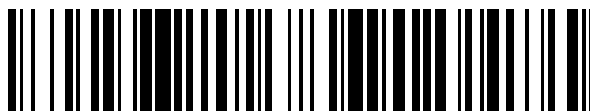


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 670 661**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.03.2013 PCT/EP2013/055823**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13143940**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2013 E 13711661 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 2831590**

54 Título: **Nuevos marcadores moleculares de cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

29.03.2012 EP 12382113

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

31.05.2018

73 Titular/es:

**PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.
(100.0%)**

**Avenida Pío XII, 22, Oficina 2
31008 Pamplona, Navarra, ES**

72 Inventor/es:

**AJONA MARTÍNEZ-POLO, DANIEL;
CORRALES PECINO, LETICIA;
MONTUENGA BADÍA, LUIS;
PAJARES VILLANDIEGO, MARÍA JOSÉ y
PÍO OSÉS, RUBÉN**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 670 661 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

Nuevos marcadores moleculares de cáncer de pulmón

5 La presente invención se refiere en líneas generales a análisis de diagnóstico y pronóstico. En particular, la presente invención se refiere al uso de fragmentos de activación de C4 como marcadores de diagnóstico y pronóstico de cáncer de pulmón. Los fragmentos de activación de C4 también pueden ser útiles para estimar el riesgo de cáncer de pulmón y decidir si debe iniciarse un régimen médico y determinar si el régimen médico iniciado es eficaz. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Cualquier materia objeto identificada en la solicitud
10 como "invención", "realización", "aspecto", etc., que supere el alcance de la invención como se representa en las reivindicaciones no forma parte de la invención reivindicada sino que solo sirve como una información básica para entender mejor la invención.

Técnica anterior

15 El cáncer de pulmón es la causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo. En los Estados Unidos, su índice de frecuencia es el segundo más alto entre hombres y mujeres y es la causa más habitual de muerte por cáncer en ambos sexos. En Europa los datos son similares, siendo el cáncer de pulmón el tercer cáncer más habitual y la causa principal de muerte por cáncer. El tabaquismo es el mayor factor de riesgo del cáncer de pulmón. Se estima
20 que aproximadamente el 90 % de las muertes por cáncer de pulmón se deben al tabaquismo.

El cáncer de pulmón comprende dos subtipos histológicos principales: cáncer de pulmón microcítico (CPM) y cáncer de pulmón no microcítico (CPNM). Representando el último del 80 al 85 % de todos los casos e incluyendo los dos tipos de cáncer de pulmón más frecuentes: adenocarcinomas y carcinomas epidermoides.

25 Independientemente de la histología, a menudo el cáncer de pulmón se detecta en fases avanzadas, cuando la enfermedad es casi incurable. Esto explica la mala tasa de supervivencia en cinco años, que ronda del 15 al 20 % de todos los tumores de cáncer de pulmón, y que es menor del 5 % en casos metastásicos. Una ausencia de técnicas eficaces para la detección precoz es una de las principales razones detrás de estas pésimas estadísticas.
30 No obstante, menos del 20 % de los pacientes se diagnostican en fases tempranas, cuando la intervención quirúrgica es posible; en consecuencia, se dedican esfuerzos intensos para aumentar significativamente el porcentaje de casos detectados precozmente.

