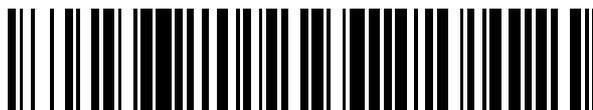


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 515**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2012 E 12702017 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2668503**

54 Título: **Biomarcadores combinatorios para aplicaciones clínicas en la gestión del paciente con cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

28.01.2011 US 201161437090 P

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

11.09.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GUERGOVA-KURAS, MARIANA;
KIEFFER, YANN;
MALDERES-BLOES, CAROLE;
KREMEURT, ALEXANDRA y
TAKACS, LASZLO**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 515 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

Biomarcadores combinatorios para aplicaciones clínicas en la gestión del paciente con cáncer de pulmón

5 La presente invención se refiere a la evaluación del cáncer de pulmón en una muestra de sangre usando una combinación de biomarcadores, denominados CYFRA 21-1 y glucoproteína alfa-2 rica en leucina (LRG-1). La medida de la combinación puede usarse para la detección temprana o para el seguimiento de pacientes que tienen cáncer de pulmón, incluyendo cáncer NSCLC, con una elevada sensibilidad y selectividad.

10 Antecedentes

El cáncer de pulmón es la causa más común de muerte por cáncer y cada día se diagnostican en todo el mundo 1,4 millones de nuevos casos. Más de dos tercios de los cánceres de pulmón se diagnostican en un estadio tardío, cuando aparecen los síntomas clínicos. La tasa de supervivencia general después del diagnóstico varía desde el 14 % en EE.UU. hasta el 1,1 % en algunas regiones de Asia (Stewart y Kleihues, 2003) y actualmente es muy baja debido al diagnóstico tardío de la enfermedad. Los métodos diagnósticos actuales se basan en técnicas de obtención de imágenes y procedimientos invasivos, tales como broncoscopia o biopsia (Rivera et al., 2003). Los pocos biomarcadores plasmáticos conocidos para el cáncer de pulmón, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de carcinoma de células escamosas (SCC) y enolasa específica de neuronas (NSE) carecen de la suficiente sensibilidad y especificidad (Kulpa et al., 2002) como para usarse como herramientas de diagnóstico temprano. Los esfuerzos actuales que usan tecnologías de descubrimiento de alto rendimiento siguen luchando para proporcionar biomarcadores de cáncer de pulmón fiables y fácilmente accesibles para su uso clínico (Zolg, 2006; Beane et al., 2009). Stieber et al., 2006 es una revisión del estado actual del conocimiento del uso clínico de marcadores basados en suero.

25 El análisis global del proteoma se ha visto obstaculizado por una diversidad de problemas metodológicos incluyendo el hecho de que las tecnologías de perfil proteómico basadas en espectrometría de masas están en general lejos de abarcar el rango dinámico necesario; no son adecuadamente sensibles y carecen de la suficiente reproducibilidad y rendimiento (Rifai et al., 2006). Los anticuerpos policlonales y monoclonales (mAb) proporcionan herramientas adecuadamente validadas para la caracterización y el análisis cuantitativo de las proteínas, pero se han dirigido principalmente a una serie de epítopos con baja complejidad (Gao, 2005; Knezevic, 2001). Las estrategias globales de proteómica de anticuerpos pretenden generar bibliotecas de anticuerpos para abarcar la mayoría o todas las proteínas individuales y sus epítopos inmunogénicos en cualquier proteoma complejo. La presentación en fago recombinante, bacteriana y viral representan estrategias para la generación global de anticuerpos pero han tenido un éxito limitado para dar como resultado bibliotecas capaces de detectar proteomas complejos con reactivos y cobertura de afinidad de suficiente calidad (Maneewatch, 2009; Houimel y Dellagi, 2009). The Human Protein Atlas (Uhlen, 2005) y otras grandes iniciativas, tales como NCI Clinical Proteomics Technology Initiative (Blow, 2007) se dirigen a la generación de bibliotecas exhaustivas para el mucho más complejo proteoma humano, usando ambas estrategias proteínas recombinantes como inmunógenos. El problema con las proteínas recombinantes es que no representan el estado natural de la proteína, carecen de modificaciones postraduccionales y de un plegado correcto, limitando de este modo el potencial de las bibliotecas obtenidas para elaborar perfiles de proteomas naturales.

35 Sumario

45 La presente divulgación se refiere a la evaluación o control del cáncer de pulmón ("LC") usando una combinación de biomarcadores de proteínas. Ésta divulga el uso de una proteína CYFRA en combinación bien con una de las siguientes proteínas o sus combinaciones: haptoglobina (HPT), alfa-1-antiquimotripsina (ACT), alfa-2 glucoproteína 1 rica en leucina (LRG-1), y factor de complemento 9 (C9), para detectar o controlar el cáncer de pulmón en sujetos humanos. Sorprendentemente, la solicitud demuestra que la medida de una cualquiera de estas combinaciones permite la detección temprana o el seguimiento de los pacientes que tienen cáncer de pulmón, incluyendo cáncer NSCLC, con una sensibilidad y selectividad destacablemente elevada.

55 El objeto de esta invención se refiere a métodos y usos tal como se definen en las reivindicaciones. Más en particular, la invención se refiere a un método para la detección, diagnóstico o determinación del estadio del cáncer de pulmón en un paciente, comprendiendo el método el análisis combinado de las proteínas CYFRA 21-1 y LRG-1, en una muestra de sangre del sujeto, proporcionando dicho análisis combinado una indicación de la presencia, estadio o progresión del cáncer de pulmón en el paciente.

60 La invención es particularmente adecuada para detectar o controlar el cáncer de pulmón en sujetos humanos, particularmente cáncer en estadio I y II, por ejemplo, en estadio Ia y IIa.

Otro objeto de la invención se refiere al uso de CYFRA 21-1 en combinación con LRG-1 para el diagnóstico y/o gestión del LC. Otro objeto de la invención se refiere al uso de CYFRA 21-1 en combinación con al menos LRG-1 para el diagnóstico y/o gestión del LC.

65

También se divulga un método para la detección, diagnóstico, determinación del estadio o gestión de LC en un paciente, comprendiendo el método el análisis combinado de (i) una proteína CYFRA, y (ii) al menos una segunda proteína seleccionada entre ACT, HPT y C9, en una muestra del sujeto, proporcionando dicho análisis combinado una indicación de la presencia, estadio o progresión del cáncer de pulmón en el paciente.

La expresión "análisis combinado" indica que los marcadores indicados se ensayan (por ejemplo, respecto de su presencia, cantidad, nivel de expresión relativa, variaciones, etc.) en la muestra, bien de manera simultánea o por separado. Esta es la medida combinada o variación de los al menos dos marcadores que proporciona una indicación relevante y específica de la enfermedad.

En una realización particular, el método comprende proporcionar una muestra de sangre del sujeto, poner en contacto dicha muestra, o una alícuota de la misma, con un primer reactivo de unión específico que se une a una proteína CYFRA 21-1 y con al menos un segundo reactivo específico que se une a una proteína LRG-1, y determinar la presencia o cantidad de proteína unida a dichos reactivos de unión. La puesta en contacto con los al menos 2 reactivos de unión puede llevarse a cabo de manera simultánea o secuencial, en (una misma alícuota de) la muestra o en diferentes alícuotas de la misma muestra. Los reactivos de unión son, lo más preferentemente, anticuerpos o fragmentos de los mismos que mantengan especificidad por el antígeno.

En otra realización particular, el anticuerpo anti-LRG-1 o un fragmento del mismo es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a LRG-1 humana y que se une a un péptido que tiene una secuencia seleccionada entre las SEC ID N°: 26-35 y 57-63.

En otra realización particular, el anticuerpo anti-CYFRA 21-1 o un fragmento del mismo es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une al fragmento de citoqueratina 19, CYFRA 21-1, o a una proteína o péptido que comprende una secuencia seleccionada entre las SEC ID N°: 93-96.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Diagrama de puntos que muestra CYFRA 21-1, ACT, LRG-1, C9 y Hpt medidas mediante ELISA en muestras de plasma de controles sanos (n = 158) y pacientes de cáncer de pulmón (n = 230).

Las estadísticas se muestran como diagramas de cajas para cada grupo, donde la parte inferior y superior de la caja representan los percentiles 25° y 75°; la banda en la caja es el valor de la mediana.

Figura 2. Curvas patrón de ensayos de ELISA sándwich con (a) anticuerpos anti-ACT; (b) anticuerpos anti-beta-HPT; (c) anticuerpos anti-CFH; (d) anticuerpos anti-LRG; (e) anticuerpos anti-C9.

Figura 3. Análisis de curvas de operador de receptor (ROC) del rendimiento diagnóstico de biomarcadores individuales y combinaciones de biomarcadores.

(a) todos los estadios de LC: azul - LRG, ABC = 0,85; negro - CYFRA, ABC = 0,91; rojo - CYFRA + LRG, ABC = 0,93; verde - CYFRA + LRG + ACT + C9 + Hpt + CFH, ABC = 0,94;

(b) solo estadio I de LC: azul - LRG, ABC = 0,88; negro - CYFRA, ABC = 0,92; rojo - CYFRA + LRG, ABC = 0,95; verde - CYFRA + LRG + ACT + C9 + Hpt + CFH, ABC = 0,96;

(c) estadios II, III y IV de LC: azul - LRG, ABC = 0,92; negro - CYFRA, ABC = 0,91; rojo - CYFRA + LRG, ABC = 0,96; verde - CYFRA + LRG + ACT + C9 + Hpt + CFH, ABC = 0,97;

Descripción detallada de la invención

Un reto en el tratamiento del cáncer de pulmón es la ausencia de detección temprana, presintomática ya que los síntomas del cáncer de pulmón se presentan en estadios avanzados. En el presente documento se describen combinaciones de biomarcador que permiten la detección específica, fiable y sensible y la determinación del estadio del cáncer de pulmón en sujetos humanos.

La Solicitud Internacional N° PCT/EP2010/061354, actualmente sin publicar, divulga el descubrimiento de biomarcadores específicos de cáncer. En la presente solicitud, se ensayaron combinaciones específicas de estos biomarcadores con CYFRA y se demostró que mostraban niveles destacablemente más altos de selectividad y especificidad para diagnosticar y gestionar el cáncer de pulmón.

Los presentes inventores han medido la concentración de los diferentes biomarcadores en el plasma de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos usando ensayos de ELISA sándwich. Las proteínas HPT, ACT, LRG-1, y C9 se midieron usando ensayos ELISA SW (Fig. 1), y se midió una proteína CYFRA (por ejemplo, fragmento de citoqueratina 19) usando un kit EIA de CYFRA 21-1 comercialmente disponible (Fujirebio). La presente divulgación demuestra que el uso de CYFRA, en combinación bien con uno de los anteriores 4 biomarcadores o sus combinaciones proporciona

una evaluación fiable de la presencia, estadio o progresión del cáncer de pulmón en sujetos humanos. La medida de una cualquiera de estas combinaciones puede usarse para la detección temprana o para el seguimiento de los pacientes que tienen cáncer de pulmón, incluyendo cáncer NSCLC, con una elevada sensibilidad y selectividad. Además, las combinaciones anteriores de biomarcador pueden usarse en combinación adicional con marcadores adicionales, tales como, por ejemplo, factor H de complemento (CFH), dependiendo del estadio de la enfermedad. El método es particularmente adecuado para detectar los estadios I y II, más particularmente los estadios Ia y IIa del cáncer de pulmón.

Las combinaciones de cada uno de estos biomarcadores individuales con CYFRA, así como paneles multimiembro de todos los biomarcadores, se ensayaron y demostraron un rendimiento diagnóstico destacable (medido como el área bajo la curva ROC), mayor que 0,9, y una sensibilidad de hasta el 84 % a una especificidad del 95 %.

En conjunto, la divulgación proporciona de este modo nuevos biomarcadores combinatorios para aplicaciones clínicas en la detección, gestión, diagnóstico y control de pacientes con cáncer de pulmón.

Se divulga un método para detectar, diagnosticar, determinar el estadio o gestionar el cáncer de pulmón en un sujeto, basándose en el análisis combinado de al menos dos marcadores, una proteína CYFRA y al menos una segunda proteína seleccionada entre LRG-1, ACT, HPT, y C9.

La invención, en su sentido más amplio, es un método tal como se define en la reivindicación independiente 1 y un uso tal como se define en la reivindicación dependiente 9.

En el contexto de la invención, el uso de una proteína para la detección, diagnóstico o gestión del cáncer incluye, sin limitación, el uso de la proteína (en cualquier forma, soluble o no, de longitud completa o no), o de cualquier ácido nucleico, como biomarcador. Esto incluye, por ejemplo, el uso de cualquier reactivo para detectar o cuantificar (i) la proteína o cualquier variante o mutante de la misma, tales como variantes de corte y empalme o polimorfismos, y/o (ii) cualquier ácido nucleico que codifique dichas proteínas, tal como ADN o ARN, estando dichos niveles de proteína y/o ácido nucleico correlacionados con la enfermedad. El término también incluye cualquier medida del nivel de expresión de la proteína citada, y una comparación del nivel medido con un valor de referencia o medio. La cantidad o nivel o información medida proporcionan una indicación referente a la enfermedad específica en el sujeto.

CYFRA

El término CYFRA denomina proteína de citoqueratina o cualquier fragmento de una proteína de citoqueratina. Más preferentemente, el término CYFRA denomina cualquier forma soluble o circulante de una proteína o fragmento de citoqueratina. La invención se limita a CYFRA 21-1 como la CYFRA.

