual en hombres y el segundo tumor más maligno en mujeres después del cáncer de mama.

El pronóstico del cáncer de pulmón ha mejorado poco en los últimos 20 años y una gran parte de los casos de cáncer recién descubiertos aún tiene un desenlace fatal. La supervivencia a 5 años actualmente es del 10 % en hombres y del 14 % en mujeres, pero depende enormemente del momento del diagnóstico. Las tasas de supervivencia a 5 años del 29-43 % en fase local se enfrentan por tanto a tasas de supervivencia del 11-16 % en fase regional y del 1-2 % en fase distante.

El incremento del cáncer de pulmón al resto de mal pronóstico muestra importancia de enfoques adecuados para la prevención primaria, la detección temprana y el diagnóstico. Mediante la prevención eficaz, en ninguna otra forma de cáncer se podrían evitar tantas muertes como en el cáncer de pulmón.

Los pacientes que padecen cáncer de pulmón se pueden tratar de diversas maneras que incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia y sus combinaciones. La cirugía es el tratamiento principal para pacientes con cáncer en fase temprana que tienen buena salud general. El objetivo de la cirugía es eliminar completamente todas las células cancerígenas y así proporcionar una cura. Incluso si el cáncer reaparece después del intento por eliminarlo, el cáncer recurrente con frecuencia se puede eliminar en una segunda operación. La radioterapia se puede aplicar como tratamiento primario, antes de la cirugía para reducir el cáncer, o después de la cirugía para eliminar cualquier célula cancerígena que permanezca en la zona tratada o que se haya extendido a otras zonas del cuerpo. La quimioterapia supone el uso de fármacos que son tóxicos para las células cancerígenas. Los fármacos normalmente se administran mediante inyección directa en vena o a través de un catéter situado en una vena grande. Administrada con frecuencia después de cirugía para deshacerse de pequeños grupos de células cancerígenas que puedan quedar, la quimioterapia también puede retrasar el crecimiento del cáncer y aliviar los síntomas en pacientes que no pueden someterse a cirugía.

35 Con el fin de aplicar el tratamiento óptimo a los pacientes que padecen cáncer de pulmón es crucial conocer hasta qué fase ha evolucionado la enfermedad. Si un paciente padece carcinoma pulmonar en fase temprana, la cirugía combinada con otras terapias es el método elegido para eliminar el cáncer del cuerpo de dicho paciente. Si el paciente es diagnosticado con carcinoma pulmonar en estado avanzado, la cirugía no será el método principal para tratar dicho paciente. En ese caso se han de aplicar otros métodos.

40 Si fallan los síntomas clínicos tempranos, la detección temprana del cáncer de pulmón únicamente se puede conseguir mediante ensayos de detección. Tecnologías tales como tomografía computarizada espiral (CT) y broncoscopia de autofluorescencia pueden detectar cánceres de pulmón hasta un grado submilimétrico. No obstante, las grandes variaciones en el riesgo de cáncer de pulmón, incluso entre fumadores de larga duración, hacen de estas tecnologías sensibles que no sean prácticas ni rentables como herramientas de detección en la población general. La aplicación de un filtro para identificar fumadores con un alto riesgo de cáncer de pulmón puede mejorar el valor predictivo positivo de estas herramientas de detección. Un biomarcador sanguíneo es un filtro atractivo debido a que la sangre es fácilmente accesible y las mediciones se pueden repetir con el tiempo.

50 Diversos estudios han demostrado que la expresión de diferentes biomarcadores es frecuente en líneas celulares de cáncer de pulmón y muchos autores han considerado la presencia de estos marcadores en la sangre como un índice de la extensión de la enfermedad, el pronóstico y la respuesta a terapia. Algunos marcadores tumorales (NSE, cromogranina, CEA, TPA y CYFRA 21-1) se han evaluado en muchos pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) así como carcinoma pulmonar de células no pequeñas (NSCLC). Qi y col. (2005) desvelan la HSP70 como biomarcador específico de la estadificación del cáncer de pulmón. No obstante, el diagnóstico y seguimiento de esta patología aún no son satisfactorios.

Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos para discriminar entre diversas fases del cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere a un método para discriminar entre el carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada en un individuo que padece carcinoma pulmonar como se reivindica.

5 Las proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins - HSP) clasificadas en familias por sus pesos moleculares son moléculas muy conservadas cuya expresión se incrementa en la mayoría de células sometidas a estrés. De hecho, están implicadas en diversas funciones relacionadas con la viabilidad celular y la protección celular. Entre otras funciones, también se sabe que las HSP son necesarias para la división celular.

10 El patrón de expresión en cáncer con frecuencia es diferente del que se observa en células normales: con mayor frecuencia algunas HSP inducibles por estrés se expresan mucho y de forma constitutiva. La expresión exacerbada de algunas HSP se ha documentado en varios cánceres humanos, incluyendo el cáncer de pulmón.

15 Resulta que la determinación de HSP27 en una muestra que se puede obtener de un paciente que padece carcinoma pulmonar permite diferenciar entre las diversas fases de dicha enfermedad, lo que permite al facultativo aplicar el mejor método para el tratamiento del paciente. El nivel de HSP27 en pacientes que padecen carcinoma pulmonar en fase avanzada es significativamente superior que en pacientes que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana. Este último grupo de pacientes muestra un nivel de HSP27 significativamente superior que individuos sanos.

20 Es importante que el facultativo conozca si un paciente padece carcinoma pulmonar en fase temprana o avanzada. Como norma, los pacientes que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana se pueden tratar mediante otros métodos que los pacientes que padecen carcinoma pulmonar en fase avanzada. Normalmente, los pacientes que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana aún se pueden tratar con métodos quirúrgicos mientras que los
25 pacientes que padecen carcinoma pulmonar en fase avanzada se tratan mediante otros métodos.

"Individuos de control con carcinoma pulmonar en fase temprana" e "individuos de control con carcinoma pulmonar en fase avanzada" se refieren a un grupo de individuos a los que se les ha diagnosticado que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada. Estos grupos de individuos comprenden al menos 5, preferentemente al
30 menos 10, más preferentemente al menos 20, incluso más preferentemente al menos 30 individuos, todos ellos a los que se les ha diagnosticado que padecen cáncer de pulmón en las respectivas fases.