En los últimos años, los estudios de exploración de cáncer de pulmón basados en tomografía circular (TC) a dosis
35 bajas, han reportado tasas altas de detección de cánceres microcíticos en fases tempranas (Henschke C.I. et al., 2006). En un estudio en el que participaban 50.000 personas (Aberle D.R. et al., 2011) se llegó a la conclusión de que la exploración con el uso de TC espiral detecta tumores de pulmón en fases tempranas (principalmente en fase I) y reduce la mortalidad del cáncer pulmón. Sin embargo, para ser realmente eficaz en los programas de exploración poblacionales, se requieren altos niveles de sensibilidad y especificidad. A este respecto, es
40 especialmente interesante la posibilidad de combinar técnicas radiológicas utilizando marcadores moleculares que puedan seleccionar aquellos individuos que tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer en sus pulmones. Además, estos biomarcadores pueden ayudar a confirmar la presencia de células neoplásicas y predecir su evolución y su respuesta biológica al tratamiento. En particular, en los protocolos de exploración de cáncer de pulmón basados en TC, los biomarcadores pueden ser muy útiles para discriminar cuáles de los ganglios encontrados por obtención de
45 imágenes pueden conducir a tumores más agresivos y requieren un seguimiento más activo. Desgraciadamente, a pesar de los esfuerzos realizados, la investigación de biomarcadores moleculares para el cáncer de pulmón ha tenido un éxito muy limitado y, hasta ahora, no se encuentran marcadores moleculares disponibles que puedan utilizarse de manera rutinaria para evaluar el riesgo, el diagnóstico, el pronóstico, o supervisar el tratamiento en el cáncer de pulmón.

50 Algunos estudios han sugerido que el sistema del complemento está activado en pacientes con enfermedades neoplásicas. En el caso del cáncer de pulmón, existen resultados contradictorios. Análisis inmunohistoquímicos revelaron una deposición mínima de C3b (un componente del sistema del complemento alternativo) con una ausencia aparente de activación del MAC lítico (Niehans G.A. et al., 1996). Sin embargo, en pacientes con cáncer de
55 pulmón se encontraron niveles elevados del complemento que se correlacionaban con el tamaño del tumor (Nishioka K. et al., 1976), y los componentes del complemento C3c y C4 estaban significativamente elevados en pacientes con cáncer de pulmón cuando se comparaban con un grupo de control. Muchos estudios proteómicos también han confirmado una elevación de los componentes del complemento en el plasma de pacientes con cáncer de pulmón (Oner F. et al., 2004). También se ha desvelado que la ruta clásica del complemento no está activada en pacientes
60 que padecen cáncer de pulmón porque no se detecta reducción en los niveles de C4 (Hou et al., 1985). El documento KR100925147 desvela el componente C4 de longitud completa como un biomarcador de cáncer de pulmón en secciones de tejido pulmonar. En conclusión, hasta ahora, no se dispone de marcadores moleculares que puedan utilizarse de manera rutinaria para la evaluación del riesgo, el diagnóstico, pronóstico, o supervisión del tratamiento en el cáncer de pulmón.

65

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que en pacientes que padecen cáncer de pulmón se produce la activación de la ruta clásica del complemento. En particular, han descubierto que los fragmentos de activación de C4 (FIG. 1),
 5 tales como los fragmentos de activación de C4d (C4b, iC4d y C4d, entre otros) y C4a, que pueden detectarse cuando se produce la activación del sistema del complemento clásico, se depositan en secciones de tejido pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón (véase el Ejemplo 1 y la FIG. 2). Cuando se analizan líquidos de las vías respiratorias o muestras de plasma, los fragmentos de activación de C4d se detectan en una mayor cantidad en
 10 muestras de pacientes que padecen cáncer de pulmón que en muestras de personas de control (véanse los Ejemplos 2, 3 y 4).

Asimismo, se ha descubierto que C4a, que también puede detectarse cuando se produce la activación de la ruta clásica del complemento, se encuentra en muestras de líquidos de las vías respiratorias de personas que padecen
 15 cáncer de pulmón (Ejemplo 2).

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de pulmón en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo del sujeto; y
- 20 b) comparar el nivel determinado en la etapa (a) con un nivel de control de referencia de dicho fragmento de activación de C4,

en el que si el nivel determinado en la etapa (a) es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que el sujeto padece cáncer de pulmón o que el pronóstico es malo

25 Como se ha indicado anteriormente, Hou et al. llegaron a la conclusión, después de analizar muestras de suero de pacientes con cáncer de pulmón con un anticuerpo contra C4, que en la enfermedad de cáncer de pulmón no hay una activación diferencial de la ruta clásica del complemento. Esta afirmación se basó en el hecho de que no se detectó ningún cambio en los niveles de C4.