Se encuentran tres citoqueratinas principales en los epitelios simples: citoqueratina 19 (GI: 127799941, la secuencia ilustrativa se muestra en la SEC ID N°: 87 más adelante), la queratina humana más pequeña; citoqueratina 8, y citoqueratina 18. La citoqueratina 19 es una queratina principal en carcinomas (Chu et al., 2002). Durante la apoptosis, se producen fragmentos de citoqueratina solubles a partir de células epiteliales mediante proteólisis mediada por caspasa (Dohmoto et al., 2001). Uno de estos fragmentos es un fragmento de citoqueratina 19, denominado CYFRA 21-1, que se produce mediante escisión en la secuencia escindible por caspasa de 234SVEVD, dando como resultado un fragmento de 18,4 kDa que corresponde con los restos de aminoácidos 234 a 400 de la secuencia de SEC ID N°: 87. Se propuso CYFRA 21-1 como biomarcador para cáncer de pulmón (Stieber et al., 1993; Pujol et al., 1993; o Ebert et al., 1994). Pruebas recientes demuestran además que las células tumorales también pueden liberar citoqueratina 19 de longitud completa (Alix-Panabieres et al., 2009). Sin embargo, el fragmento CYFRA 21-1 de citoqueratinas de longitud completa, solo, no representa biomarcadores suficientes para proporcionar un ensayo diagnóstico de LC específico y sensible.

Tal como se indica anteriormente, los inventores han descubierto sorprendentemente que el uso de CYFRA, en combinación bien con uno de C9, HPT, LRG-1, ACT o CFH, o sus combinaciones, proporciona una evaluación fiable de la presencia, estadio o progresión del cáncer de pulmón en sujetos humanos. La medida de una cualquiera de estas combinaciones puede usarse en particular para la detección temprana o para el seguimiento de los pacientes que tienen cáncer de pulmón, incluyendo cáncer NSCLC, con un rendimiento diagnóstico destacable sustancialmente mayor que el de cada marcador de manera individual, tal como se ilustra, por ejemplo, por una sensibilidad tan alta como un 84 % a una especificidad del 95 %.

La detección de una proteína CYFRA, o el uso de CYFRA tal como se ha divulgado, designa la detección de cualquier forma de CYFRA (por ejemplo, longitud completa o fragmentos de la misma, preferentemente formas solubles de la misma) o los ácidos nucleicos correspondientes. Los ejemplos específicos de una proteína CYFRA incluyen citoqueratina 19 de longitud completa, fragmento de CYFRA 21-1, y cualquier polipéptido que comprende una secuencia seleccionada entre las SEC ID N°: 93 a 96.

La presencia o cantidad de una proteína CYFRA puede detectarse usando un reactivo de unión, en particular un anticuerpo específico (o fragmentos o derivados del mismo que mantengan especificidad de antígeno). En una

realización preferida, la invención usa un anticuerpo anti-CYFRA 21-1 que se une a un epítipo de citoqueratina 19. Más preferentemente, la invención usa un anticuerpo que se une a un epítipo contenido en la secuencia de aminoácidos de citoqueratina 19 humana representada más adelante.

5 Los ejemplos más específicos son anticuerpos que se unen a un péptido seleccionado entre las SEC ID N°: 93-96 y que también se une a proteína de citoqueratina humana, o un fragmento o derivado de dicho anticuerpo que tiene la misma especificidad de antígeno. Los ejemplos específicos de dichos anticuerpos incluyen los anticuerpos monoclonales BM19.21 y KS 19.1.

10 Los fragmentos de citoqueratina 19 (por ejemplo, CYFRA 21-1) se midieron usando un ensayo comercialmente disponible basado en anticuerpos monoclonales. El mapeo de epítipos de queratina 19 humana de las especificidades de los anticuerpos BM 19.21 (Böttger V. et al., Eur J Biochem 1995; 231(2):475-85) y KS 19.1 (Achtstatter, T. (1988) Koexpressionsmuster von Intermediir- filament-Proteinen, Universidad de Heidelberg) usando péptidos sintéticos se muestra a continuación:

15

SEC ID	Secuencia	Ab
93	DVRADSERQNQEYQR	BM 19.21
94	SERQNQEYQRLMDIK	
95	QEYQRLMDIKSRLEQ	
96	MKAALEDTLAETEAR	KS 19.1

El mapeo de los péptidos sintéticos reconocidos por los dos anticuerpos en la secuencia de queratina 19 humana se muestra en la siguiente secuencia. BM 19.21 reconoce a un epítipo localizado entre los restos 351 y 375 y KS 19.1 reconoce a un epítipo localizado entre los restos 316 y 330.

20

Secuencia de aminoácidos de citoqueratina 19 humana (SEC ID N°: 87):

```

1 MTSYSYRQSS ATSSFGGLGG GSVRFGPGVA FRAPSIHGGS GGRGVSVSSA RFVSSSSSSGG
61 YGGGYGGVLT ASDGLLAGNE KLTMQNLNDR LASYLDKVR A LEANGELEV KIRDWYQKQG
121 PGFSRDYSHY YTTIQDLRDK ILGATIENSR IVLQIDNARL AADDERTKFE TEQALRMSVE
181 ADINGLRRVL DELTLARTDL EMQIEGLKEE IAYLKNHEE EISTLRGQVG GOVSVEVDSA
241 PGTDLAKILS DMRSQYEVMA EQNRKDAEAW FTSRTEELNR EVAGHTEQLQ MSRSEVTDLR
301 RTLQGLEIEL QSQLSMKAAL EDTLAETEAR FGAQLAHIQA LISGIEAQLG DVRADSERQN
361 QEYQRLMDIK SRLEQEIATY RSLLEGQEDH YNNLSASKVL

```

4 _____
1 _____
2 _____

3 _____

25 Pueden encontrarse o generarse otros anticuerpos contra proteína CYFRA y usarse en la presente invención. Cabe destacar, sin embargo, que el uso de anticuerpos que se unen a un epítipo presente en una cualquiera de las SEC ID N°: 93-96 se prefiere particularmente.

30 Combinaciones de CYFRA/LRG-1

Se ha demostrado que la familia de proteínas con repeticiones ricas en leucina (LRR), incluyendo LRG-1, está implicada en la interacción proteína-proteína, la transducción de señales, y la adhesión y desarrollo celular. LRG-1 se expresa durante la diferenciación de granulocitos (O'Donnell et al., 2002). LRG-1 humana se aisló a partir de suero humano por Haupt y Baudner, 1977. Mediante análisis de secuencia, Takahashi et al. (1985) determinaron que la proteína LRG-1 purificada tiene 312 aminoácidos y determinaron experimentalmente una masa molecular de 45 kD. El polipéptido de LRG-1 contiene 1 galactosamina y 4 oligosacáridos de glucosamina unidos y tiene dos enlaces disulfuro intracadena. La leucina está comprendida en 66 de los 312 aminoácidos, y LRG-1 contiene al menos 8 repeticiones ricas en leucina de 24 aminoácidos. Se detectó expresión aumentada de LRG-1 en células humanas tratadas con GCSF derivadas de un paciente con trastorno mieloproliferativo. Por el contrario, la expresión de LRG-1 se detectó después del tratamiento de PMA y la inducción de diferenciación monocítica de células HL-60.

40

Una serie de estudios proteómicos centrados en plasma y suero han demostrado una asociación entre niveles elevados de alfa-2 glucoproteína rica en leucina (LRG-1) y la presencia de una serie de diferentes cánceres en múltiples estudios preliminares. Sin embargo, ninguno de los hallazgos se ha confirmado mediante validación clínica. Todos estos estudios están basados en proteómica y ninguno implicó el uso de anticuerpos.

La invención divulga que LRG-1, en combinación con CYFRA, representa una combinación de biomarcadores específicos de cáncer elevadamente predictiva. En particular, los resultados obtenidos demuestran que un análisis combinado de CYFRA y LRG-1 aumenta sustancialmente la fiabilidad y sensibilidad de la detección del cáncer de pulmón. En particular, la evaluación combinada de CYFRA y LRG-1 permite la detección del cáncer de pulmón con una sensibilidad de 83,25% a una especificidad del 95%, mientras que individualmente, CYFRA y LRG-1 proporcionan una sensibilidad de 67,39 y 62,26, respectivamente.

A este respecto, la invención divulga el uso de CYFRA en combinación con LRG-1 para la detección, diagnóstico y/o gestión del LC.

La invención se refiere al uso de CYFRA en combinación con LRG-1 y en combinación adicional con al menos una proteína seleccionada entre ACT, HPT, y C9, para la detección, diagnóstico y/o gestión del LC. Los resultados demuestran que la sensibilidad de detección puede aumentarse además añadiendo un número limitado de biomarcadores seleccionados. En particular, la evaluación combinada de CYFRA, LRG-1, C9 y ACT permite la detección del cáncer de pulmón con una sensibilidad del 84,24% a una especificidad del 95%. Dicha evaluación combinada representa una realización preferida de la invención.

La invención también divulga un método para la detección, diagnóstico, determinación del estadio o gestión de LC en un paciente, comprendiendo el método el análisis combinado de una proteína CYFRA y una proteína LRG-1, en una muestra de sangre del sujeto, proporcionando dicho análisis combinado una indicación de la presencia, estadio o progresión del cáncer de pulmón en el paciente. En una realización adicional preferida, el método comprende el análisis de al menos una proteína adicional seleccionada entre ACT, HPT, C9 y CFH.

La invención también divulga un método para detectar el cáncer de pulmón en un sujeto, comprendiendo el método poner en contacto una muestra de dicho sujeto, que es una muestra de sangre, con un primer anticuerpo, fragmento o derivado del mismo, que se une a una proteína CYFRA y con al menos un segundo anticuerpo, fragmento o derivado del mismo, que se une a LRG-1, y determinar la presencia de una unión, siendo dicha presencia indicativa de cáncer de pulmón.

También se divulga un dispositivo que comprende al menos un reactivo de unión (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo) que se une a una proteína CYFRA y al menos un reactivo de unión (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento o derivado del mismo) que se une a una proteína LRG-1, inmovilizada sobre un soporte. Por ejemplo, el soporte es una membrana, un portaobjetos, una micromatriz, una microplaca o una microperla.

Cualquier anticuerpo anti-LRG-1 puede usarse para llevar a cabo la presente invención. Sin embargo, en una realización preferida, la invención usa un anticuerpo anti-LRG-1 que se une a un péptido seleccionado entre las SEC ID N°: 26-35 y 57-63 y que también se une a la proteína LRG1 (alfa-2 glucoproteína 1 rica en leucina) humana, o un fragmento o derivado de dicho anticuerpo que tiene la misma especificidad de antígeno. La invención usa particularmente un anticuerpo que se une a un péptido seleccionado entre las SEC ID N°: 26-35 y 57-63 y en el que dicha unión está al menos parcialmente desplazada por una proteína LRG-1 humana, o un fragmento o derivado de dicho anticuerpo que tiene la misma especificidad de antígeno. Los ejemplos específicos de dichos anticuerpos incluyen Bsi0392; Bsi0351 y Bsi0352, tal como se divulga en la sección experimental. Un ejemplo adicional incluye el anticuerpo monoclonal 2F5.A2 producido por el hibridoma que tiene el número de registro ATCC PTA-8131 (Patente de Estados Unidos N°: US 7.416.850). Esta patente también divulga un método de ensayo específico para detectar LRG-1, usando citocromo C y el anticuerpo 2F5-A2, que puede usarse específicamente para llevar a cabo la presente invención.

Combinación de CYFRA, LRG-1, C9 y ACT

La invención divulga la determinación combinada de CYFRA, LRG-1, C9 y ACT. De hecho, los resultados demuestran que la sensibilidad de la detección puede ser óptima usando dicha combinación de CYFRA, LRG-1, C9 y ACT, especialmente para la detección de LC en estadio I. La invención divulga por lo tanto un método para detectar, diagnosticar, determinar el estadio o controlar el LC en un sujeto humano, comprendiendo el método la determinación combinada de CYFRA, LRG-1, C9 y ACT en una muestra de sangre del sujeto, siendo dicha determinación indicativa de LC. La invención también divulga un dispositivo que comprende reactivos para la detección combinada de CYFRA, LRG-1, C9 y ACT. Además, aunque por sí misma es muy predictiva, esta combinación de marcadores de la invención puede combinarse adicionalmente con otro(s) biomarcador(es).

Formato de ensayo e implementación

La invención puede llevarse a cabo usando diferentes tipos de muestras de sangre, varios tipos de anticuerpos o reactivos de unión, y diferentes formatos de ensayo.

5 La muestra es sangre, suero o plasma, particularmente sangre completa. La muestra puede tratarse antes de usarse en el método de la invención, por ejemplo, para su disolución, enriquecimiento, concentración, filtración, etc. También, pueden prepararse varias alícuotas de una muestra para ensayarlas por separado.

10 La invención utiliza preferentemente reactivos de unión que se unen específica o selectivamente a un biomarcador. La unión selectiva o específica indica que la unión a otra molécula puede discriminarse de (por ejemplo, sucede con mayor afinidad o avidez que) la unión específica al biomarcador diana. Los reactivos preferidos no se unen, en condiciones selectivas, a cualquier otra proteína sanguínea humana distinta de la proteína de referencia. La unión de un reactivo a una molécula de referencia puede ensayarse tal como se divulga en los ejemplos.

15 Los reactivos de unión pueden seleccionarse entre aptámeros, ligandos específicos, anticuerpos, o derivados de los mismos.

20 En una realización particular, el reactivo de unión es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, más preferentemente uno monoclonal. Puede ser de diversas clases (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, etc.). El anticuerpo puede ser de diversos orígenes animales, o humanos o sintéticos o recombinantes. Además, el término anticuerpo también incluye fragmentos y derivados de los mismos, en particular, fragmentos y derivados de dichos anticuerpos monoclonales o policlonales que tienen sustancialmente la misma especificidad antigénica. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, por ejemplo, Fab, Fab'2, CDR, etc. Los derivados incluyen anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos polifuncionales, anticuerpos monocatenarios (ScFv), etc. Estos pueden producirse de acuerdo con métodos convencionales, incluyendo la
25 inmunización de un animal y la recolección del suero (policlonal) o células del bazo (para producir hibridomas mediante fusión con líneas celulares adecuadas).

30 Los métodos para producir anticuerpos policlonales a partir de diversas especies, incluyendo ratones, roedores, primates, caballos, cerdos, conejos, aves de corral, etc., pueden seleccionarse entre técnicas en sí conocidas en la técnica. En resumen, el antígeno se combina con un adyuvante (por ejemplo, adyuvante de Freund) y se administra a un animal, típicamente mediante inyección subcutánea. Pueden efectuarse inyecciones repetidas. Se recogen muestras de sangre y se separan las inmunoglobulinas o el suero.