Con frecuencia se sospecha de cáncer de pulmón después de que se encuentre una mancha anómala en una radiografía torácica realizada para evaluar la tos o dolor de pecho.

35 Cuando se sospecha de cáncer de pulmón, en primer lugar se realizará un examen clínico y físico exhaustivo. Esto se realiza para evaluar síntomas y factores de riesgo para el cáncer de pulmón y buscar cualquier signo físico que sugiera cáncer de pulmón. Estos pueden incluir cambios en el carácter de la tos, ruidos pulmonares anómalos, hemoptisis, disnea o ganglios linfáticos agrandados.

40 La radiografía torácica suele ser la primera prueba que se realiza para evaluar cualquier preocupación basada en un examen clínico y físico cuidadoso. Esta puede mostrar una masa en los pulmones o ganglios linfáticos agrandados. Algunas veces la radiografía torácica es normal y son necesarias pruebas adicionales para buscar un cáncer de pulmón sospechoso. Incluso si se encuentra una masa, estas no siempre son cancerosas y son necesarios estudios
45 adicionales.

Con frecuencia un escáner CT es la segunda etapa después de obtener una radiografía torácica anómala, o para evaluar síntomas molestos en aquellos con una radiografía torácica normal.

50 La obtención de imágenes de fusión de CT/PET combina la tecnología del escáner CT con la tecnología del escáner PET (tomografía por emisión de positrones). Los escáneres PET suponen la inyección de un radiofármaco de base glucosídica, que viaja a través del cuerpo y es captado por órganos y tejidos metabólicamente activos. El escáner PET se usa para detectar células cancerosas en el cuerpo y el escáner CT proporciona imágenes detalladas que determinan la localización y el tamaño del cáncer. Este tipo de escáner difiere de los demás en el sentido de que
55 define tumores que están creciendo activamente.

Después de que, basándose en las imágenes, se sospeche de cáncer de pulmón, es necesaria una muestra de tejido para confirmar el diagnóstico y determinar el tipo de cáncer. El esputo citológico es la forma más sencilla de conseguir esto, pero su uso está limitado a aquellos tumores que se extienden hacia las vías aéreas. El esputo

citológico no siempre es preciso y puede pasar por alto algunas células cancerígenas.

En el caso de procesos centrales localizados, el diagnóstico y la histología se pueden evaluar mediante broncoscopia, biopsia de lesiones endobronquiales, lavado broncoalveolar y biopsia con aguja transbronquial.

5

Si el tumor no se puede alcanzar mediante broncoscopia o procedimientos similares, se puede realizar una aspiración con aguja fina (FNA) o toracoscopia asistida por vídeo (VATS). Así se inserta una aguja hueca a través de la pared torácica (FNA), respectivamente se inserta un toracoscopio a través de pequeñas incisiones, para tomar una muestra del tumor.

10

Una vez que se realiza el diagnóstico de cáncer de pulmón, el equipo oncológico determina si el paciente es candidato para cirugía revisando los estudios de imágenes (por ejemplo, rayos X, escáner CT, escáner óseo) para descartar metástasis distante.

15 Si no hay evidencias de metástasis, a continuación el paciente se puede someter a mediastinoscopia, una inspección quirúrgica del mediastino.

Existen varios tipos de cánceres de pulmón, y es importante determinar la forma del cáncer de pulmón para seleccionar las mejores opciones de tratamiento. La clasificación es realizada por un patólogo mediante criterios con microscópico óptico según la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

20

La elección del tratamiento, así como el pronóstico para un cáncer de pulmón, puede variar enormemente dependiendo tanto del tipo de cáncer particular como de la fase en la que se diagnostica.

25 "Intervalo de referencia" como se usa en este documento es el intervalo de niveles de HSP27 dentro de los cuales se puede encontrar al menos el 80 %, preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente al menos el 95 %, incluso más preferentemente al menos el 99 %, en particular el 100 % de los niveles de HSP27 determinados en los individuos de control anteriormente mencionados. El "intervalo de referencia" comprende un nivel mínimo y máximo de HSP27. Estos niveles definen los límites superior e inferior del "intervalo de referencia".

30

Como se usa en este documento "por debajo del intervalo de referencia" significa que el nivel determinado está por debajo o es inferior al "intervalo de referencia" en su conjunto. En otras palabras, el nivel determinado está por debajo o es inferior al nivel mínimo o inferior de HSP27 del "intervalo de referencia".

35 Como se usa en este documento "por encima del intervalo de referencia" significa que el nivel determinado está por encima o es superior al "intervalo de referencia" en su conjunto. En otras palabras, el nivel determinado está por encima o es superior al nivel máximo o superior de HSP27 del "intervalo de referencia".

"Dentro del intervalo de referencia" significa que los niveles de HSP27 determinados de acuerdo con la presente invención están dentro del intervalo de referencia como se ha definido anteriormente.

40

En un método alternativo también es posible definir niveles límite. Dichos niveles límite sirven como límite para indicar si un paciente que tiene niveles de HSP27 definidos por encima o por debajo de dichos valores límite padece carcinoma pulmonar en fase temprana o avanzada. Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un método para discriminar entre carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada en un individuo que padece carcinoma pulmonar que comprende las etapas de

45

a) suministro de una muestra de un individuo que padece carcinoma pulmonar,

50

b) determinación del nivel de proteína de choque térmico 27 (HSP27) en dicha muestra,

c) comparación del nivel determinado de HSP27 en dicha muestra con niveles límite de HSP27 en individuos sanos (es decir, individuos que no padecen cáncer o cualquier otra enfermedad asociada a una mayor tasa de expresión de HSP27) y/o individuos que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana y/o avanzada, dichos valores límite que distinguen entre carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada,

55

d) diagnóstico de carcinoma pulmonar en fase temprana en dicho individuo cuando el nivel de HSP27 en la muestra a) está al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 20 % por debajo del valor límite para individuos que padecen carcinoma pulmonar en fase avanzada y/o por debajo del valor límite de

individuos sanos, y el diagnóstico de carcinoma pulmonar en fase avanzada en dicho individuo cuando el nivel de HSP27 en la muestra a) está al menos un 5 %, preferentemente al menos un 10 %, más preferentemente al menos un 20 %, por encima del valor límite para individuos que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana.