30 Sorprendentemente, y en contra de las enseñanzas de Hou et al., los presentes inventores han descubierto que el sistema del complemento de la ruta clásica está activado en pacientes que padecen cáncer de pulmón. Esta afirmación se basa en la detección de altos niveles de fragmentos de activación de C4, tales como fragmentos de activación de C4a y C4d (que solo se producen cuando está activado el sistema del complemento), en muestras de
 35 tejido, plasma y líquidos de las vías respiratorias de pacientes cáncer de pulmón.

A partir de los datos experimentales incluidos en la presente solicitud (Ejemplo 6), también se puede llegar a la conclusión de que para identificar a un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón, también puede utilizarse, como marcador, un fragmento de activación de C4.

40 Por lo tanto, en un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para identificar un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el método:

- a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo del sujeto; y
- 45 b) comparar el nivel de la etapa (a) con un nivel de control de referencia, en el que si el nivel determinado en la etapa (a) es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que hay sospecha de que el sujeto padezca cáncer de pulmón.

50 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un método de decisión o recomendación de si iniciar un régimen médico de un sujeto que se sospecha que padece cáncer, cuyo método comprende las etapas de:

- a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo del sujeto; y
- 55 b) diagnosticar el cáncer de pulmón o determinar si hay sospecha de que el sujeto padece cáncer de pulmón, si el nivel del fragmento de activación de C4 en la muestra de ensayo es mayor que un nivel de control de referencia de dicho fragmento de activación de C4, como se define en el método del primer o segundo aspecto de la invención;

60 en el que:

- i) si al sujeto se le diagnostica que padece cáncer de pulmón, o se sospecha que padece cáncer de pulmón, entonces se recomienda iniciar el régimen médico, y
- 65 ii) si al paciente se le diagnostica que no padece cáncer de pulmón, el seguimiento se realiza opcionalmente

teniendo en cuenta el resultado de un examen del paciente efectuado por un médico.

Determinando el nivel del fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo, el experto en la técnica puede establecer, adicionalmente, cual es la terapia más adecuada que puede recomendar, porque el nivel detectado en la muestra puede reflejar el grado (es decir, la gravedad) de la enfermedad.

Además, cuando se decide que un sujeto debe iniciar un régimen médico debido a que padece, o a que se sospecha que tiene, cáncer de pulmón, puede supervisarse cuán eficaz es el régimen, utilizando como marcador el fragmento de activación de C4: una disminución o un retorno a un nivel normal del fragmento de activación de C4 (es decir, al nivel de un sujeto de control sin cáncer) puede indicar que el paciente ha reaccionado favorablemente al régimen médico y, por lo tanto, dicho régimen es eficaz; si el nivel del fragmento de activación de C4 no cambia significativamente o aumenta, esto puede indicar que el régimen no es eficaz. Por último, el nivel del fragmento de activación de C4 puede medirse después de finalizar el tratamiento para controlar las recidivas.

Por lo tanto, un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente que ya se ha diagnosticado que tiene cáncer de pulmón, comprendiendo el método las etapas de:

- a) medir *in vitro* el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra del paciente antes de la administración del régimen médico;
- (b) medir *in vitro* el nivel de dicho fragmento de activación de C4 en una muestra del paciente una vez comenzada la administración del régimen médico; y
- (c) comparar los niveles medidos en las etapas (a) y (b), de tal manera que si el nivel del fragmento de activación de C4 medido en la etapa (b) es menor que el nivel del fragmento de activación de C4 medido en la etapa (a), esto indica que el régimen médico es eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón;

o, como alternativa, el método comprende las etapas de:

- (i) medir *in vitro* el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra del paciente una vez que ha comenzado la administración del régimen médico; y
- (ii) comparar el nivel medido en la etapa (i) con un nivel de control de referencia del fragmento de activación de C4,

en el que, si el nivel del fragmento de activación de C4 medido en la etapa (i) no es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que el régimen médico es eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón.