35 Los métodos para producir anticuerpos policlonales a partir de diversas especies tal como se listan anteriormente pueden encontrarse, por ejemplo, en Harlow et al., 1988 o en Kohler et al., 1975. En resumen, estos métodos comprenden inmunizar a un animal con el antígeno, seguido de una recuperación de células del bazo que después se fusionan con células inmortalizadas, tales como células de mieloma. Los hibridomas resultantes producen los anticuerpos monoclonales y pueden seleccionarse mediante diluciones limitantes para aislar clones individuales. También pueden producirse anticuerpos mediante selección de bibliotecas combinatorias de inmunoglobulinas, tal como se divulga, por ejemplo, en Ward et al., 1989.
40

45 Los anticuerpos recombinantes, o los fragmentos derivados de los mismos, pueden producirse mediante métodos en sí conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante recombinación en una célula hospedadora, transformada con uno o más vectores que permiten la expresión y/o secreción de las secuencias nucleotídicas que codifican la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo. El vector contiene generalmente un promotor, señales de iniciación y terminación de la traducción, y regiones reguladoras transcripcionales adecuadas. Se mantiene de manera estable en la célula hospedadora y puede poseer opcionalmente señales específicas para la secreción de la proteína traducida. Estos diferentes componentes se seleccionan y optimizan por un experto en la materia según la célula hospedadora usada.

50 Para su uso en la invención, los anticuerpos pueden acoplarse a restos heterólogos, tales como marcadores, marcas, enlazantes, etc.

55 El método de la invención puede llevarse a cabo usando una diversidad de tecnologías o plataformas de detección en sí conocidas en la técnica, tales como, sin limitación, ensayo de captura, ensayo sándwich, ensayo de competición, radioinmunoensayos, marcadores enzimáticos con sustratos que generan productos coloreados, fluorescentes, quimioluminiscentes, o electroquímicamente activos, fluorescencia, polarización de fluorescencia, quimioluminiscencia, ópticos y colorimétricos, electroquimioluminiscencia, fluorescencia resuelta en tiempo, resonancia de plasmón superficial, onda evanescente, placa multipocillo (ELISA), ensayo individual, ensayo multiplexado, perla de látex - ensayo multiplexado, micromatriz (superficie laminar) - ensayo multiplexado, ensayos basados en vidrio, cerámica (como Randox) o placa, ensayos basados en tiras, varillas, inmunoensayos de sistemas cerrados. Los formatos de ensayo preferidos incluyen:
60

Ensayo de captura

65 Un ensayo llevado a cabo usando un solo anticuerpo inmovilizado (placa multipocillo, perla de látex, micromatriz, etc.) que captura una proteína específica marcada de un biofluido, cuya detección se mide usando reactivos de detección

adecuados, tal como se detalla en el párrafo siguiente. El anticuerpo se inmoviliza directamente al soporte o se captura por un reactivo de afinidad, tal como un revestimiento de anticuerpo de IgG anti-ratón sobre el soporte. Entonces se incuban el anticuerpo inmovilizado con cualquiera de los fluidos corporales anteriormente mencionados en los que se han marcado las proteínas con una molécula de detección, tal como biotina, con o sin pretratamiento para eliminar proteínas abundantes. La proteína marcada que está unida por el anticuerpo se detecta mediante la adición de un reactivo de detección adecuado que se une al marcador, tal como avidina o estreptavidina, que se ha modificado para que sea compatible con una de las tecnologías de detección descritas en la sección "tecnología de detección". La señal resultante proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de proteína marcada unida por el anticuerpo.

10 *ELISA sándwich*

Un ensayo que usa dos anticuerpos, el primero de los cuales se inmoviliza sobre un soporte (placa multipocillo, perla de látex, micromatriz, etc.) que une una proteína específica de un biofluido, en que se mide la detección usando un segundo anticuerpo marcado contra la misma proteína y reactivos de detección adecuados, tal como se detalla en el siguiente párrafo.

El primer anticuerpo se inmoviliza directamente al soporte o se captura por un reactivo de afinidad, tal como un revestimiento de anticuerpo de IgG anti-ratón sobre el soporte. Entonces se incuban el anticuerpo inmovilizado con cualquiera de los fluidos corporales anteriormente mencionados, con o sin pretratamiento para eliminar proteínas abundantes. El complejo anticuerpo/antígeno se incuban entonces con un segundo anticuerpo, producido contra la misma proteína, que se ha marcado con una molécula de detección, tal como biotina. El anticuerpo unido se detecta mediante la adición de un reactivo de detección adecuado que se une al marcador, tal como avidina o estreptavidina, que se ha modificado para que sea compatible con una de las tecnologías de detección descritas en la sección "tecnología de detección". La señal resultante proporciona una medida cuantitativa de la cantidad de proteína unida por el anticuerpo.

Ensayo competitivo

Un ensayo en que la unión de una proteína trazadora marcada por un solo anticuerpo, tal como se describe en "ensayo de captura" se inhibe mediante la preincubación de un biofluido para cuantificar el analito de manera indirecta. El anticuerpo se inmoviliza directamente al soporte o se captura por un reactivo de afinidad, tal como un revestimiento de anticuerpo de IgG anti-ratón sobre el soporte. Entonces se incuban el anticuerpo inmovilizado con cualquiera de los fluidos corporales anteriormente mencionados. El complejo anticuerpo inmovilizado/antígeno se incuban entonces con un trazador marcado que consiste bien en (1) cualquiera de los fluidos corporales anteriormente mencionados en los que las proteínas se han marcado con una molécula de detección, tal como biotina, con o sin pretratamiento para eliminar proteínas abundantes, o (2) una proteína purificada o recombinante reconocida (unida) por el anticuerpo monoclonal, o (3) un péptido que se reconoce (une) por el anticuerpo monoclonal. La proteína o péptido marcado que está unido por el anticuerpo se detecta mediante la adición de un reactivo de detección adecuado que se une al marcador, tal como avidina o estreptavidina, que se ha modificado para que sea compatible con una de las tecnologías de detección descritas en la sección "tecnología de detección". El nivel de la proteína específica en el biofluido no marcado se determina como una función de la inhibición de señal.

Las tecnologías de detección preferidas incluyen:

45 marcadores enzimáticos con sustratos que generan productos coloreados, fluorescentes, quimioluminiscentes, o electroquímicamente activos.

El reactivo de detección (por ejemplo, estreptavidina o avidina, que se une a biotina) se acopla a una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante que es capaz de catalizar:

50 un sustrato colorimétrico adecuado a partir del cual el producto demuestra una absorbancia máxima a una longitud de onda determinada permitiendo la medición cuantitativa de la proteína marcada midiendo la densidad óptica del producto final en el pocillo o próximo a la longitud de onda de la absorbancia máxima.

un sustrato quimioluminiscente para un reactivo sensibilizado que tras su oxidación emite luz, proporcionando la medida cuantitativa de la proteína marcada.

55 un sustrato quimioluminiscente para un reactivo sensibilizado que tras la aplicación de una corriente eléctrica emite luz, proporcionando la medida cuantitativa de la proteína marcada.

Fluorescencia

60 El reactivo de detección (por ejemplo, estreptavidina o avidina, que se une a biotina) se acopla a un marcador fluorescente.

Las tecnologías de plataforma preferidas incluyen:

65 Placa multipocillo

Prueba individual: se inmoviliza un anticuerpo por pocillo bien directamente o indirectamente usando un reactivo de captura, tal como anticuerpo de cabra anti-ratón.

Multiplexado: se inmovilizan 2 o más anticuerpos en un solo pocillo mediante deposición siguiendo un patrón.

Perla de látex

5 Se inmovilizan dos o más anticuerpos sobre una perla de entre x e Y micras.

Matrices, micromatrices y nanomatrices

Se puntean dos o más anticuerpos sobre una superficie laminar activada con un diámetro de punto de entre 100 µm - 5 mm (matrices), 2 µm - 100 µm (micromatrices), 10 nm - 2 µm (nanomatrices). La superficie puede estar compuesta de vidrio, plástico, cerámica, rejilla de nanotubos de carbono, etc.

10 Pueden usarse diferentes métodos o algoritmos para derivar el índice de cáncer de pulmón. En la forma más simple, las concentraciones de los marcadores individuales medidos en la muestra se combinan usando una función lineal (véase más adelante) para derivar un valor de índice que indica la presencia de cáncer de pulmón si el valor de índice está por encima de un umbral predeterminado.

$$15 \quad \text{Índice} = A \cdot \text{Concentración (BM1)} + B \cdot \text{Concentración (BM2)} + C \cdot \text{Concentración (BM3)} \dots$$

Donde BM designa a un biomarcador.

20 Otro método o algoritmo consiste en llevar a cabo en primer lugar la estandarización de las medidas de concentración individuales usando valores predeterminados para la media y la desviación estándar (std) (véase más a continuación) para cada biomarcador para llevar las medidas de biomarcadores en diferentes intervalos de concentración a la misma escala, del modo siguiente:

$$25 \quad \text{Valor Estandarizado (BM1)} = ((\text{Concentración (BM1)} - \text{Media (BM1)}) / \text{Std (BM1)})$$

30 Los valores estandarizados se usan entonces tal como se describe en el párrafo anterior. El procedimiento de estandarización también puede usarse para corregir respecto a cambios reproducibles en el nivel de las concentraciones de biomarcador que pueden atribuirse a factores analíticos.

35 El método de la invención puede efectuarse en cualquier estadio de la enfermedad, tal como en estadio temprano o tardío, para confirmar o descartar un diagnóstico previo, seleccionar pacientes para cirugía, clasificar el tipo o gravedad de un cáncer, o controlar a los pacientes. La prueba puede llevarse a cabo también antes de los síntomas de enfermedad, tal como una detección de primera línea. La aplicación diagnóstica clínica de una prueba de plasma (suero) de cáncer de pulmón será útil, por ejemplo, para pacientes que se sospecha que tienen cáncer de pulmón debido a un nódulo sospechoso que se ha detectado mediante obtención de imágenes del pulmón (exploración TC).
40 Los nódulos < 0,5 cm son sospechosos y bastante frecuentes en las poblaciones. Los nódulos > 0,5 cm pero < 1,1 cm representan una probabilidad aumentada de que sean cancerosos, aunque difíciles de encontrar mediante cirugía y procedimientos endoscópicos invasivos. Es importante seleccionar pacientes de este grupo con nódulos que son definitivamente cancerosos para reducir la carga de cirugías fútiles y otros procedimientos diagnósticos invasivos.

45 La prueba evitará toracotomías fútiles y tecnologías de obtención de imágenes innecesarias y caras que no son lo suficientemente específicas y exponen a los pacientes a irradiación potencialmente perjudicial, y curaciones no percibidas ya que los pacientes observados pueden someterse repetidamente a la prueba.

50 La invención es particularmente ventajosa ya que permite la detección de los estadios I o II, en particular el estadio Ia y el estadio IIa de LC en sujetos humanos.

Los aspectos adicionales y ventajas de la invención se divulgarán en los ejemplos siguientes, que deben considerarse como ilustrativos. Solo los ejemplos pertenecientes a las reivindicaciones constituyen la invención.

Ejemplos

55 A. Métodos

Muestras biológicas

60 Se obtuvieron muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón recién diagnosticado y sin tratamiento previo a través de Asterand (Royston, R.U.) y del Departamento de Neumología de la Universidad de Debrecen en Hungría de pacientes informados e individuos aparentemente sanos después de obtener su consentimiento por escrito mediante el protocolo clínico RKEB/IKEB:2422-2005 aprobado por el comité regional de ética y el IRB de la clínica (Tabla 1). La determinación del estadio del cáncer de pulmón se efectuó de acuerdo con el American Joint committee on Cancer (AJCCD) y se basó en información en el informe histopatológico final que tenía el histotipo de LC de acuerdo con la

clasificación de la OMS (19). Los datos clínicos, incluyendo estadio en el diagnóstico, histología, patologías pulmonares adicionales, hábitos de consumo de tabaco y demográfica general del paciente se presentan en la Tabla 1.

Cohorte	Estado	Número de sujetos	Edad	Género*	Estado de fumador	paquetes/día (prom)	Estadio de LC	Histología†	Otras EL‡
Conjunto de entrenamiento (Asterand)	LC	219	26-86 (prom 61)	M: 158 F: 61	Uso actual: 116	1,3	I: 128	SQC: 104	EPOC: 6 Enfisema: 5
					Uso ocasional: 5		II: 39	AC: 85	
					Uso previo: 63		III: 31	Otros	
					Nunca usado: 32		IV: 5	NSCLC: 25	
					desconocido: 3		desconocido: 16	SCLC: 5	Bronquitis crónica: 21 Asma: 3
Sano		169	18-70 (prom 38)	M: 114 F: 55	Uso actual: 49	1,0			
					Uso ocasional: 4				
					Uso previo: 25				
					Nunca usado: 91				
Conj. prueba Univ. de Debrecen	LC	45	44-77 (prom 59)	M: 32 F: 13	Uso actual: 45	1,7	I: 1	SQC: 14	
							III: 1	AC: 10	
							III-IV: 12	Otros	
							IV: 18	NSCLC: 4	
					desconocido: 13	desconocido: 13	SCLC: 17	EPOC: 22	
Sano	63	34-72 (prom 54)	M: 23 F: 40	Uso actual: 63	1,1				EPOC: 0

Purificación de anticuerpos

Se produjo fluido de ascitis inyectando por vía intraperitoneal $1-5 \times 10^6$ células de hibridoma en ratones Balb/c cebados con adyuvante incompleto de Freund, usando un protocolo que se había aprobado por el comité de cuidado de animales del animalario. Se eliminaron células y restos celulares del fluido ascítico, y la IgG se purificó usando un procedimiento de cromatografía de afinidad en dos etapas que consistía en purificación previa en una columna adsorbente tiófila Pierce de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) seguido de purificación adicional usando FF de proteína G-sefarosa de GE Healthcare (Chalfont St. Giles, R.U.). En ambos casos, los procedimientos se llevaron a cabo tal como se recomienda por los proveedores. Los anticuerpos purificados se concentraron mediante ultrafiltración. Las purezas de las preparaciones se evaluaron mediante SDS-PAGE, y la concentración de proteína se determinó usando el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce (Rockford, IL). Los anticuerpos purificados se almacenaron como alícuotas de trabajo a -78°C .