- 5 Estos valores límite se pueden determinar determinando el nivel promedio o la mediana de HSP27 en al menos 5, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 20, incluso más preferentemente al menos 30 individuos todos ellos a los que se les ha diagnosticado que padecen cáncer pulmonar en las respectivas fases o individuos sanos. El límite para el diagnóstico de carcinoma pulmonar en fase temprana puede ser el nivel promedio o la mediana de HSP27 más bajo determinado en individuos de control que padecen carcinoma pulmonar en fase
- 10 avanzada como se ha definido anteriormente o el nivel promedio o la mediana de HSP27 más alto encontrado en una serie de individuos sanos. El límite para el diagnóstico de carcinoma pulmonar en fase avanzada puede ser el nivel promedio o la mediana de HSP27 más alto determinado en individuos de control que padecen carcinoma pulmonar en fase temprana como se ha definido anteriormente.
- 15 De acuerdo con la presente invención, el carcinoma pulmonar en fase temprana es la fase Ia a IIb y el carcinoma pulmonar en fase avanzada es la fase IIIa a IV como define la Association for the Study of Lung Cancer (IASCL).

La definición de las fases del carcinoma pulmonar es esencial para decidir qué tipo de tratamiento se ha de aplicar. Así ha dado lugar al desarrollo de un sistema de clasificación de fases aceptado de forma universal para la mayoría de tumores. La Union Internationale Contre le Cancer (UICC) y el American Joint Committee on Cancer (AJCC)

20 sirven como organismos oficiales que definen, revisan periódicamente, y redefinen los sistemas de clasificación de fases.

En 1998, la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) creó un comité internacional de

25 estadificación, el International Staging Committee (ISC), de miembros multidisciplinarios y recopilaron 68.463 pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas y 13.032 pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas, registrados o diagnosticados entre 1990 y 2000, cuyos expedientes tenían la información adecuada para analizar la clasificación del tumor, nodo, metástasis (TNM). Se analizaron los descriptores T, N, M y se propusieron recomendaciones para cambios en la séptima edición de la clasificación TNM en base a diferencias en la

30 supervivencia (Goldstraw y col., J Thorac Oncol. Agosto 2007; 2(8):706-714).

UICC TNM Classification of Malignant Tumors - 7th edition (UICC (International Union Against Cancer) TNM Classification of Malignant Tumors - 7th edition. Sobin LH, Gospodarowicz M, Witte-kind C ISBN: 978-1-4443-3241-4, Dec 2009)

35

| | | | |
|------------------|--------------------|--------|----|
| Carcinoma oculto | TX | N0 | M0 |
| Fase 0 | Tis | N0 | M0 |
| Fase IA | T1a, b | N0 | M0 |
| Fase IB | T2a | N0 | M0 |
| Fase IIA | T1a, T1b, T2a | N1 | M0 |
| | T2b | N0 | M0 |
| Fase IIB | T2b | N1 | M0 |
| | T3 | N0 | M0 |
| Fase IIIA | T1a, T1b, T2a, T2b | N2 | M0 |
| | T3 | N1, N2 | M0 |
| | T4 | N0, N1 | M0 |
| Fase IIIB | T4 | N2 | M0 |
| | cualquier T | N3 | M0 |

| | | | |
|---------|-------------|-------------|-------------|
| Fase IV | cualquier T | cualquier N | cualquier M |
|---------|-------------|-------------|-------------|

T (tumor primario)

- TX El tumor primario no se puede evaluar, o confirmación del tumor por la presencia de células malignas en el esputo o lavados bronquiales pero sin visualización mediante imágenes o broncoscopia
- T0 No hay evidencia de tumor primario
- Tis Carcinoma *in situ*
- T1 Tumor inferior o igual a 3 cm en su dimensión mayor, rodeado de pulmón o de pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal al bronquio lobar (es decir, no en el bronquio principal)
- 10 T1a Tumor inferior o igual a 2 cm en su dimensión mayor
- T1b Tumor > 2 cm pero inferior o igual a 3 cm en su dimensión mayor
- T2 Tumor > 3 cm pero inferior o igual a 7 cm o tumor con cualquiera de las siguientes características: compromete el bronquio principal, superior o igual a 2 cm distal a la carina; invade la pleura visceral; asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero que no compromete todo el pulmón
- 15 T2a Tumor > 3 cm pero inferior o igual a 5 cm en su dimensión mayor
- T2b Tumor > 5 cm pero inferior o igual a 7 cm en su dimensión mayor
- T3 Tumor > 7 cm o que invade directamente cualquiera de los siguientes: pared torácica (incluyendo tumores del surco superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal (< 2 cm distal a la carina pero sin comprometer la carina; o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva de todo el pulmón o ganglio(s) tumoral(es) separado(s) en el mismo lóbulo)
- 20 T4 Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de los siguientes: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral, carina, ganglio(s) tumoral(es) separado(s) en un lóbulo ipsilateral diferente

25 *N (Ganglios linfáticos regionales)*

- NX Los ganglios linfáticos regionales no se pueden evaluar
- N0 No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
- N1 Metástasis hacia los ganglios linfáticos peribronquiales ipsilaterales y/o hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonares comprometidos por extensión directa del tumor primario
- 30 N2 Metástasis hacia los ganglio(s) linfático(s) del mediastino ipsilateral y/o subcarinal(es)
- N3 Metástasis hacia los ganglio(s) linfático(s) del mediastino contralateral, hiliar(es) contralateral(es), escaleno ipsilateral o contralateral, o supracavicular(es)

35 *M (metástasis distante)*

- MX No se puede evaluar la presencia de metástasis distante
- M0 No hay metástasis distante
- M1 Metástasis distante
- 40 M1a Nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en un lóbulo contralateral; ganglios pleurales o pleural maligno o derrame pericárdico

M1b Metástasis distante

45 Antes de hacer recomendaciones de tratamiento para un paciente determinado, se debe evaluar el tamaño del tumor, el estado de los ganglios linfáticos, y la posible presencia de metástasis. El cáncer de pulmón con frecuencia se extiende hacia los ganglios que drenan el hilio y el mediastino. La afectación mediastínica (N2) pone al paciente en una fase superior y puede hacer que el tumor no sea operable, si se encuentra próximo a estructuras vitales del mediastino.