Con el método del cuarto aspecto de la invención, puede determinarse el resultado del tratamiento (evaluación emprendida para evaluar los resultados o las consecuencias de la gestión y procedimientos utilizados para luchar contra la enfermedad para determinar la eficacia, efectividad, seguridad, practicabilidad, etc., de estas intervenciones en casos o series individuales).

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de un fragmento de activación de C4 como un marcador para el diagnóstico, pronóstico o supervisión del cáncer de pulmón, o como un marcador del riesgo de desarrollar cáncer de pulmón

Breve descripción de las figuras

FIG. 1. Estructura del componente C4 del complemento y sus fragmentos de activación. Los números a los que se hace referencia en su interior significan la posición de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de longitud completa de cualquiera de las isoformas de C4 (es decir, C4A o C4B). Además, basándose en este esquema, la expresión "fragmentos de activación de C4" se refiere a todos los productos obtenidos después de la activación de C4 (C4a, C4b, iC4b, C4c y C4d entre otros). La expresión "fragmentos de activación de C4d" se refiere a aquellos productos obtenidos después de la activación de C4 que contienen C4d en su estructura (C4b, iC4b y C4d).

FIG. 2. Inmunotinciones representativas de la deposición de C4d en especímenes de cáncer de pulmón (A-E) y en epitelio pulmonar normal (F).

En las FIG. 2 a 13, "C4d" significa fragmentos de activación de C4 que contienen C4d (C4b, iC4b y C4d, entre otros), que en su conjunto se denominan "fragmento (o fragmentos) de activación de C4d".

La FIG. 3 muestra la asociación entre la inmunotinción de C4d en tejidos primarios de cáncer de pulmón y el resultado clínico de los pacientes. Las figuras corresponden a curvas de Kaplan-Meier de supervivencia sin enfermedad y supervivencia específica de cáncer de pulmón. Los pacientes se clasificaron en inmunotinción alta

o baja utilizando como el valor límite el valor medio de la puntuación de tinción de C4d. El significado estadístico de la diferencia entre los grupos se evaluó utilizando la prueba del orden logarítmico. Línea discontinua: inmunotinción alta de C4d; línea continua: inmunotinción baja de C4d.