Biotinilación de mAb

Los anticuerpos monoclonales purificados se marcaron con una NHS-biotina bifuncional que tiene una cadena de alquilo larga como espaciador EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina de Pierce (Rockford, IL). El marcado se llevó a cabo en tampón PBS (pH 7,0) a un exceso molar de 50 veces de biotina durante 30 min a temperatura ambiente.

Cuantificación de biomarcador

Los diferentes biomarcadores se cuantificaron con ensayos de ELISA sándwich usando las parejas de Ab listadas en la Tabla a continuación. Las placas de microtitulación de 384 pocillos (placas de alta unión de Corning) se recubrieron directamente con los mAb de captura a $20 \mu\text{g/ml}$ y después se bloquearon con tampón PBS que contenía BSA al 0,5% (p/v). Los plasmas y los calibradores de proteínas, diluidos en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (v/v) y FBS al 1% (v/v), se incubaron entonces en los pocillos. La unión de los anticuerpos de detección biotinilados, añadidos a $5 \mu\text{g/ml}$ y lavados 4 veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,05 % (v/v) se controló usando un complejo de avidina acoplado a la HRP (kits VECTASTAIN® ABC) y su sustrato (TMB). La reacción se midió usando lecturas cinéticas a 650 nm durante 2 min a 37°C .

También se cuantificó LRG con un segundo tipo de ensayo basado en la afinidad de LRG por el citocromo C usando el protocolo descrito en Weivoda et al. (J Immunol Methods. 20 de julio de 2008; 336(1):22-9, Epub 4 de abril de 2008).

Las curvas estándar obtenidas con los calibradores se han representado usando el algoritmo de ajuste de cuatro parámetros. Las concentraciones de los analitos en los plasmas se calcularon a partir de las curvas patrón correspondientes.

Se midió CYFRA 21-1 usando un ensayo comercialmente disponible basado en los anticuerpos monoclonales BM 19.21 y KS 19.1 (Kit de EIA de CYFRA 21-1 de Fujirebio Diagnostics, Inc. (ref. 211-10).

Los anticuerpos monoclonales y reactivos usados en este trabajo se listan a continuación:

Reactivo de captura	Ab de detección	Proteína diana
BM 19.21	KS 19.1	CYFRA21-1
Bsi0272	Bsi0452	C9
Bsi0352	2F5.A2*	LRG-1
citocromo c	Bsi0392	LRG-1
Bsi1709	Bsi0033	haptoglobina
Bsi0186	Bsi0358	ACT

* Weivoda S, et al., J Immunol Methods. 20 de jul de 2008; 336(1):22-9

Inmunización de ratones BALB/c con inmunógenos complejos

Se inyectaron las dos mezclas de complejo de antígeno proteína a ratones BALB/c hembra de al menos 8 semanas de edad de Charles River Laboratories (Evry, Francia) por vía subcutánea en las almohadillas traseras y en la base de la cola. Cada ratón recibió $10 \mu\text{g}$ de proteína de preparación de complejo de inmunógeno en los días 1, 15 y 29. En todos los casos se usó adyuvante completo de Freund (Sigma, Saint Louis, MO). Se extrajo sangre de cada ratón mediante punción retroorbital usando una pipeta Pasteur en los días 19 y 33 para controlar la producción de anticuerpos mediante ELISA. Tras un mínimo de tres semanas después de la tercera inmunización (día 52 para el grupo A y día 61 para el grupo B) se efectuó una inyección adicional de $10 \mu\text{g}$ de la mezcla de antígeno complejo en PBS, pH 7,0, para

reforzar la respuesta inmunitaria. Los ratones se trataron en un animalario de acuerdo con las leyes y regulaciones francesas y europeas referentes a la experimentación con animales.

5 Fusión, crecimiento celular y clonación

Los procedimientos se efectuaron de acuerdo con métodos publicados. En resumen: se fusionaron células Sp2/0-Ag-14 a esplenocitos de ratones inmunizados con la ayuda de polietilenglicol (PEG). Las células fusionadas se sembraron para proporcionar una distribución cuasiclónica de los híbridos, que se seleccionaron en medio HAT. Las líneas celulares de hibridoma se clonaron antes de la producción de anticuerpos (*in vitro* o *in vivo*).

10 Exploración de ELISA directo de alto rendimiento

15 Todos los compuestos químicos, a menos que se especifique, se obtuvieron a través de Sigma (St. Louis, MO). Se recubrieron placas de unión de 384 pocillos (Corning Inc., Lowell, MA) con 20 µg/ml (13 µl por pocillo) anticuerpo policlonal anti-cadena Ig gamma de ratón (GAM) de Southern Biotechnology Associates, Inc. (Birmingham, AL) en tampón de recubrimiento a pH 9,6 durante 2 h a temperatura ambiente (TA). Las placas se lavaron cuatro veces con 80 µl/pocillo de PBS que contenía Tween al 0,05 % (v/v) (tampón de lavado) y se bloquearon con 40 µl de PBS y albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % a 4 °C durante toda la noche. Los sobrenadantes de los hibridomas nacientes o de las líneas celulares clonales se añadieron sin diluir a los pocillos. Cada sobrenadante de hibridoma se añadió a cuatro pocillos adyacentes para proporcionar cuatro lecturas independientes. Se usó mAb de ratón anti-humano contra albúmina como control positivo y se punteó en ocho pocillos a 1,2 µg/ml en CM (13 µl/pocillo). Se usó CM como control negativo y también se añadió a ocho pocillos. Las placas se incubaron y después se lavaron cuatro veces con tampón de lavado. Todos los pocillos se incubaron con plasmas empobrecidos biotinilados (trazadores) a 10 µg/ml en PBS con Tween al 0,05 % (v/v) y FBS bajo en IgG al 1 %. La incubación se continuó durante 90 min a TA y las proteínas no unidas se retiraron lavando las placas cuatro veces con tampón de lavado. Se usó avidina acoplada a HRP (kit de peroxidasa Vectastain Elite ABC de Reactolab SA, Suiza) según se especifica en el protocolo del fabricante. Después de un lavado cuádruple con tampón de lavado, se llevó a cabo el revelado de la reacción añadiendo 20 µl de solución de sustrato recién preparada a cada pocillo (O-fenilendiamina a 0,4 mg/ml en tampón de fosfato/citrato 0,05 M, pH 5,0). La cinética del revelado de la reacción a 37 °C se siguió a 450 nm registrando la absorbancia múltiples veces. El manejo de líquidos se llevó a cabo usando Multidrop Combi de Thermo (Waltham, MA), Multimek con cabeza de 96 pines de Beckman Coulter (Fullerton, CA) y STAR de Hamilton (Reno, NV). El lavado de las placas se llevó a cabo usando ELX405 de BioTek (Winooski, VT). La absorbancia se midió con un lector de microplacas SpectraMax de Molecular Devices (MDS, Toronto, Canadá).

35 Análisis de datos de exploración

Las V_{máx} de las reacciones cromogénicas se calcularon a partir de la parte lineal de las lecturas cinéticas usando el programa informático proporcionado con el lector de placas, SoftMax Pro, de Molecular Devices (MDS, Toronto, Canadá). Cada placa tenía ocho controles positivos y negativos usados para calcular el factor Z', una métrica usada para cuantificar la calidad del experimento de exploración respecto de su reproducibilidad y dispersión de datos¹⁹. Las placas con un factor Z' por debajo de 0,5 (normalmente menos del 10% en una campaña de exploración) se repitieron. Los controles positivos (CP) y negativos (NC) se usaron para normalizar los datos entre las placas y de acuerdo con la siguiente fórmula:

45
$$V_{máxN_{muestra}} = (V_{máx_{muestra}} - V_{máx_{NC}}) / (V_{máx_{PC}} - V_{máx_{NC}}).$$

Los datos aberrantes (atípicos) de cada grupo de replicados (cuatro por muestra de hibridoma hecha reaccionar con un trazador y ocho por control hecho reaccionar con un trazador) se retiraron usando un procedimiento automatizado basado en los valores de la media y la desviación estándar de las múltiples medidas.

Para cada muestra (i), se calcula el coeficiente de variación (CV) en los n replicados. CV es una medida normalizada de la dispersión de la distribución de probabilidad y se define como la relación de la desviación estándar σ respecto de la media μ del modo siguiente:

55
$$CV(i) = \sigma(i) / \mu(i)$$

Si CV > 0,05, se calculan los niveles umbral máximos (T_{máx}) y mínimos (T_{mín}) del modo siguiente:

60
$$T_{máx}(i) = \mu(i) + 1.3 * \sigma(i)$$

$$T_{mín}(i) = \mu(i) - 1.3 * \sigma(i)$$

Los replicados con cuya V_{maxN} es menor que T_{mín} o mayor que T_{máx} se eliminan. En total, un 9,2 % de todos los datos generados se consideraron aberrantes, lo que representa la eliminación de menos de una medida por cada dos

muestras. Los datos obtenidos después de normalizar y promediar los replicados (Figura 6) se analizaron adicionalmente usando métodos estadísticos.

Métodos estadísticos

5 La normalidad de la distribución de los resultados se estimó usando la prueba de Wilks-Shapiro. La distribución de los resultados para cada hibridoma se calculó por separado para las muestras de control y de cáncer de pulmón. Se aplicaron análisis estadísticos no paramétricos: se determinaron las diferencias entre dos grupos independientes usando la prueba de U de Mann-Whitney; se evaluaron las diferencias entre más de dos grupos usando el análisis 10 Kruskal-Wallis de una vía de la prueba de varianza. Todas las pruebas estadísticas fueron bilaterales y se llevaron a cabo usando el programa informático estadístico R (www.cran.r-project.org). Se produjo un modelo predictivo para discriminar los casos de cáncer de pulmón de controles sanos usando el panel de cinco mAb usando el kit de herramientas de aprendizaje de máquinas Weka (<http://www.cs.waikato.ac.nz/~ml/>) con una máquina de vector de soporte lineal y algoritmo de optimización mínima secuencial (SMO). El modelo se estableció sobre el conjunto de 15 datos completo usando validación cruzada de 10 veces.

Se calculó la regresión logística basándose en las predicciones de SMO para producir probabilidades de valores de clase (en el presente documento cáncer de pulmón frente a control) y para generar las curvas de características operativas de receptor (ROC).

20 B - Anticuerpos anti-LRG-1

Bsi0392

25 Bsi0392 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada se representa en SEC ID N°: 92, que se reproduce a continuación (las CDR están subrayadas):

QIQLVQSGPELKKPGETVEISCKASGYTFDYSMHWVKQAPGKGLKWMGWINTET
GEPTYADDFKGRFAFSLETSATTAYLQINNLNKNETATYFCARGGYGNYDYAMD
YWGGQTSLTVSS

30 Bsi0352

Bsi0352 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 89, que se reproduce a continuación (las CDR están subrayadas):

EVQLQESGPSLVKPSQTLSTLCSVTGDSITSGSWNWIREFPGNKLEYMGYISYSGST
DYSPSLKSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCATHYYGYLSLDYWGQGTS
VTVSS

35 La diferencia en el nivel de biomarcador con Bsi0352 se representa en la Fig. 1, que muestra una diferencia muy sustancial entre control y cáncer de pulmón. Los péptidos unidos mediante Bsi0352 se han identificado y verificado. Estos péptidos se presentan como las SEC ID N°: 26-35.

40 Bsi0351

Bsi0351 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 88, reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

45 DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSIINDYAWNWRQFPGNKLEWMAYISYGG
SIGYKPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARGGFYALDYWGQGTS

Se han identificado los péptidos unidos mediante Bsi0351. Estos péptidos se presentan como las SEC ID N°: 57-63. C.

50 Anticuerpos anti-ACT

Bsi0358

55 Bsi0358 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 90 reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYAMSWVRQAPGKGLEWISRIRSKS
NNYATYYVDSVKDRFTIYRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAIYYCVREGDWGQGT
 VTVSA

5 La diferencia en el nivel de biomarcador con Bsi0358 se representa en la Fig. 1, que muestra una diferencia muy sustancial entre control y cáncer de pulmón. Los péptidos unidos mediante Bsi0358 se han identificado y verificado. Estos péptidos se presentan como las SEC ID N°: 1-13.

Bsi0359

10 Bsi0359 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 91 reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFSTSAMNWVRQAPGKGLEWISRIRSKTN
NYATYYVDSVKDRFTIYRDDSQNMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVREGDWGQGT
 VTVSA

15 Los péptidos unidos mediante Bsi0359 se han identificado y verificado. Estos péptidos se presentan como las SEC ID N°: 39-42.

D - Anticuerpos amto-C9

20 Bsi0272

Bsi0272 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 86 reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSEFASYWMNWVKQRPGQGLEWIGMIHPS
DSGTSLDEKFKDKATLTVDKSSNTAYIQLNSPTSEDSAVYYCAREGYD.PAWFAY
 WGQGTLLTVSA

25 La diferencia en el nivel de biomarcador con Bsi0272 se representa en la Fig. 1, que muestra una diferencia muy sustancial entre control y cáncer de pulmón.

30 Los péptidos unidos mediante Bsi0272 se han identificado y verificado. Estos péptidos se presentan como las SEC ID N°: 14-25.

E - Anticuerpos anti-HPT

35 Bsi0033

Bsi0033 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 77 reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

EVQLQQSGADLVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWMKQRPEQGLEWIGRIDPAN
GNSKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCTKSAGVPFAYWGQ
 TLVTVSA

40 La diferencia en el nivel de biomarcador con Bsi0033 se representa en la Fig. 1, que muestra una diferencia muy sustancial entre control y cáncer de pulmón. Los péptidos unidos mediante Bsi0033 también se han identificado y verificado. Estos péptidos se presentan como las SEC ID N°: 36-38.