50 La estadificación clínica se basa en el tamaño del ganglio linfático según lo determinado mediante CT. Hasta hace relativamente poco, el uso de un límite para ganglios normales de 10 a 15 mm proporcionaba sensibilidades y especificidades para detectar metástasis en los ganglios de sólo el 40 al 70 %, pero este enfoque era la única opción no invasiva. Incluso lesiones T1 periféricas pequeñas, que muchas veces se considera que están asociadas a bajo riesgo de extensión al mediastino con frecuencia afectan a estos ganglios.

55

La tomografía por emisión de positrones (PET) se ha convertido en una prueba no invasiva importante para la

evaluación del mediastino. Este enfoque se basa en el principio de que los tumores provocan un aumento de la captación de glucosa radiomarcada de la que se pueden obtener imágenes. Los datos retrospectivos de varios ensayos sugieren una sensibilidad y especificidad del 85 % y 88 %, respectivamente, para la estadificación mediastínica del cáncer de pulmón con el uso de PET y los resultados de un estudio prospectivo apoyan estos hallazgos.

La combinación de PET y CT parece tener una sensibilidad y especificidad incluso superiores que el uso de cualquiera de los métodos por separado y se debe considerar seriamente el uso de ambos como parte de la evaluación preoperatoria.

El estándar de referencia para la evaluación del mediastino es la biopsia de los ganglios linfáticos por medio de broncoscopia o, si es necesario, la mediastinoscopia más invasiva. Para distinguir una enfermedad potencialmente curable de una incurable, los estudios radiológicos que indican la presencia de enfermedad del mediastino deben ir seguidos de biopsia de los ganglios identificados antes de que el tumor se considere inoperable. No obstante, con el método de la presente invención no es necesario realizar la biopsia. Además, el método de la presente invención proporciona datos fiables en un tiempo reducido.

La resección quirúrgica completa se considera el tratamiento elegido para individuos con carcinoma pulmonar de células en fase I-II. La cirugía debe incluir resección (neumonectomía o lobectomía) y el mapeado del ganglio del mediastino. Si el tumor es operable y los ganglios del mediastino se encuentran afectados se debe realizar una disección completa de los ganglios linfáticos.

Los tumores en fase III o aquellos que invaden estructuras vitales con frecuencia se describen como no operables o marginalmente operables. Durante muchos años, la base de tratamiento de estos tumores ha sido la radioterapia (dosis total, 60 Gy). El riesgo de recidiva local se redujo, pero la tasa de supervivencia a largo plazo seguía siendo pobre (5 por ciento). Los resultados de varios estudios de fase 2 proporcionó el apoyo preliminar para la adición de quimioterapia a la radioterapia, y un ensayo histórico de este enfoque combinado demostró mayores tasas de supervivencia a tres años (23 por ciento en comparación con el 11 por ciento) y supervivencia a largo plazo.

En la actualidad, prácticamente ningún paciente se curará con una enfermedad tan avanzada como en fase IIIB o IV. Aunque la quimioterapia es la columna vertebral del tratamiento para la enfermedad metastásica, las tasas de respuesta son bajas, y los tiempos de supervivencia pobres. En el pasado, muchos pacientes con carcinoma de pulmón avanzado no recibieron ningún tratamiento, ya que se pensaba que la toxicidad de la terapia no compensaba los beneficios. Sin embargo ahora está claro que el tratamiento puede ser beneficioso. Varios meta-análisis han documentado ganancias moderadas en la supervivencia cuando se utiliza la quimioterapia, en comparación con la mejor atención de apoyo. Los incrementos en la mediana de supervivencia parecen estar en el intervalo de dos a cuatro meses, y los incrementos en la tasa de supervivencia a un año parecen oscilar entre el 10 y el 20 por ciento.

Según una realización preferida de la presente invención, la muestra es una muestra de sangre, preferentemente una muestra de suero o plasma.

Resulta que los niveles de HSP27 se pueden determinar en una muestra de sangre o en una fracción de la misma. Esto es ventajoso en particular porque permite un diagnóstico rápido y fiable.

Los métodos para determinar el nivel de HSP27 en una muestra son muy conocidos en la técnica. En una realización preferida de la presente invención el nivel de HSP27 se determina mediante un inmunoensayo, preferentemente mediante un inmunoensayo competitivo o no competitivo, más preferentemente mediante una transferencia de Western, un ensayo de inmunoadsorción (ELISA), un inmunoensayo de flujo lateral o un radioinmunoensayo (RIA).

Los ensayos mencionados anteriormente implican moléculas que son capaces de unirse específicamente a HSP27. Dichas moléculas pueden ser, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos, que todavía son capaces de unirse a HSP27.

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, se refiere a anticuerpos monoclonales y policlonales o fragmentos de los mismos capaces de unirse a un antígeno. También son útiles otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos tales como fragmentos Fab o Fv, así como fragmentos seleccionados mediante el cribado de bibliotecas de presentación de fagos, y similares en los métodos descritos en este documento.

Los métodos para la preparación de anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales están bien establecidos (Harlow E. y col., 1988. Antibodies. Nueva York: Cold Spring Harbour Laboratory). Los anticuerpos policlonales se generan en diversas especies, incluyendo pero no limitado a ratón, rata, conejo, cabra, oveja, burro, camello y caballo, usando inmunización convencional y procedimientos de obtención de sangre. La sangre de animales con títulos altos se fracciona por procedimientos rutinarios selectivos de precipitación con sales, tales como precipitación con sulfato de amonio y fracciones de inmunoglobulina específica que se separan por cromatografía de afinidad en columnas sucesivas de Proteína-A-Sepharose y leptina-Sepharose, según métodos convencionales. Los anticuerpos policlonales y monoclonales purificados a continuación se caracterizan para su especificidad. Dicha caracterización se realiza mediante métodos convencionales usando proteínas marcadas con un trazador tal como un radioisótopo o biotina en competición con niveles crecientes de posibles reactivos cruzados sin marcar para la unión al anticuerpo. Los estudios de unión se evalúan adicionalmente por otros métodos convencionales bien establecidos tales como electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (SDS-PAGE) y métodos de inmunotransferencia de Western en condiciones reductoras y no reductoras.