- 5 FIG. 4. Cuantificación de los fragmentos de activación de C4, C4d, C4a y C5a en sobrenadantes de lavado broncoalveolar de pacientes con una enfermedad respiratoria benigna y de pacientes con cáncer de pulmón. Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba de la U de Mann-Whitney. En el eje X: C= controles; T= pacientes con cáncer de pulmón.
- 10 FIG. 5. Cuantificación de los fragmentos de activación de C4, C4d, C4a y C5a en sobrenadantes de lavado broncoalveolar de pacientes con subtipos histológicos diferentes de cáncer de pulmón: ADC: adenocarcinoma (n=12); CE: carcinoma epidermoide (n=23); CPM: carcinoma de pulmón microcítico (n=9).
- 15 La FIG. 6 corresponde a una curva ROC para la cuantificación de los fragmentos de activación de C4, C5a, C4d y C4a en sobrenadantes de lavado broncoalveolar de pacientes con una enfermedad respiratoria benigna y de pacientes con cáncer de pulmón. Los valores se normalizaron con los niveles de factor H. Las áreas bajo la curva y los intervalos de confianza del 95 % fueron: C4: 0,54 (0,39-0,68; p=0,596); C5a: 0,48 (0,33-0,63; p=0,787); C4d: 0,77 (0,65-0,89; p<0,001); C4a: 0,67 (0,54-0,81; p=0,017).
- 20 FIG. 7. Cuantificación de los fragmentos de activación de C4, C4d, y proteína total en muestras de plasma de donantes sanos y de pacientes con cáncer de pulmón avanzado (fase IIIB y IV). Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. En el eje X: C= donantes sanos; T= pacientes con cáncer de pulmón avanzado.
- 25 FIG. 8: Curva ROC para la cuantificación de los fragmentos de activación de C4 y C4d en muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón avanzado (fase IIIB y IV). El área bajo la curva fue de 0,75 (intervalo de confianza del 95 % 0,65-0,84; p<0,001) para C4 y 0,86 (intervalo de confianza del 95 %, 0,78-0,93; p<0,001) para C4d.
- 30 La FIG. 9 muestra la cuantificación de los fragmentos de activación de C4 y C4d, y proteína total en muestras de plasma de personas sanas y de pacientes con cáncer de pulmón en fase temprana (fases I y II). Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. En el eje X: C= personas sanas; T= pacientes con cáncer de pulmón en fase temprana.
- 35 La FIG. 10 corresponde a una curva ROC para la cuantificación de los fragmentos de activación de C4 y C4d en muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón en fase temprana (I y II). El área bajo la curva fue de 0,45 (intervalo de confianza del 95 %, 0,34-0,55; p=0,312) para C4 y de 0,78 (intervalo de confianza del 95 %, 0,70-0,86; p<0,001) para C4d.
- 40 FIG. 11. Niveles de fragmentos de activación de C4d en pacientes con cáncer de pulmón separados por fase I frente a II (A) o por fase IA frente a IB (B). Los datos representan la media $\pm$ DT. Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.
- 45 La FIG. 12 muestra la asociación entre los niveles de los fragmentos de activación de C4 o C4d en plasma y el resultado clínico de pacientes con cáncer de pulmón y corresponde a curvas de Kaplan-Meier para la supervivencia específica de cáncer de pulmón, objeto de censura estadística al cabo de 60 meses. Los pacientes se clasificaron en nivel alto o nivel bajo utilizando como límite el valor medio de la cohorte de pacientes (3,18 μ g/ml). El significado estadístico de la diferencia entre los grupos se evaluó utilizando la prueba del orden logarítmico. Línea discontinua: niveles altos del fragmento de activación de C4d; línea continua: niveles bajos del fragmento de activación de C4d.
- 50 La FIG. 13 muestra niveles del fragmento de activación de C4d en muestras de plasma emparejadas de pacientes con cáncer de pulmón obtenidas antes y después de la extirpación quirúrgica de los tumores (muestras pre- y pos- tratamiento, respectivamente). Las muestras postratamiento se obtuvieron entre los 4 y 44 meses después de la cirugía (mediana: 7 meses). Las diferencias estadísticas se analizaron con la prueba del orden con signo de Wilcoxon.
- 55

Descripción detallada de la invención

- 60 La presente invención proporciona métodos para el diagnóstico, el pronóstico e identificación de un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón, así como métodos para decidir si iniciar un régimen médico y determinar la eficacia del mismo, todo ello basándose en la cuantificación de fragmentos de activación de C4 (FIG. 1).

En la presente invención, la expresión “fragmento de activación de C4” debe entenderse que incluye cualquiera de las moléculas que aparecen a partir de C4 por proteólisis debido a la activación del complemento. El genoma

humano tiene dos genes que codifican las isoformas de la proteína C4 “Complemento C4-A” (número de registro Uniprot: P0C0L4, Versión 78) y “Complemento C4-B” (número de registro Uniprot: P0C0L5, Versión 78), denominados de manera abreviada C4A y C4B. Por tanto, la expresión “fragmento de activación de C4” incluye los fragmentos debidos a la proteólisis de cualquiera de las isoformas C4A o C4B. Preferentemente, el fragmento de activación de C4 se selecciona del grupo que consiste en: fragmentos de activación de C4a, C4d y sus combinaciones.