45 Bsi0071

Bsi0071 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 81 reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

50

EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASEFTFSNYAMS^WVVRQTPEKRLEWVATISSGG
SFTYYPDNLKGRFTVSRDNAKDTLYLQMSSLRSEDTAIYYCARQSLGYYFDSWGQ
 GTTLTVSS

F - Anticuerpos anti-CFH

5 El factor H de complemento (NM_000186) es un miembro del grupo génico de regulador de la activación de complemento (RCA). La proteína CFH contiene veinte dominios de repetición corta consenso (SCR), se secreta en el torrente sanguíneo, y tiene un papel esencial en la regulación de la activación de complemento, restringiendo este mecanismo de defensa innato a infecciones microbianas. Las mutaciones en este gen se han asociado con el síndrome hemolítico-urémico (HUS) y con la nefropatía hipocomplementémica crónica. El factor H de complemento
 10 (CFH) es un inhibidor de la ruta de complemento alternativa.

La detección de CFH, cuando se combina con paneles de la presente invención, puede aumentar adicionalmente la fiabilidad de la predicción.

15 Puede usarse cualquier anticuerpo anti-CFH para detectar CFH. Los ejemplos específicos de dichos anticuerpos incluyen Bsi0077, Bsi0271, Bsi0885 y Bsi0893, tal como se divulga a continuación.

Bsi0077

20 Bsi0077 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG. La secuencia de aminoácidos variable de cadena pesada se representa en la SEC ID N°: 83 reproducida a continuación (las CDR están subrayadas).

EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHWMRQSHGKSLEWIGGINPNKG
NTNFNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELHSLPSEDSAVFYCARANWDVYAVDSWG
 QGTSVTVSS

25 La unión del antígeno se determinó mediante una reacción en sándwich con BSI0271 y unión directa a CFH natural purificado.

Bsi0271

30 Bsi0271 es un anticuerpo monoclonal de tipo IgG anti-CFH que se une a una secuencia peptídica seleccionada entre las SEC ID N°: 43-56.

Los anticuerpos anti-CFH adicionales incluyen las IgG Bsi0893 y Bsi0885, que se unen a una secuencia peptídica presentada a continuación, respectivamente.

35

Ab		Secuencia	SEC ID
Bsi0893	CFH	CLPYPLCRGTAT	75
		TECLPYPLCLYN	76
		NETWSEFWRLHN	78
		TAQDDRIFHMMH	79
		RGTQDMEYFAMH	80
Bsi0885	CFH	TVNPLLRLLSMG	64
		NNPMLVLLSHGA	65
		TVPQPQRLTQKS	66
		AKYESLLRMLAA	67
		GHESGYHISERA	68
		GHEEHLWQILHF	69
		GHEEQRNWSMEG	70
		STYTDMLADLSA	71
		SYESLLMKLARG	72
		YRDSPGPRDKLL	73
GHEEREYQMLLQ	74		

En un formato de ensayo específico, puede detectarse CFH usando la siguiente combinación de reactivos:

Reactivos de captura	Ab de detección	Proteína diana
Bsi0271	Bsi0885	CFH
Bsi0893	Bsi0885	CFH

G. Combinaciones de biomarcadores de cáncer de pulmón (Fig. 1-3)

5 Se ha medido la concentración de los seis biomarcadores en el plasma de pacientes con cáncer de pulmón y sujetos sanos usando ensayos de ELISA sándwich. Las proteínas Hpt, ACT y LRG-1 se midieron usando ensayos de ELISA SW (Fig. 1-3) y la citoqueratina-19 se midió usando un kit comercialmente disponible CYFRA 21-1 EIA (Fujirebio). Las capacidades de discriminación de los biomarcadores individuales son bastante buenas y su potencial como herramientas diagnósticas se determinó a partir del área bajo las curvas (ABC) de características operativas de receptor (ROC). Los dos biomarcadores con el mejor rendimiento determinado mediante el ABC fueron LRG-1 y CYFRA 21-1 que tienen una ABC de 0,85 y 0,91, respectivamente, seguido de ACT (ABC de 0,81), C9 (ABC de 0,80), y Hpt (ABC de 0,74) (Tabla a continuación). La sensibilidad a un 95% de especificidad también fue bastante diferente entre los diferentes biomarcadores y varió desde un 67% para CYFRA 21-1 y un 62 % para LRG-1 hasta un 32 % para HPT. La combinación de CYFRA 21-1 con cada uno de los otros biomarcadores mostró un rendimiento diagnóstico aumentado y por lo tanto añadieron valor. Usando máquinas de vector de soporte, y validación cruzada diez veces de los resultados generados con las muestras de la cohorte clínica III (conjunto de entrenamiento), se han determinado múltiples clasificadores de marcador compuestos de combinaciones entre los cinco biomarcadores. Se logró un aumento de más del 10% en la sensibilidad a una especificidad del 95% de la predicción cuando se añadió CYFRA 21-1 a cualquier panel de tres biomarcadores (LRG-1, C9, ACT) o panel de cuatro biomarcadores (ACT + P9 +LRG + Hpt). Se observó un rendimiento destacable para un panel de cuatro miembros con un ABC de 0,93 que pudo proporcionar especificidad del 95 % con una sensibilidad por encima del 84 %. En los estadios II y posteriores, el panel alcanzó un 90 % de sensibilidad.

25 Tabla: Rendimiento de biomarcadores combinados

	Se al 95% de Es	ABC		Se al 95% de Es	ABC
Cyfra	67,39	0,91			
LRG	62,26	0,85	LRG + Cyfra	83,25	0,93
C9	43,87	0,80	C9 + Cyfra	76,85	0,91
ACT	60,85	0,81	ACT + Cyfra	81,28	0,92
Hpt	32,08	0,74	Hpt + Cyfra	69,46	0,91
ACT + C9 + LRG	63,68	0,85	ACT + C9 + LRG + Cyfra	84,24	0,93
ACT + C9 + LRG Hpt + CFH	72,17	0,90	ACT + C9 + LRG + Hpt + CFH + Cyfra	84,24	0,94

Se: sensibilidad; Es: especificidad

Péptidos de unión reconocidos por anticuerpos adecuados para su uso en la divulgación.

SEC ID N°:	Secuencia peptídica	Anticuerpo ejemplar
1	NNSYLDEEGTWL	Bsi0358
2	FPTHNPTSPLDM	
3	DLNDPPFFTSVS	
4	TTHWDHPFYDNT	
5	AWHPSSPLDYGF	
6	ANSVVKPSSPL	

ES 2 545 515 T3

SEC ID N°:	Secuencia peptídica	Anticuerpo ejemplar
7	TSYNTDHPFHYP	
8	SPSAPSSPLDSM	
9	VRACVDCDQPFY	
10	IAPSSFLDERTD	
11	TRPHTDPPFWWA	
12	EPDPPFYTHLTA	
13	SQMKPSSHLDWD	
14	HTLPQFLEWHKR	Bsi0272
15	GQVVFQDWLLVR	
16	HENANKIAPWVQ	
17	QLKIAPWVIESP	
18	TDTLDSFLGRSP	
19	KPPRQWAPWVM	
20	IAQTLPAFLATR	
21	TETLHEFLDGRK	
22	KHLEHPTYHLWH	
23	SLNTIAPWILTA	
24	KATTHNIAWWVA	
25	HDNINMAWWVEW	
26	EWYVSTSLPLP	Bsi0352
27	HIYYISELLPM	
28	HVEYEIIQMIY	
29	SPFFYTLRVPM	
30	SSYLYTTQFVPL	
31	TGWMISTTLIPT	
32	YKYSYTTTELILI	
33	SYTYTTHLLPLA	
34	TMTQYYYSTTHY	
35	QFWTITTTLVPH	
36	GPKMDALSKAEN	Bsi0033
37	GPRWLDALFMAE	
38	HIGAHDSFETKH	
39	NNSYLDEEGTWL	Bsi0359
40	AMNTVVCYDEPC	
41	TNSPLDELGTHP	
42	STNSHEHWPMSP	
43	NHFSSLGILTAA	Bsi0271
44	IPQPSILTTPML	

ES 2 545 515 T3

SEC ID N°:	Secuencia peptídica	Anticuerpo ejemplar	
45	LRLPNTYENAKN		
46	GPLSPAHL SQRN		
47	FPLPFDP EMLPL		
48	FPLPPEYS MKKD		
49	FKIPEGNNV SVL		
50	FRLPPHDSS DHH		
51	FFLPHSATL PSH		
52	FILPHRNGY IDT		
53	LKLPNPD TAAPT		
54	NNNMGNILL ITP		
55	VLLVPHHSH QYD		
56	YLKESTHV LLA A		
57	HDDWYIST SHTD		Bsi0351
58	SYTYTTHLL PLA		
59	EWYVYEKL FPLP		
60	YKYSYTT E LILI		
61	HQYYTSSL IYT		
62	TAWHTTE E L IML		
63	NGYIFTT QLIWA		

Péptidos reconocidos por los anticuerpos usados para los ensayos de sándwich

Bsi0186	ACT	SVPWWTQSL LMS	SEC 82
		DIWSTMEHN KYN	SEC 84
		HINAIQYPL PHT	SEC 85

Referencias

- 5 Stewart, B.W. y Kleihues, P. World cancer report. 1, 181-188 (2003).
- Rivera, M.P., Detterbeck, F. y Mehta, A.C. Diagnosis of lung cancer: the guidelines. Chest 123, 129S-136S (2003).
- 10 Kulpa, J., Wojcik, E., Reinfuss, M. y Kolodziejcki, L. Carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CYFRA 21-1, and neuron-specific enolase in squamous cell lung cancer patients. Clin Chem 48, 1931-1937 (2002).
- Zolg, W. The proteomic search for diagnostic biomarkers: lost in translation? Mol Cell Proteomics 5, 1720-1726 (2006).
- 15 Beane, J., Spira, A. y Lenburg, M.E. Clinical impact of high-throughput gene expression studies in lung cancer. J Thorac Oncol 4, 109-118 (2009).
- 20 Rifai, N., Gillette, M.A. y Carr, S.A. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. Nat Biotechnol 24, 971-983 (2006).
- Gao, W.M. et al. Distinctive serum protein profiles involving abundant proteins in lung cancer patients based upon antibody microarray analysis. BMC Cancer 5, 110 (2005).
- 25 Knezevic, V. et al. Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. Proteomics 1, 1271-1278 (2001).

Maneewatch, S. et al. Human single-chain antibodies that neutralize homologous and heterologous strains and clades of influenza A virus subtype H5N1. *Antivir Ther* 14, 221-230 (2009).

5 Houimel, M. y Dellagi, K. Isolation and characterization of human neutralizing antibodies to rabies virus derived from a recombinant immune antibody library. *J Virol Methods* (2009).

Uhlen, M. et al. A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics. *Mol Cell Proteomics* 4, 1920-1932 (2005).

10 Blow, N. Antibodies: The generation game. *Nature* 447, 741-744 (2007).

Kohler, G. y Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495-497 (1975).

15 Shapiro, S.S.a.W., M. B. *Biometrika* 52, 591-611 (1965). Chu PG et al., *Histopathology* 2002, 40:403-439. Dohmoto K et al., *Int J Cancer* 2001, 91:468-473.

Stieber P., et al., *Clin. Biochem.*, 26: 301-304, 1993, y *Cancer (Phila.)* 72: 707-713,1993.

20 Stieber et al., National. Academy of. *Clinical Biochemistry Guidelines for the use of Tumor Markers in Lung Cancer*, 1-29 2006.

Pujol J-L., et al., *Cancer Res.*, 53: 61-66, 1993.

25 Ebert W et al., *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 32: 189-199, 994.

Harlow et al., *Antibodies: A laboratory Manual*, CSH Press, 1988.

Kohler et al., *Nature* 256 (1975) 495.

30 Ward et al., *Nature* 341 (1989) 544.

LISTADO DE SECUENCIAS

35 <110> Biosystems International

<120> Biomarcadores combinatorios para aplicaciones clínicas en la gestión del paciente con cáncer de pulmón

40 <130> B1123PC00

<160> 96

<170> PatentIn versión 3.3

45 <210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Péptido

50 <400> 1

Asn Asn Ser Tyr Leu Asp Glu Glu Gly Thr Trp Leu
1 5 10

55 <210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Péptido

60 <400> 2

Phe Pro Thr His Asn Pro Thr Ser Pro Leu Asp Met
1 5 10

ES 2 545 515 T3

5 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 3

Asp Leu Asn Asp Pro Pro Phe Phe Thr Ser Val Ser
1 5 10

10 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 4

Thr Thr His Trp Asp His Pro Phe Tyr Asp Asn Thr
1 5 10

20 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

25 <400> 5

Ala Trp His Pro Ser Ser Pro Leu Asp Tyr Gly Phe
1 5 10

30 <210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

35 <400> 6

Ala Asn Ser Val Val Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Leu
1 5 10

40 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 7

Thr Ser Tyr Asn Thr Asp His Pro Phe His Tyr Pro
1 5 10

45 <210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

50 <400> 8

ES 2 545 515 T3

<400> 8

Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Leu Asp Ser Met
1 5 10

5 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

10 <400> 9

Val Arg Ala Cys Val Asp Cys Asp Gln Pro Phe Tyr
1 5 10

15 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

20 <400> 10

Ile Ala Pro Ser Ser Phe Leu Asp Glu Arg Thr Asp
1 5 10

25 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 11

Thr Arg Pro His Thr Asp Pro Pro Phe Trp Trp Ala
1 5 10

35 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 12

Glu Pro Asp Pro Pro Phe Tyr Thr His Leu Thr Ala
1 5 10

45 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 13

Ser Gln Met Lys Pro Ser Ser His Leu Asp Trp Asp
1 5 10

50 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

ES 2 545 515 T3

<400> 14

His Thr Leu Pro Gln Phe Leu Glu Trp His Lys Arg
1 5 10

5 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

10 <400> 15

Gly Gln Val Val Phe Gln Asp Trp Leu Leu Val Arg
1 5 10

15 <210> 16
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

20 <400> 16

His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Ala Pro Trp Val Gln
1 5 10