Los anticuerpos monoclonales se preparan de acuerdo con procedimientos convencionales de laboratorio bien establecidos. Esta técnica se realiza mediante la extracción de células del bazo de animales inmunizados e inmortalizando las células productoras de anticuerpos mediante fusión con células de mieloma o mediante transformación con el virus de Epstein-Barr, y a continuación la detección de clones que expresan el anticuerpo deseado, aunque también se utilizan otras técnicas conocidas en la materia. Los anticuerpos también se producen por otros métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo pero no limitado a la inmunización con ADN específico.

Preferentemente, los inmunoensayos usados se basan en técnicas que utilizan anticuerpos de captura, que son capaces de unirse específicamente a un antígeno de interés, o antígenos unidos sobre un soporte sólido. El anticuerpo de captura se acopla o se une a diversos soportes de fase sólida utilizando métodos de unión convencionales covalentes o no covalentes, dependiendo de los requisitos analíticos y/o de separación de fase sólida necesarios. El soporte sólido se encuentra en forma de tubos de ensayo, perlas, micropartículas, papel de filtro, membranas, filtros de vidrio, partículas magnéticas, virutas de vidrio o de silicio u otros materiales y enfoques conocidos para los expertos en la materia. El uso de micropartículas, en particular partículas magnetizables, que se han recubierto directamente con el anticuerpo (anticuerpo de captura de partículas magnéticas) o partículas que se han marcado con un fijador universal (por ejemplo, avidina o un anticuerpo dirigido contra una especie) es útil para acortar significativamente el tiempo de incubación del ensayo. Estos, junto con otros enfoques alternativos conocidos en la técnica, permiten la terminación del ensayo en cuestión de minutos sin limitar la sensibilidad requerida.

El anticuerpo de detección, que es capaz de unirse específicamente al antígeno de interés, que se utiliza para la detección del antígeno se acopla directamente a una molécula indicadora, o se detecta indirectamente mediante un sistema de detección secundario. Este último se basa en varios principios diferentes conocidos en la técnica, incluyendo el reconocimiento del anticuerpo por un anticuerpo marcado dirigido contra una especie y otras formas de sistemas de combinación y sistemas de detección de la amplificación de la señal (por ejemplo, la tecnología de biotina-estreptavidina) inmunológicos o no inmunológicos. El enfoque de amplificación de la señal se utiliza para aumentar significativamente la sensibilidad del ensayo y su bajo nivel de reproducibilidad y rendimiento. El marcador que se utiliza para el acoplamiento directo o indirecto de anticuerpos es cualquier molécula informadora detectable. Los ejemplos de marcadores adecuados son los ampliamente utilizados en el campo de los sistemas de detección inmunológicos y no inmunológicos, tales como fluoróforos, marcadores luminiscentes, complejos metálicos y marcadores radiactivos, así como restos que podrían ser detectados por otros reactivos adecuados tales como enzimas, o diversas combinaciones de marcadores directos o indirectos tales como enzimas con sustratos luminógenos.

El nivel de referencia de HSP27 en los individuos de control con carcinoma de pulmón en fase temprana preferentemente supone de 3000 a 4400 pg/ml, preferentemente de 3500 a 4200 pg/ml.

El nivel de referencia de HSP27 en los individuos de control con carcinoma de pulmón en fase avanzada preferentemente supone al menos 4600 pg/ml, preferentemente de 4600 a 6000 pg/ml, más preferentemente de 5000 a 5600 pg/ml.

El nivel de referencia de HSP27 en individuos sanos preferentemente alcanza un máximo de 2500 pg/ml, preferentemente de 500 a 2500 pg/ml, más preferentemente de 1000 a 2100 pg/ml.

Naturalmente, estos valores pueden variar dependiendo del método usado para determinar los niveles de HSP27.

Los niveles de HSP27 también se pueden utilizar para el seguimiento del progreso de un tratamiento. Los datos presentados en este documento también permiten el seguimiento del éxito del tratamiento de cáncer de pulmón. Se sabe que el nivel de HSP27 en individuos sanos es inferior que en pacientes que padecen carcinoma de pulmón. Un método para el seguimiento del progreso de un tratamiento puede comprender la determinación de la HSP27 en puntos de tiempo predefinidos durante el tratamiento. La reducción de los niveles de HSP27 indica que el tratamiento tiene éxito o efectos ventajosos sobre la salud del individuo a tratar.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante las siguientes figuras y el ejemplo.

La Fig. 1 muestra la determinación de HSP27 en muestras de suero de pacientes.

La Fig. 2 muestra la determinación de HSP70 en muestras de suero de pacientes.

La Fig. 3 muestra un modelo de regresión logística univariante.

Ejemplo:

Material y métodos

Se incluyeron un total de 187 pacientes y controles en este estudio de control de casos.

Voluntarios sanos sin ningún signo clínico de carcinoma de pulmón (n = 36), pacientes con carcinoma diagnosticados en una fase temprana (n = 63) y pacientes con carcinoma diagnosticados en una fase avanzada (n = 99) se evaluaron en tres grupos de estudio.

La clasificación de fase temprana y avanzada, respectivamente, se basa en el estado histológico y se ajusta al proyecto de estadificación del cáncer de pulmón de IASCL (Tsim S, y col. Respir Med 104 (2010): 1767-1774). La fase temprana incluye las fases Ia a IIb de IASCL, la fase avanzada incluye las fases IIIa a IV.