En la presente invención, la expresión “fragmento de activación de C4d” debe entenderse que incluye cualquiera de las moléculas que aparecen a partir de C4 por proteólisis, con la condición de que dicha molécula o moléculas incluyan cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 (en lo sucesivo en el presente documento denominadas “secuencias de C4d”). Aunque C4 es una molécula que incluye la secuencia de C4d, esta es una precursora inactiva; por lo tanto, la expresión “fragmento de activación de C4d” no incluye a C4. La SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia de C4d de C4A (número de registro Uniprot: P0C0L4, Versión 78) y corresponde a los restos de aminoácidos 957-1336 de dicha isoforma. La SEQ ID NO: 2 corresponde a la secuencia C4d de C4B (número de registro Uniprot: P0C0L5, Versión 78) y corresponde a los restos de aminoácidos 957-1336 de dicha isoforma. Las moléculas que aparecen cuando se produce la activación del complemento y que comprenden cualquiera de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 son, entre otras, C4b, iC4b y C4d. Por tanto, cuando los métodos del primer, segundo, tercero y cuarto aspectos, así como el uso del quinto aspecto, en referencia al “fragmento de activación de C4d”, estos incluyen la determinación de C4b, iC4b, C4d o una combinación de los mismos. La expresión “combinación de los mismos” incluye la determinación de C4d+C4b, C4d+iC4b, C4b+iC4b y C4d+C4b+iC4b. En una realización preferida, “el fragmento de activación de C4d” corresponde a la combinación C4d+C4b+iC4b.

C4b se diferencia de la secuencia y estructura conformacional de C4 (cualquiera de las isoformas C4A o C4B) en la cadena alfa, en la que se produce la proteólisis. La proteólisis tiene lugar entre los aminoácidos 756-757, produciendo C4b y un pequeño fragmento conocido como C4a. Por tanto, la cadena alfa de C4b es cualquiera de SEQ ID NO: 3 o 4, dependiendo del gen a partir del cual se produzca. Las otras dos cadenas (beta y gamma) son idénticas a las de C4.

iC4b se diferencia de C4b por una escisión proteolítica entre cualquiera de los aminoácidos 956-957 o 1336-1337. Los fragmentos de activación de C4c y C4d se producen cuando tienen lugar ambas escisiones proteolíticas, en el que C4d consiste en una cualquiera de las dos “secuencias de C4d” mencionadas anteriormente.

El término “diagnóstico” es un término conocido por el experto en la técnica. Como se utiliza en el presente documento, por “diagnóstico” se entiende darse cuenta de una afección médica particular, un síndrome, una complicación o un riesgo en un sujeto; determinar la naturaleza de la enfermedad o afección; o diferenciar una enfermedad o afección de otra. Se refiere tanto al proceso de intentar determinar o identificar la posible enfermedad o trastorno como a la opinión alcanzada por este proceso. Un diagnóstico, en el sentido de un procedimiento de diagnóstico, puede considerarse como un intento de clasificar una afección de un individuo en categorías separadas y distintas que permitan tomar decisiones médicas sobre el tratamiento y realizar el pronóstico. Posteriormente, a menudo se describe una opinión sobre el diagnóstico en términos de una enfermedad u otra afección. Sin embargo, un diagnóstico puede realizarse de muchas formas. Sería cuestión de detectar la presencia de, y poner nombre a, la enfermedad, lesión, disfunción o discapacidad. Habría que atribuir una categoría para poder gestionarla o pronosticarla. Esto puede indicar cualquier grado de anomalía en un proceso continuo o tipo de anomalía en una clasificación.