25 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

30 <400> 17

Gln Leu Lys Ile Ala Pro Trp Val Ile Glu Ser Pro
1 5 10

35 <210> 18
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

40 <400> 18

Thr Asp Thr Leu Asp Ser Phe Leu Gly Arg Ser Pro
1 5 10

45 <210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

50 <400> 19

Lys Pro Pro Arg Gln Val Val Ala Pro Trp Val Met
1 5 10

55 <210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

55 <400> 20

ES 2 545 515 T3

Ile Ala Gln Thr Leu Pro Ala Phe Leu Ala Thr Arg
1 5 10

5
<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 21

Thr Glu Thr Leu His Glu Phe Leu Asp Gly Arg Lys
1 5 10

10

15
<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 22

Lys His Leu Glu His Pro Thr Tyr His Leu Trp His
1 5 10

20

25
<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 23

Ser Leu Asn Thr Ile Ala Pro Trp Ile Leu Thr Ala
1 5 10

30

35
<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 24

Lys Ala Thr Thr His Asn Ile Ala Trp Trp Val Ala
1 5 10

40

45
<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 25

His Asp Asn Ile Asn Met Ala Trp Trp Val Glu Trp
1 5 10

50

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 26

ES 2 545 515 T3

Glu Trp Tyr Val Ser Thr Ser Leu Leu Pro Leu Pro
1 5 10

5
 <210> 27
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 27

His Ile Tyr Tyr Ile Ser Glu Ser Leu Leu Pro Met
1 5 10

10
 <210> 28
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 28

His Val Glu Tyr Glu Ile Ile Glu Gln Met Ile Tyr
1 5 10

20
 <210> 29
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 29

Ser Pro Phe Phe Tyr Thr Leu Thr Arg Val Pro Met
1 5 10

30
 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 30

Ser Ser Tyr Leu Tyr Thr Thr Gln Phe Val Pro Leu
1 5 10

40
 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 31

Thr Gly Trp Met Ile Ser Thr Thr Leu Ile Pro Thr
1 5 10

50
 <210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 32

ES 2 545 515 T3

Tyr Lys Tyr Ser Tyr Thr Thr Glu Leu Ile Leu Ile
1 5 10

5
 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 33

Ser Tyr Thr Tyr Thr Thr His Leu Leu Pro Leu Ala
1 5 10

10
 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 34

Thr Met Thr Gln Tyr Tyr Tyr Ser Thr Thr His Tyr
1 5 10

20
 <210> 35
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 35

Gln Phe Trp Thr Ile Thr Thr Thr Leu Val Pro His
1 5 10

30
 <210> 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 36

Gly Pro Lys Met Asp Ala Leu Ser Lys Ala Glu Asn
1 5 10

40
 <210> 37
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 37

Gly Pro Arg Trp Leu Asp Ala Leu Phe Met Ala Glu
1 5 10

50
 <210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 38

ES 2 545 515 T3

		Ile Pro Gln Pro Ser Ile Leu Thr Thr Pro Met Leu
		1 5 10
5	<210> 45 <211> 12 <212> PRT <213> Péptido	
	<400> 45	
10		Leu Arg Leu Pro Asn Thr Tyr Glu Asn Ala Lys Asn
		1 5 10
15	<210> 46 <211> 12 <212> PRT <213> Péptido	
	<400> 46	
20		Gly Pro Leu Ser Pro Ala His Leu Ser Gln Arg Asn
		1 5 10
25	<210> 47 <211> 12 <212> PRT <213> Péptido	
	<400> 47	
30		Phe Pro Leu Pro Phe Asp Pro Glu Met Leu Pro Leu
		1 5 10
35	<210> 48 <211> 12 <212> PRT <213> Péptido	
	<400> 48	
40		Phe Pro Leu Pro Pro Glu Tyr Ser Met Lys Lys Asp
		1 5 10
45	<210> 49 <211> 12 <212> PRT <213> Péptido	
	<400> 49	
50		Phe Lys Ile Pro Glu Gly Asn Asn Val Ser Val Leu
		1 5 10
50	<210> 50 <211> 12 <212> PRT <213> Péptido	
	<400> 50	

ES 2 545 515 T3

Phe Arg Leu Pro Pro His Asp Ser Ser Asp His His
1 5 10

5
 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 51

Phe Phe Leu Pro His Ser Ala Thr Leu Pro Ser His
1 5 10

10
 15
 <210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 52

Phe Ile Leu Pro His Arg Asn Gly Tyr Ile Asp Thr
1 5 10

20
 25
 <210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 53

Leu Lys Leu Pro Asn Pro Asp Thr Ala Ala Pro Thr
1 5 10

30
 35
 <210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 54

Asn Asn Asn Met Gly Asn Ile Leu Leu Ile Thr Pro
1 5 10

40
 45
 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 55

Val Leu Leu Val Pro His His Ser His Gln Tyr Asp
1 5 10

50
 <210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 56

Tyr Leu Lys Glu Ser Thr His Val Leu Leu Ala Ala
1 5 10

5

<210> 57
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 57

His Asp Asp Trp Tyr Ile Ser Thr Ser His Thr Asp
1 5 10

10

<210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 58

15

Ser Tyr Thr Tyr Thr Thr His Leu Leu Pro Leu Ala
1 5 10

20

<210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 59

25

Glu Trp Tyr Val Tyr Glu Lys Leu Phe Pro Leu Pro
1 5 10

30

<210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 60

35

Tyr Lys Tyr Ser Tyr Thr Thr Glu Leu Ile Leu Ile
1 5 10

40

<210> 61
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 61

45

His Gln Tyr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Ile Tyr Thr
1 5 10

50

<210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 62

ES 2 545 515 T3

Thr Ala Trp His Thr Thr Glu Glu Leu Ile Met Leu
1 5 10

5
<210> 63
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 63

Asn Gly Tyr Ile Phe Thr Thr Gln Leu Ile Trp Ala
1 5 10

10

15
<210> 64
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 64

Thr Val Asn Pro Leu Leu Arg Leu Leu Ser Met Gly
1 5 10

20

25
<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 65

Asn Asn Pro Met Leu Val Leu Leu Ser His Gly Ala
1 5 10

30

35
<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 66

Thr Val Pro Gln Pro Gln Arg Leu Thr Gln Lys Ser
1 5 10

40

45
<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 67

Ala Lys Tyr Glu Ser Leu Leu Arg Met Leu Ala Ala
1 5 10

50

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 68

ES 2 545 515 T3

Gly His Glu Ser Gly Tyr His Ile Ser Glu Arg Ala
 1 5 10

5
 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 69

Gly His Glu Glu His Leu Trp Gln Ile Leu His Phe
 1 5 10

10
 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 15
 <400> 70

Gly His Glu Glu Gln Arg Asn Trp Ser Met Glu Gly

1 5 10

20
 <210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 25
 <400> 71

Ser Thr Tyr Thr Asp Met Leu Ala Asp Leu Ser Ala
 1 5 10

30
 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 35
 <400> 72

Ser Tyr Glu Ser Leu Leu Met Lys Leu Ala Arg Gly
 1 5 10

40
 <210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido
 45
 <400> 73

Tyr Arg Asp Ser Pro Gly Pro Arg Asp Lys Leu Leu
 1 5 10

50
 <210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

ES 2 545 515 T3

<400> 74

Gly His Glu Glu Arg Glu Tyr Gln Met Met Leu Gln
1 5 10

5 <210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

10 <400> 75

Cys Leu Pro Tyr Pro Leu Cys Arg Gly Thr Ala Thr
1 5 10

15 <210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

20 <400> 76

Thr Glu Cys Leu Pro Tyr Pro Leu Cys Leu Tyr Asn
1 5 10

25 <210> 77
<211> 117
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 77

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Lys Ser Ala Gly Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

30

ES 2 545 515 T3

5
<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 78

Asn Glu Thr Trp Ser Glu Phe Trp Arg Leu His Asn
1 5 10

10
<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

15
<400> 79

Thr Ala Gln Asp Asp Arg Ile Phe His Met Met His
1 5 10

20
<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido

25
<400> 80

Arg Gly Thr Gln Asp Met Glu Tyr Phe Ala Met His
1 5 10

30
<210> 81
<211> 118
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 81

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Leu
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Ser Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

5

<400> 82

Ser Val Pro Trp Trp Thr Gln Ser Leu Leu Met Ser
 1 5 10

10

<210> 83
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Péptido

15

<400> 83

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Met Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gly Ile Asn Pro Asn Lys Gly Asn Thr Asn Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu His Ser Leu Pro Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ala Asn Trp Asp Val Tyr Ala Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 84

10 Asp Ile Trp Ser Thr Met Glu His Asn Lys Tyr Asn
 1 5 10

15 <210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 85

20 His Ile Asn Ala Ile Gln Tyr Pro Leu Pro His Thr
 1 5 10

25 <210> 86
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 86

ES 2 545 515 T3

Met Thr Ser Tyr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Ala Thr Ser Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Gly Gly Ser Val Arg Phe Gly Pro Gly Val Ala Phe Arg
 20 25 30

Ala Pro Ser Ile His Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Ser
 35 40 45

Ser Ala Arg Phe Val Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Gly
 50 55 60

Tyr Gly Gly Val Leu Thr Ala Ser Asp Gly Leu Leu Ala Gly Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Met Gln Asn Leu Asn Asp Arg Leu Ala Ser Tyr Leu Asp
 85 90 95

Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val Lys Ile
 100 105 110

ES 2 545 515 T3

Arg Asp Trp Tyr Gln Lys Gln Gly Pro Gly Pro Ser Arg Asp Tyr Ser
 115 120 125

His Tyr Tyr Thr Thr Ile Gln Asp Leu Arg Asp Lys Ile Leu Gly Ala
 130 135 140

Thr Ile Glu Asn Ser Arg Ile Val Leu Gln Ile Asp Asn Ala Arg Leu
 145 150 155 160

Ala Ala Asp Asp Phe Arg Thr Lys Phe Glu Thr Glu Gln Ala Leu Arg
 165 170 175

Met Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Glu
 180 185 190

Leu Thr Leu Ala Arg Thr Asp Leu Glu Met Gln Ile Glu Gly Leu Lys
 195 200 205

Glu Glu Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Asn His Glu Glu Glu Ile Ser Thr
 210 215 220

Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Gln Val Ser Val Glu Val Asp Ser Ala
 225 230 235 240

Pro Gly Thr Asp Leu Ala Lys Ile Leu Ser Asp Met Arg Ser Gln Tyr
 245 250 255

Glu Val Met Ala Glu Gln Asn Arg Lys Asp Ala Glu Ala Trp Phe Thr
 260 265 270

Ser Arg Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Gly His Thr Glu Gln
 275 280 285

Leu Gln Met Ser Arg Ser Glu Val Thr Asp Leu Arg Arg Thr Leu Gln
 290 295 300

Gly Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala Ala Leu
 305 310 315 320

Glu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Phe Gly Ala Gln Leu Ala
 325 330 335

His Ile Gln Ala Leu Ile Ser Gly Ile Glu Ala Gln Leu Gly Asp Val
 340 345 350

Arg Ala Asp Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp
 355 360 365

Ile Lys Ser Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Ser Leu Leu
 370 375 380

Glu Gly Gln Glu Asp His Tyr Asn Asn Leu Ser Ala Ser Lys Val Leu
 385 390 395 400

5
 <210> 88
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 88

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Ile Asn Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Ile Gly Tyr Lys Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

10
 15
 <210> 89
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 89

ES 2 545 515 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Ser Trp Asn Trp Ile Arg Glu Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Thr His Tyr Tyr Gly Tyr Leu Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 90
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 90

5

ES 2 545 515 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Val Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Glu Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 91
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Péptido

<400> 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

5

10

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Val Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Glu Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 92
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Péptido
 <400> 92

5

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Glu Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

10

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
115 120

5
<210> 93
<211> 15
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 93

Asp Val Arg Ala Asp Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg
1 5 10 15

10

15
<210> 94
<211> 15
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 94

Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp Ile Lys
1 5 10 15

20

25
<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 95

Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp Ile Lys Ser Arg Leu Glu Gln
1 5 10 15

30

35
<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> Péptido

<400> 96

Met Lys Ala Ala Leu Glu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg
1 5 10 15

LISTADO DE SECUENCIAS

40
<110> Biosystems International

<120> Biomarcadores combinatorios para aplicaciones clínicas en la gestión del paciente con cáncer de pulmón
45
<130> B1123EPPC

<160> 96

50
<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
55
<213> Artificial

ES 2 545 515 T3

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

5 <400> 1

Asn Asn Ser Tyr Leu Asp Glu Glu Gly Thr Trp Leu
1 5 10

<210> 2
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 2

Phe Pro Thr His Asn Pro Thr Ser Pro Leu Asp Met
1 5 10

20 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 3

30 <210> 4
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 4

Asp Leu Asn Asp Pro Pro Phe Phe Thr Ser Val Ser
1 5 10

40 <210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 5

Thr Thr His Trp Asp His Pro Phe Tyr Asp Asn Thr
1 5 10

50 <210> 6
 <211> 12

55 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 6

Ala Trp His Pro Ser Ser Pro Leu Asp Tyr Gly Phe
1 5 10

<210> 6
 <211> 12

ES 2 545 515 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 6

Ala Asn Ser Val Val Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Leu
 1 5 10

10 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 7

20 **Thr Ser Tyr Asn Thr Asp His Pro Phe His Tyr Pro**
 1 5 10

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 8

30 **Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Leu Asp Ser Met**
 1 5 10

35 <210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 9

45 **Val Arg Ala Cys Val Asp Cys Asp Gln Pro Phe Tyr**
 1 5 10

<210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 10

55 **Ile Ala Pro Ser Ser Phe Leu Asp Glu Arg Thr Asp**
 1 5 10

ES 2 545 515 T3

5
 <210> 11
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

10
 <400> 11

Thr Arg Pro His Thr Asp Pro Pro Phe Trp Trp Ala
1 5 10

15
 <210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20
 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 12