Las características de los pacientes están representadas en la Tabla 1:

| | Sano | Fase Ia - IIb | Fase IIIa - IV |
|--------------------------------|--------|---------------|----------------|
| N | 36 | 63 | 99 |
| Hombre/Mujer | 13/23 | 37/26 | 57/42 |
| Edad | 57,84 | 64,20 | 61,87 |
| Historial como fumador | | | |
| Nunca ha fumado | 66,7 % | 15,8 % | 9,9 % |
| Fumador | 33,30 | 84,2 % | 90,1 % |
| Histología | | | |
| Adenocarcinoma | | 61,9 % | 72,5 % |
| Carcinoma de células escamosas | | 25,4 % | 26,4 % |
| Carcinoma de células grandes | | 6,3 % | 1,1 % |
| Carcinoma neuroendocrino | | 6,3 % | 0,0 % |

Las muestras de sangre se recogieron en el momento de la primera admisión en el presente estudio. El suero se recogió después de la centrifugación y las alícuotas se mantuvieron congeladas a -80 °C hasta su posterior análisis.

Determinación de la proteína de choque térmico 27

Los niveles séricos de HSP27 se determinaron usando kits adaptados del enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) (Duoset IC; R & D Systems, EE.UU.).

5 Placas de microtitulación de noventa y seis pocillos se recubrieron durante la noche a 4 °C con anticuerpo de captura a una concentración de 1 µg/ml. Tras el bloqueo de las placas, las muestras de suero y proteína patrón se añadieron en diferentes concentraciones a los pocillos. Después de una etapa de lavado, se añadió un anticuerpo marcado con biotina a cada pocillo y se incubó durante 2 horas. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina-HRP. La reacción de color se consiguió usando tetrametilbencidina (TMB; Sigma, EE.UU.) y se detuvo mediante una
10 solución ácida de parada. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de ELISA.

Determinación de la proteína de choque térmico 70

Los niveles séricos de HSP70 se determinaron usando kits adaptados del enzimoimmunoanálisis de adsorción
15 (ELISA) (Duoset IC; R & D Systems, EE.UU.).

Placas de microtitulación de noventa y seis pocillos se recubrieron durante la noche a 4 °C con anticuerpo de captura a una concentración de 2 µg/ml. Tras el bloqueo de las placas, las muestras de suero y proteína patrón se añadieron en diferentes concentraciones a los pocillos. Después de una etapa de lavado, se añadió un anticuerpo
20 marcado con biotina a cada pocillo y se incubó durante 2 horas. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina-HRP. La reacción de color se consiguió usando tetrametilbencidina (TMB; Sigma, EE.UU.) y se detuvo mediante una solución ácida de parada. La densidad óptica se midió a 450 nm en un lector de ELISA.

Resultados

25 *Proteína de choque térmico 27*

Los niveles séricos de HSP27 fueron de 1751 pg/ml [\pm 113,31] (media [\pm SEM]) en los controles sanos, 3856 pg/ml [\pm 215,57] en pacientes con carcinoma diagnosticado en una fase temprana tal como se ha definido anteriormente y
30 5350 pg/ml [\pm 254,23] en pacientes con carcinoma diagnosticados en una fase avanzada como se ha definido anteriormente. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos (en cada caso, $p < 0,001$) (Fig. 1).

Proteína de choque térmico 70

35 La media de los niveles séricos de HSP70 fue de 451 pg/ml [\pm 41,19] (media [\pm SEM]) en los controles sanos, 679 pg/ml [\pm 53,93] en pacientes con carcinoma diagnosticado en una etapa temprana y 777 pg/ml [\pm 57,93] en pacientes con carcinoma diagnosticado en una fase avanzada. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles sanos y los dos grupos con cáncer ($p < 0,001$), pero no entre los dos grupos con carcinoma
40 diagnosticados en fases diferentes (Fig. 2).

Modelos de Regresión

En el modelo de regresión logística univariante que incluye sólo los voluntarios sanos y pacientes diagnosticados
45 con carcinoma de pulmón, la HSP27 tenía un área bajo la curva (AUC) en la curva de características de funcionamiento del receptor (ROC) de 0,920 (\pm 0,027; $p < 0,001$) (Fig. 3).

Discusión

50 Las proteínas de choque térmico juegan un papel clave en la protección celular y la viabilidad celular. También se sabe que son necesarias para la división celular y pueden contribuir a la proliferación celular.

Además de sus funciones de protección en el citosol, se ha comprobado que las HSP desempeñan un papel importante en la estimulación del sistema inmune cuando se encuentran en el espacio extracelular o en la
55 membrana plasmática. *In vitro*, se han detectado miembros de las familias HSP70 y HSP90 en el medio de células presentadoras de antígeno (APC). Aunque la función inmunológica de las HSP extracelulares y unidas a la membrana parece evidente, el mecanismo de transporte a la membrana plasmática, el anclaje a la membrana, y su exportación siguen siendo un misterio.

Varios mecanismos pueden explicar la liberación celular de HSP, incluyendo la exportación en el medio junto con otras proteínas que poseen dominios transmembrana que cumplen funciones de transporte, a través de la interacción directa con los componentes lipídicos, a través del mecanismo *flip-flop* tras su unión a fosfatidilserina o por necrosis.

5

En el medio extracelular se han encontrado HSP tales como HSP70, HSP90, y gp96.

En el presente ejemplo se pudo demostrar un incremento de HSP27 en muestras de suero tomadas del flujo de sangre periférica de pacientes con cáncer de pulmón. Además, estos resultados demuestran un aumento continuo de las concentraciones séricas de HSP27 con gravedad de la enfermedad.

10

Por lo tanto el contenido sérico de HSP27 ha demostrado potencial diagnóstico para determinar la aparición de cáncer de pulmón y puede servir como marcador para el diagnóstico y la predicción de la progresión de la enfermedad. Además, el nivel de HSP27 en el suero de pacientes con cáncer de pulmón puede servir de base para decidir la terapia, sobre todo cuando surge la pregunta de si es posible la cirugía curativa.

15

REIVINDICACIONES

1. Método para discriminar entre carcinoma pulmonar en fase temprana y avanzada en un individuo que padece carcinoma pulmonar que comprende las etapas de
- 5 a) determinación del nivel de proteína de choque térmico 27 (HSP27) en una muestra de un individuo que padece carcinoma pulmonar,
- b) comparación del nivel determinado de HSP27 en dicha muestra con un intervalo de referencia de HSP27 medido en muestras de individuos de control con carcinoma pulmonar en fase temprana y/o carcinoma pulmonar en fase avanzada,
- 10 c) diagnóstico de carcinoma pulmonar en fase temprana en dicho individuo cuando el nivel de HSP27 en la muestra a) está por debajo del intervalo de referencia de HSP27 en muestras de individuos de control con carcinoma pulmonar en fase avanzada o dentro del intervalo de referencia de individuos de control con carcinoma pulmonar en fase temprana y el diagnóstico de carcinoma pulmonar en fase avanzada cuando el nivel de HSP27 en la muestra a) está por encima del intervalo de referencia de HSP27 en muestras de individuos de control con carcinoma pulmonar de fase avanzada o dentro del intervalo de referencia de individuos de control con carcinoma pulmonar en fase avanzada
- 15 20
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el carcinoma pulmonar en fase temprana es la fase Ia a IIb y el carcinoma pulmonar en fase avanzada es la fase IIIa a IV como define la Association for the Study of Lung Cancer (IASCL).
- 25 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **caracterizado porque** la muestra es una muestra de sangre, preferentemente una muestra de suero o de plasma.
4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el nivel de HSP27 se determina mediante un inmunoensayo, preferentemente mediante un inmunoensayo competitivo o no competitivo, más preferentemente mediante una transferencia de Western, un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), un inmunoensayo de flujo lateral o un radioinmunoensayo (RIA).
- 30 5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el nivel de referencia de HSP27 en individuos de control con un carcinoma pulmonar en fase temprana supone de 3000 a 4400 pg/ml, preferentemente de 3500 a 4200 pg/ml.
- 35 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** el nivel de referencia de HSP27 en individuos de control con un carcinoma pulmonar en fase avanzada preferentemente supone al menos 4600 pg/ml, preferentemente de 4600 a 6000 pg/ml, más preferentemente de 5000 a 5600 pg/ml.