Glu Pro Asp Pro Pro Phe Tyr Thr His Leu Thr Ala
1 5 10

25
 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

30
 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 13

Ser Gln Met Lys Pro Ser Ser His Leu Asp Trp Asp
1 5 10

35
 <210> 14
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

40
 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

45
 <400> 14

His Thr Leu Pro Gln Phe Leu Glu Trp His Lys Arg
1 5 10

50
 <210> 15
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55
 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 15

ES 2 545 515 T3

		Gly	Gln	Val	Val	Phe	Gln	Asp	Trp	Leu	Leu	Val	Arg
		1				5					10		
5		<210> 16 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial											
10		<220> <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo <400> 16											
		His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Ala	Pro	Trp	Val	Gln
		1				5					10		
15		<210> 17 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial											
20		<220> <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo <400> 17											
		Gln	Leu	Lys	Ile	Ala	Pro	Trp	Val	Ile	Glu	Ser	Pro
25		1				5					10		
30		<210> 18 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial											
35		<220> <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo <400> 18											
		Thr	Asp	Thr	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu	Gly	Arg	Ser	Pro
		1				5					10		
40		<210> 19 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial											
45		<220> <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo <400> 19											
		Lys	Pro	Pro	Arg	Gln	Val	Val	Ala	Pro	Trp	Val	Met
50		1				5					10		
55		<210> 20 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial											
		<220>											

ES 2 545 515 T3

Ser Pro Phe Phe Tyr Thr Leu Thr Arg Val Pro Met
1 5 10

5 <210> 30
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 30

Ser Ser Tyr Leu Tyr Thr Thr Gln Phe Val Pro Leu
1 5 10

15 <210> 31
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 31

Thr Gly Trp Met Ile Ser Thr Thr Leu Ile Pro Thr
1 5 10

25 <210> 32
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 32

Tyr Lys Tyr Ser Tyr Thr Thr Glu Leu Ile Leu Ile
1 5 10

35 <210> 33
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 33

Ser Tyr Thr Tyr Thr Thr His Leu Leu Pro Leu Ala
1 5 10

45 <210> 34
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55

ES 2 545 515 T3

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 39

10

	Asn	Asn	Ser	Tyr	Leu	Asp	Glu	Glu	Gly	Thr	Trp	Leu
	1				5					10		

<210> 40
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

15

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 39

20

	Ala	Met	Asn	Thr	Val	Val	Cys	Tyr	Asp	Glu	Pro	Cys
	1				5					10		

<210> 41
 <211> 12
 <212> PRT

25

<213> Artificial

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 41

30

	Thr	Asn	Ser	Pro	Leu	Asp	Glu	Leu	Gly	Thr	His	Pro
	1				5					10		

<210> 42
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 42

40

	Ser	Thr	Asn	Ser	His	Glu	His	Trp	Pro	Met	Ser	Pro
	1				5					10		

<210> 43
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 43

50

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 43

55

ES 2 545 515 T3

<400> 48

Phe Pro Leu Pro Pro Glu Tyr Ser Met Lys Lys Asp
1 5 10

5 <210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 49

Phe Lys Ile Pro Glu Gly Asn Asn Val Ser Val Leu
1 5 10

15 <210> 50
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

25 <400> 50

Phe Arg Leu Pro Pro His Asp Ser Ser Asp His His
1 5 10

30 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 51

Phe Phe Leu Pro His Ser Ala Thr Leu Pro Ser His
1 5 10

40 <210> 52
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

50 <400> 52

Phe Ile Leu Pro His Arg Asn Gly Tyr Ile Asp Thr
1 5 10

55 <210> 53
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 545 515 T3

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

5 <400> 53

Leu Lys Leu Pro Asn Pro Asp Thr Ala Ala Pro Thr
 1 5 10

<210> 54
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

15 <400> 54

Asn Asn Asn Met Gly Asn Ile Leu Leu Ile Thr Pro
 1 5 10

20 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 55

Val Leu Leu Val Pro His His Ser His Gln Tyr Asp
 1 5 10

30 <210> 56
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

40 <400> 56

Tyr Leu Lys Glu Ser Thr His Val Leu Leu Ala Ala
 1 5 10

45 <210> 57
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 57

His Asp Asp Trp Tyr Ile Ser Thr Ser His Thr Asp
 1 5 10

55 <210> 58
 <211> 12

ES 2 545 515 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 58

Ser Tyr Thr Tyr Thr Thr His Leu Leu Pro Leu Ala
1 5 10

10 <210> 59
<211> 12
<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>
<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

20 <400> 59

Glu Trp Tyr Val Tyr Glu Lys Leu Phe Pro Leu Pro
1 5 10

25 <210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 60

Tyr Lys Tyr Ser Tyr Thr Thr Glu Leu Ile Leu Ile
1 5 10

35 <210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 61

His Gln Tyr Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Ile Tyr Thr
1 5 10

50 <210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 62

Thr Ala Trp His Thr Thr Glu Glu Leu Ile Met Leu
1 5 10

ES 2 545 515 T3

Ala Lys Tyr Glu Ser Leu Leu Arg Met Leu Ala Ala
1 5 10

5 <210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 68

Gly His Glu Ser Gly Tyr His Ile Ser Glu Arg Ala
1 5 10

15 <210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 69

25 **Gly His Glu Glu His Leu Trp Gln Ile Leu His Phe**
1 5 10

30 <210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 70

Gly His Glu Glu Gln Arg Asn Trp Ser Met Glu Gly
1 5 10

40 <210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 71

Ser Thr Tyr Thr Asp Met Leu Ala Asp Leu Ser Ala
1 5 10

50 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

ES 2 545 515 T3

<400> 72

Ser Tyr Glu Ser Leu Leu Met Lys Leu Ala Arg Gly
1 5 10

5

<210> 73
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

15

<400> 73

Tyr Arg Asp Ser Pro Gly Pro Arg Asp Lys Leu Leu
1 5 10

20

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

25

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 74

Gly His Glu Glu Arg Glu Tyr Gln Met Met Leu Gln
1 5 10

30

<210> 75
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

35

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 75

Cys Leu Pro Tyr Pro Leu Cys Arg Gly Thr Ala Thr
1 5 10

40

<210> 76
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

45

<220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

50

<400> 76

Thr Glu Cys Leu Pro Tyr Pro Leu Cys Leu Tyr Asn
1 5 10

55

<210> 77
 <211> 117
 <212> PRT

ES 2 545 515 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo

5

<400> 77

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

Tyr Met His Trp Met Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Ser Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Thr Lys Ser Ala Gly Val Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 78

Asn Glu Thr Trp Ser Glu Phe Trp Arg Leu His Asn
1 5 10

20

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

25

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

30

<400> 79

ES 2 545 515 T3

Thr Ala Gln Asp Asp Arg Ile Phe His Met Met His
 1 5 10

5 <210> 80
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 80

Arg Gly Thr Gln Asp Met Glu Tyr Phe Ala Met His
 1 5 10

15 <210> 81
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo
 <400> 81

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Leu
 50 55 60

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

Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gln Ser Leu Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

25 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

30 <210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial

ES 2 545 515 T3

<220>

<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 82

5

Ser Val Pro Trp Trp Thr Gln Ser Leu Leu Met Ser
1 5 10

<210> 83

<211> 119

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo

15

<400> 83

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
20 25 30

Thr Ile His Trp Met Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Lys Gly Asn Thr Asn Phe Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

Met Glu Leu His Ser Leu Pro Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Asn Trp Asp Val Tyr Ala Val Asp Ser Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

20

<210> 84

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo

<400> 84

Asp Ile Trp Ser Thr Met Glu His Asn Lys Tyr Asn
1 5 10

30

ES 2 545 515 T3

<210> 85
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido de unión reconocido por anticuerpo
 <400> 85
 10
 His Ile Asn Ala Ile Gln Tyr Pro Leu Pro His Thr
 1 5 10

 <210> 86
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo
 20
 <400> 86

 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ala Ser Tyr
 20 25 30

 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Gly Thr Ser Leu Asp Glu Lys Phe
 50 55 60

 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Ile Gln Leu Asn Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90

 Ala Arg Glu Gly Tyr Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 25
 <210> 87
 <211> 400
 <212> PRT
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Proteína CYFRA
 <400> 87

ES 2 545 515 T3

Met Thr Ser Tyr Ser Tyr Arg Gln Ser Ser Ala Thr Ser Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Gly Gly Ser Val Arg Phe Gly Pro Gly Val Ala Phe Arg
 20 25 30

Ala Pro Ser Ile His Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Val Ser Val Ser
 35 40 45

Ser Ala Arg Phe Val Ser Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Gly Gly Gly
 50 55 60

Tyr Gly Gly Val Leu Thr Ala Ser Asp Gly Leu Leu Ala Gly Asn Glu
 65 70 75 80

Lys Leu Thr Met Gln Asn Leu Asn Asp Arg Leu Ala Ser Tyr Leu Asp
 85 90 95

Lys Val Arg Ala Leu Glu Ala Ala Asn Gly Glu Leu Glu Val Lys Ile
 100 105 110

Arg Asp Trp Tyr Gln Lys Gln Gly Pro Gly Pro Ser Arg Asp Tyr Ser
 115 120 125

His Tyr Tyr Thr Thr Ile Gln Asp Leu Arg Asp Lys Ile Leu Gly Ala
 130 135 140

Thr Ile Glu Asn Ser Arg Ile Val Leu Gln Ile Asp Asn Ala Arg Leu
 145 150 155 160

Ala Ala Asp Asp Phe Arg Thr Lys Phe Glu Thr Glu Gln Ala Leu Arg
 165 170 175

Met Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly Leu Arg Arg Val Leu Asp Glu

ES 2 545 515 T3

180 185 190

Leu Thr Leu Ala Arg Thr Asp Leu Glu Met Gln Ile Glu Gly Leu Lys
195 200 205

Glu Glu Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Asn His Glu Glu Glu Ile Ser Thr
210 215 220

Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Gln Val Ser Val Glu Val Asp Ser Ala
225 230 235 240

Pro Gly Thr Asp Leu Ala Lys Ile Leu Ser Asp Met Arg Ser Gln Tyr
245 250 255

Glu Val Met Ala Glu Gln Asn Arg Lys Asp Ala Glu Ala Trp Phe Thr
260 265 270

Ser Arg Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Gly His Thr Glu Gln
275 280 285

Leu Gln Met Ser Arg Ser Glu Val Thr Asp Leu Arg Arg Thr Leu Gln
290 295 300

Gly Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met Lys Ala Ala Leu
305 310 315 320

Glu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg Phe Gly Ala Gln Leu Ala
325 330 335

His Ile Gln Ala Leu Ile Ser Gly Ile Glu Ala Gln Leu Gly Asp Val
340 345 350

Arg Ala Asp Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp
355 360 365

Ile Lys Ser Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Ser Leu Leu
370 375 380

Glu Gly Gln Glu Asp His Tyr Asn Asn Leu Ser Ala Ser Lys Val Leu
385 390 395 400

<210> 88
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo

5

10

ES 2 545 515 T3

<400> 88

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Ile Asn Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Ala Tyr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Ile Gly Tyr Lys Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Phe Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110

- 5 <210> 89
- <211> 118
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo

<400> 89

ES 2 545 515 T3

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Ser Trp Asn Trp Ile Arg Glu Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Tyr Met
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Ser Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Thr His Tyr Tyr Gly Tyr Leu Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

5

<210> 90
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo
 <400> 90

ES 2 545 515 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Val Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asp Ser Gln Ser Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Glu Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

- <210> 91
- <211> 114
- <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo

- <400> 91

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
 1 5 10 15

ES 2 545 515 T3

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ser
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ser Arg Ile Arg Ser Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Val Asp
 50 55 60

Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asp Ser Gln Asn Met
 65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Val Arg Glu Gly Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ala

<210> 92
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Región variable de cadena pesada de anticuerpo

<400> 92

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Glu Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

5

10

ES 2 545 515 T3

Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 93
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Proteína CYFRA
 <400> 93

Asp Val Arg Ala Asp Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg
 1 5 10 15

15 <210> 94
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Proteína CYFRA
 <400> 94

Ser Glu Arg Gln Asn Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp Ile Lys
 1 5 10 15

25 <210> 95
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Proteína CYFRA
 <400> 95

Gln Glu Tyr Gln Arg Leu Met Asp Ile Lys Ser Arg Leu Glu Gln
 1 5 10 15

35 <210> 96
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Proteína CYFRA
 <400> 96