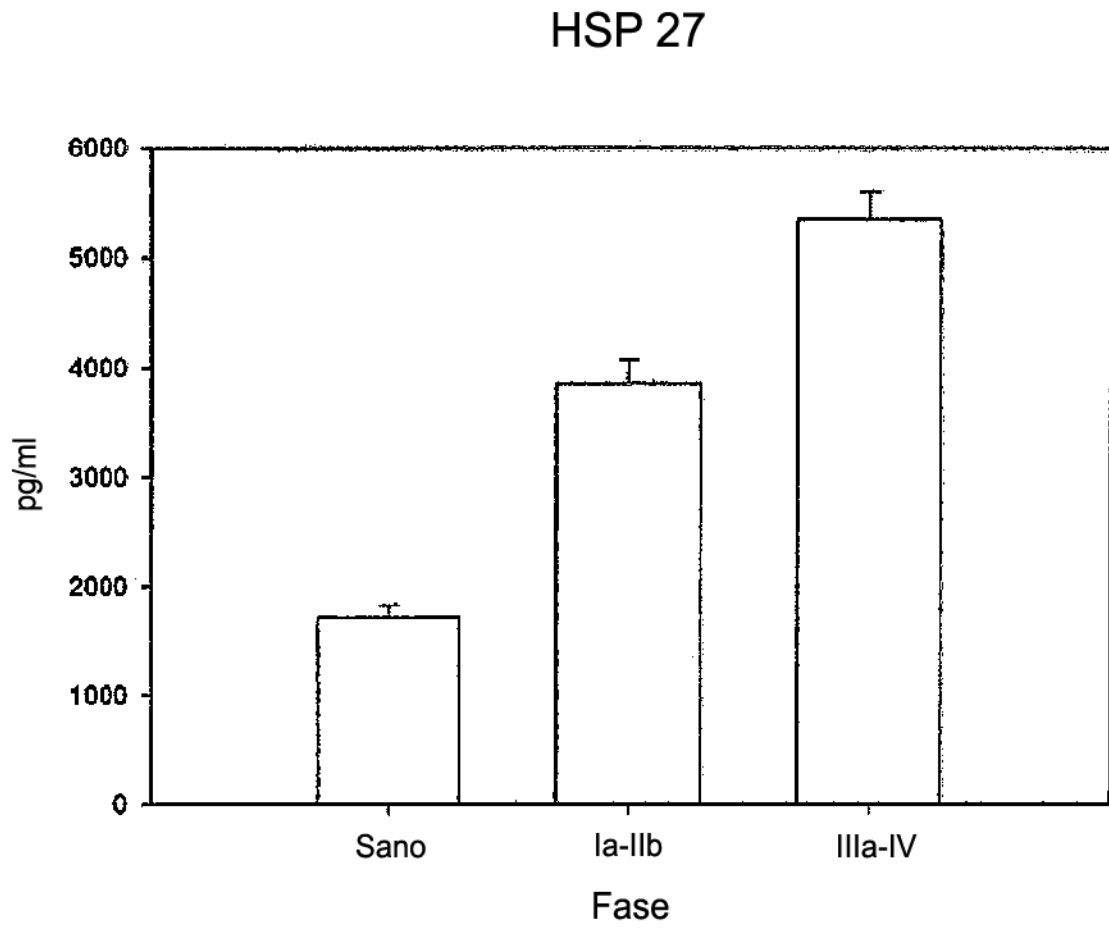


Fig. 1

HSP 70

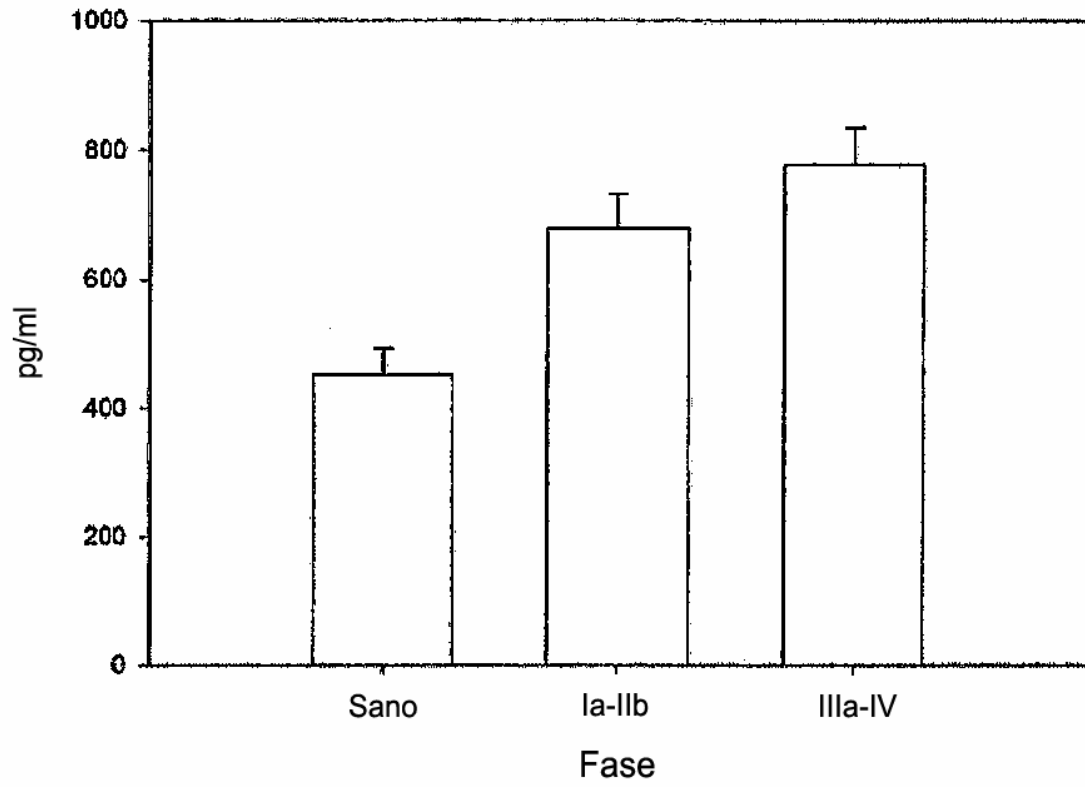


Fig. 2

Curva de ROC

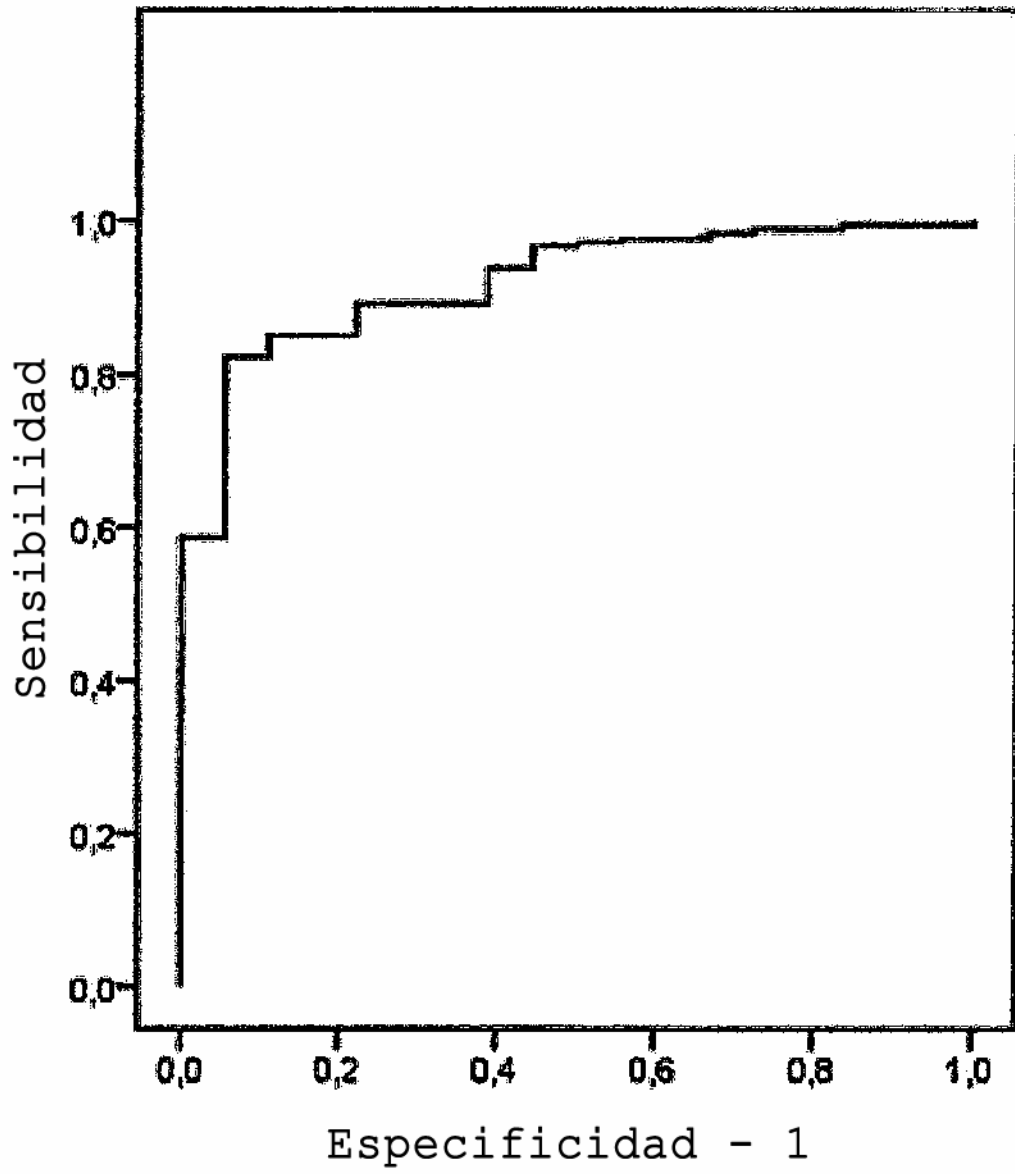


Fig. 3