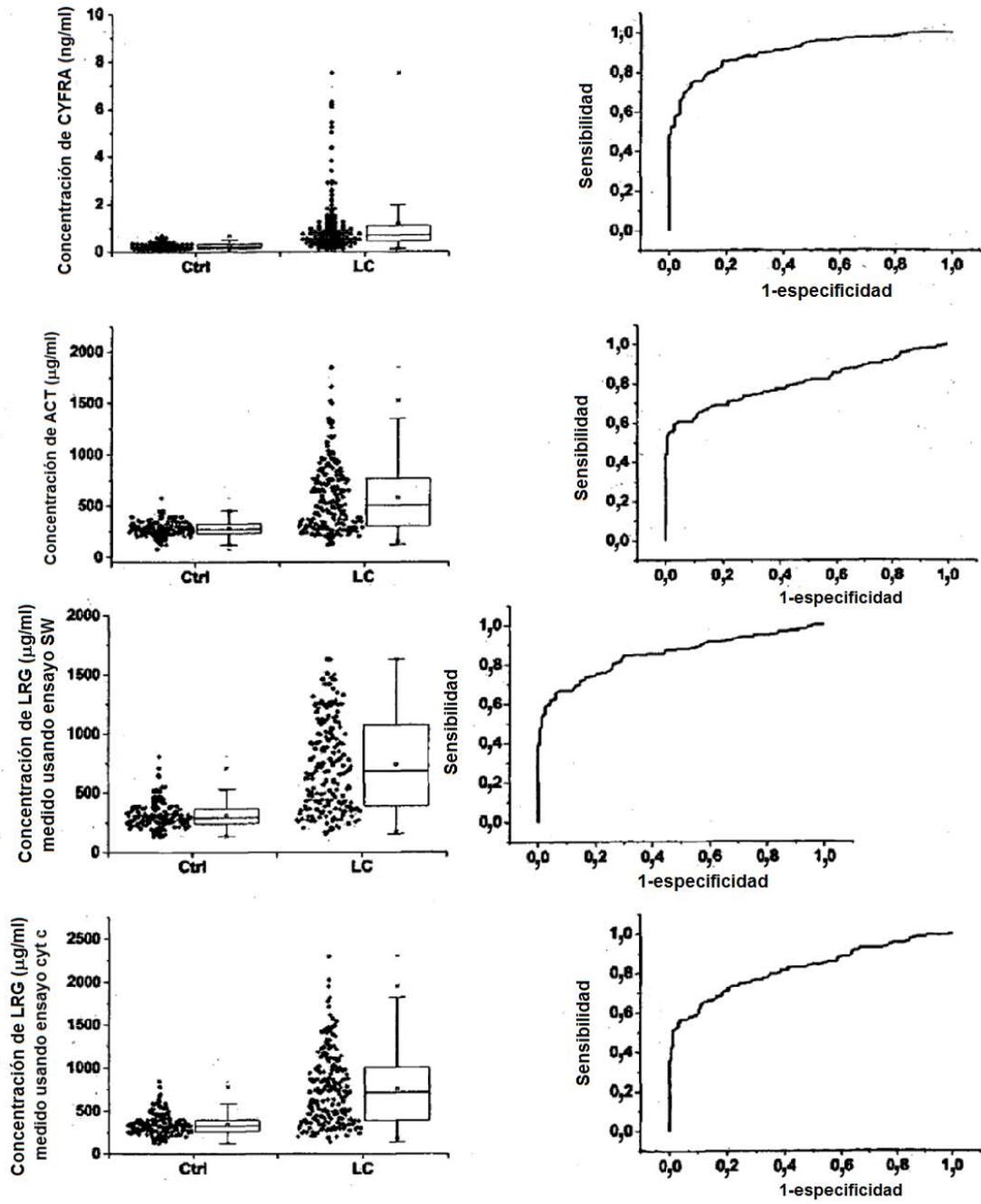
Met Lys Ala Ala Leu Glu Asp Thr Leu Ala Glu Thr Glu Ala Arg
 1 5 10 15

50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la detección, diagnóstico o determinación del estadio del cáncer de pulmón en un paciente, comprendiendo el método el análisis combinado de las proteínas CYFRA 21-1 y LRG-1, en una muestra de sangre del sujeto, proporcionando dicho análisis combinado una indicación de la presencia, estadio o progresión del cáncer de pulmón en el paciente.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que analizar dichas proteínas comprende poner en contacto la muestra, o una alícuota de la misma, con un primer reactivo de unión específico que se une a una proteína CYFRA 21-1 y con al menos un segundo reactivo específico que se une a una proteína LRG-1, y determinar la presencia o cantidad de proteína unida a dichos reactivos de unión.
- 15 3. El método de la reivindicación 2, en el que dicha puesta en contacto con los al menos 2 reactivos de unión se lleva a cabo de manera simultánea o secuencial, en la misma muestra o en diferentes alícuotas de una misma muestra.
- 20 4. El método de la reivindicación 2 o 3, en el que los reactivos de unión son anticuerpos o fragmentos de los mismos que retengan especificidad de antígeno.
- 25 5. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón en estadio I o II.
- 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer de pulmón es cáncer de pulmón en estadio Ia o IIa.
- 35 7. El método de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-LRG-1 o un fragmento del mismo es un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une a LRG-1 humana y que se une a un péptido que tiene una secuencia seleccionada entre las SEC ID N°: 26-35 y 57-63.
8. El método de la reivindicación 4, en el que el anticuerpo anti-CYFRA 21-1 o un fragmento del mismo es un anticuerpo, o un fragmento del mismo que se une a un fragmento de citoqueratina 19 humana, CYFRA21-1, o a una proteína o péptido que comprende una secuencia seleccionada entre las SEC ID N°: 93-96.
9. El uso de CYFRA 21-1 en combinación con LRG-1 como biomarcadores proteínicos para la detección, diagnóstico determinación del estadio del cáncer de pulmón en una muestra de sangre de los sujetos.
10. El uso de la reivindicación 9, para la detección de LC en estadio I, particularmente estadio Ia.
11. El uso de la reivindicación 9, para la detección de LC en estadio II, particularmente estadio IIa.

Figura 1



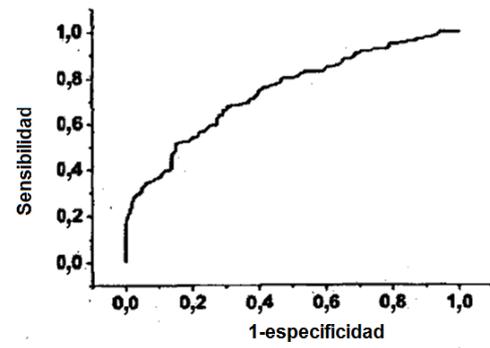
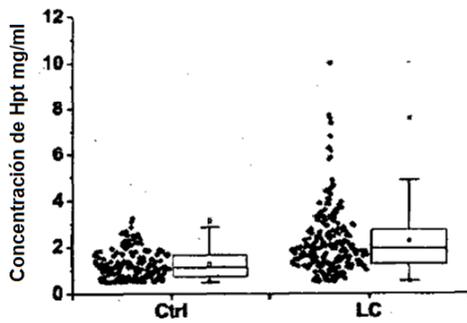
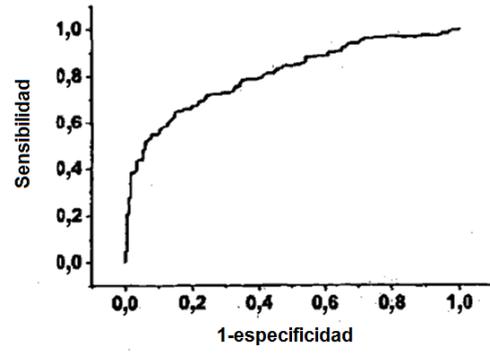
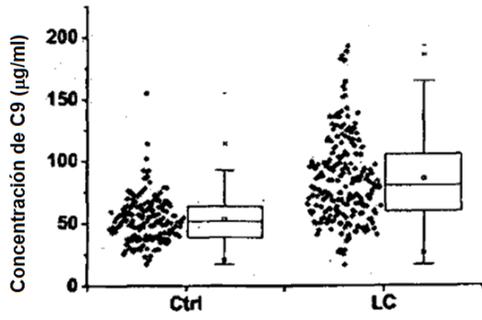
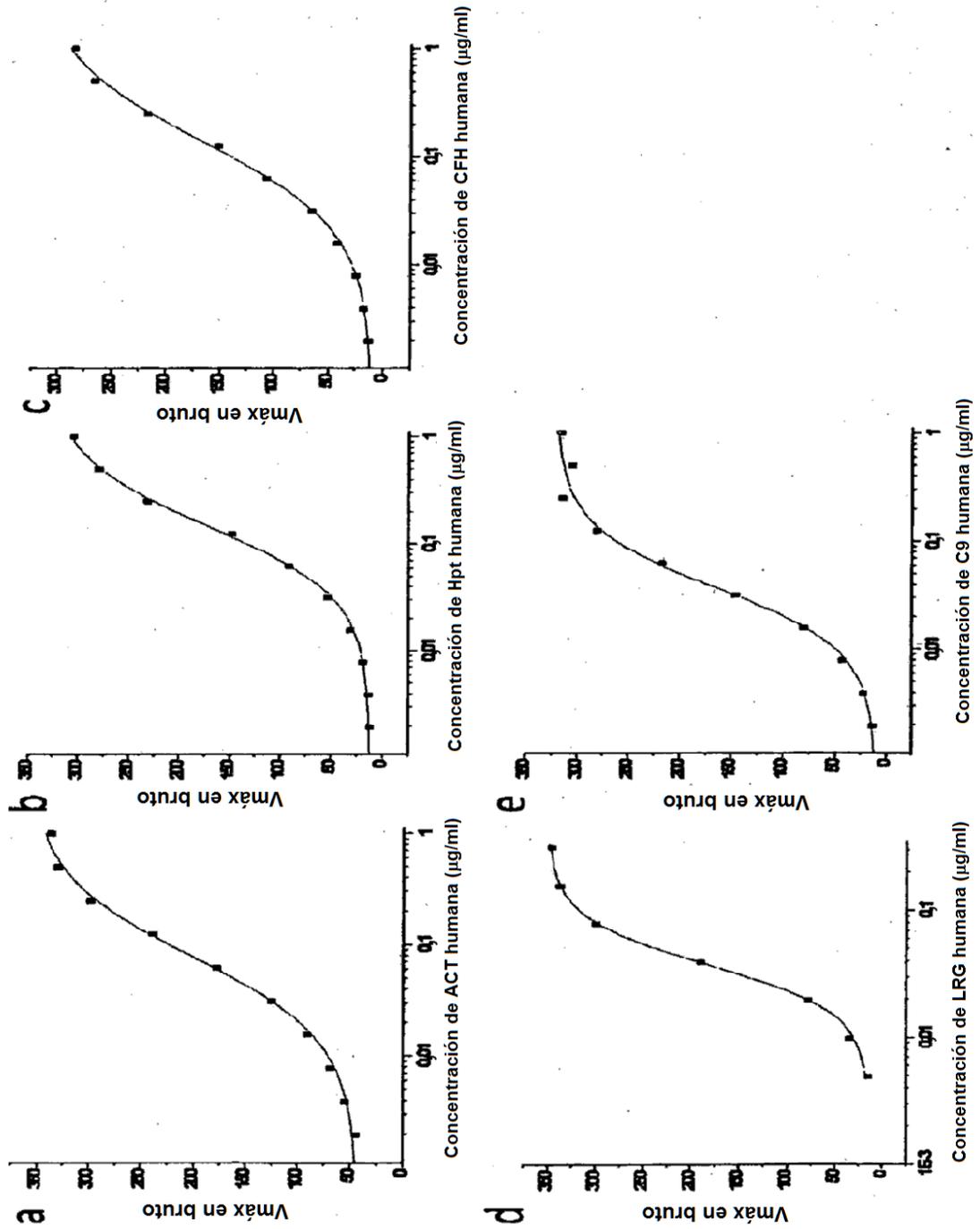


Figura 2



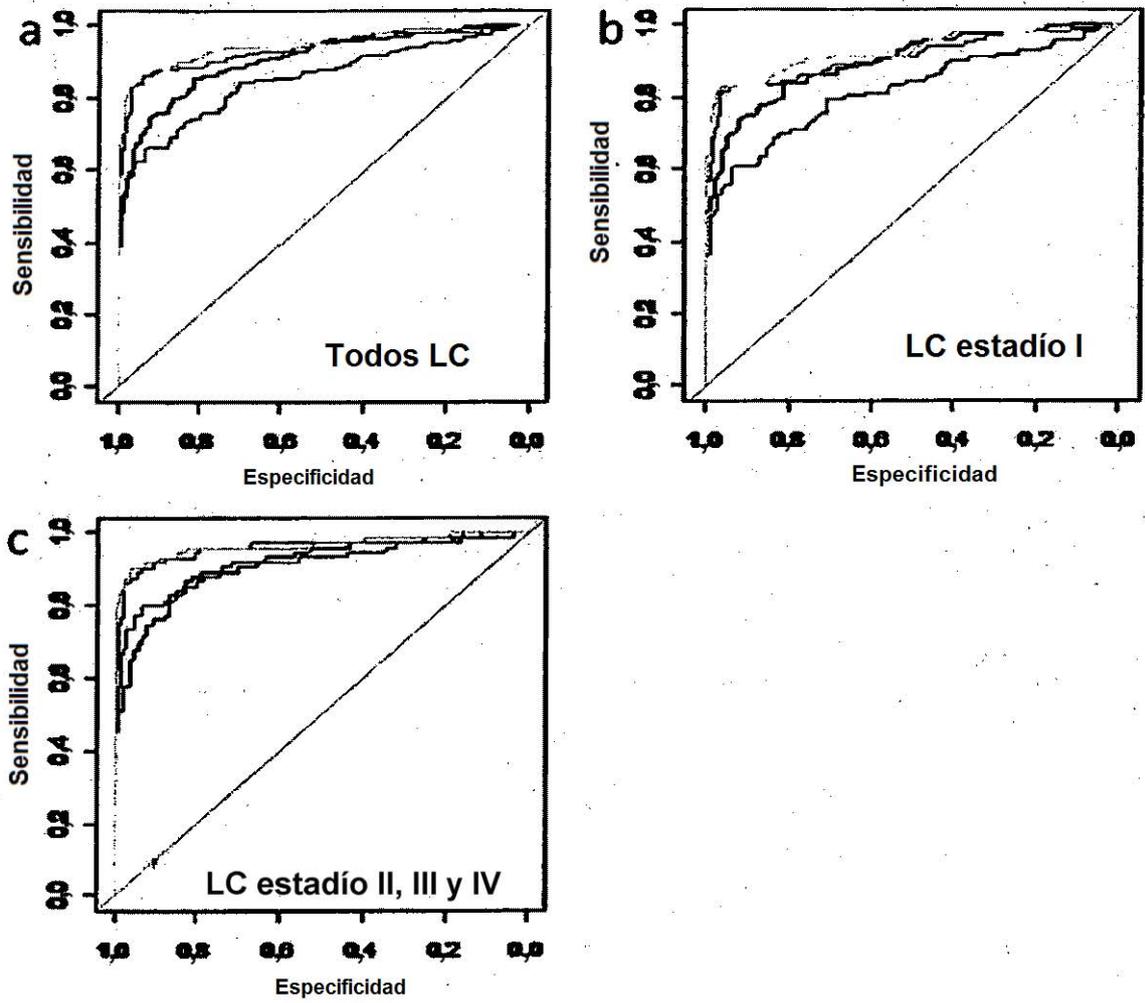


Figura 3