El método diagnóstico *in vitro* del primer aspecto de la invención puede realizarse con una muestra de: (a) un sujeto asintomático, (b) un sujeto que ya se ha identificado como que es sospechoso de padecer cáncer de pulmón, (c) un sujeto ya diagnosticado de cáncer de pulmón, como análisis de diagnóstico de confirmación complementario o (d) un sujeto con riesgo alto de padecer la enfermedad. Para determinar si el sujeto tiene un riesgo alto de padecer cáncer de pulmón ha de determinarse si cumple con uno o más de los siguientes criterios: (a) tabaquismo; (b) factores ambientales, tales como exposición a sustancias tóxicas o carcinógenos (tabaquismo pasivo, amianto, arsénico, azufre, materia particulada, radioisótopos, radiación ionizante, níquel, cromo y otros metales pueden aumentar el riesgo del cáncer de pulmón), (c) edad; (d) infecciones por virus (por ejemplo, papiloma virus humano, virus JC, virus del simio 40, virus BK o citomegalovirus); (e) antecedentes familiares (por ejemplo, cualquiera con un pariente de primer grado - padres, hermano, hermana- con cáncer de pulmón, tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón); y (f) riesgo genético (variantes genéticas hereditarias asociadas a una predisposición a desarrollar cáncer de pulmón).

“Pronóstico”, como se usa en el presente documento, se refiere a la predicción de la progresión y resultado probables de una enfermedad. Este incluye: clasificar el neoplasma (intento de expresar en términos reproducibles el nivel de la diferenciación celular en los neoplasmas ya que un aumento de anaplasia se correlaciona con la agresividad del neoplasma), estadificar el neoplasma (intento de expresar en términos reproducibles el grado del neoplasma en el paciente).

En la presente invención, la expresión “nivel de control de referencia” en relación con los métodos del primer,

segundo, tercero y cuarto aspecto debe entenderse como un valor predefinido de un marcador molecular predeterminado, un fragmento de activación de C4 en el caso presente, que procede de los niveles de dicho marcador molecular en una muestra o grupo de muestras. Las muestras se toman de un sujeto o de un grupo de sujetos en el que la presencia, la ausencia, fase o ciclo de la enfermedad se ha determinado anteriormente de manera adecuada. Este valor se utiliza como un umbral para distinguir sujetos en los que la afección que se va a analizar está presente de aquellos en los que dicha afección no existe (es decir, sujetos que tienen cáncer de pulmón de sujetos que no lo tienen), para determinar la fase de la enfermedad, el riesgo de desarrollar o de padecer cáncer de pulmón, entre otros. Este nivel de control de referencia es también útil para determinar si el sujeto debe iniciar un régimen médico y cuán eficaz es el régimen. El sujeto, o los sujetos, de los que se obtiene el “nivel de control de referencia” pueden ser un sujeto o sujetos en los que la afección está ausente, un sujeto o sujetos en los que la afección está presente, o ambas cosas. El experto en la técnica utilizando el conocimiento general, podrá seleccionar el sujeto o grupo de sujetos más adecuado para obtener el nivel de control de referencia para cada uno de los métodos de la presente invención.

- 15 Actualmente existen métodos muy conocidos para obtener el valor de referencia a partir del grupo de sujetos seleccionado (Burtis C. A. et al., 2008, capítulo 14, sección “Statistical Treatment of Reference Values”). En un caso particular, el “nivel de control de referencia” es un valor límite definido mediante un análisis ROC (acrónimo de *receiver operating characteristics*, en español curva de eficacia diagnóstica) convencional. Como apreciará el experto en la técnica, el valor límite óptimo se definirá de acuerdo con estas aplicaciones particulares del método de diagnóstico o pronóstico: propósito, población objeto del diagnóstico o pronóstico, equilibrio entre especificidad y sensibilidad, etc.

En una realización preferida, cuando se realiza el método para determinar el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón proporcionado en la presente solicitud, los sujetos de control se seleccionan basándose en si son personas asintomáticas con un riesgo de desarrollar la enfermedad debido a uno o más de los siguientes criterios: (a) tabaquismo; (b) factores ambientales, tales como exposición a sustancias tóxicas o carcinógenos (tabaquismo pasivo, amianto, arsénico, azufre, materia particulada, radioisótopos, radiación ionizante, níquel, cromo y otros metales pueden aumentar el riesgo del cáncer de pulmón), (c) edad; (d) infecciones por virus (por ejemplo, papiloma virus humano, virus JC, virus del simio 40, virus BK o citomegalovirus); (e) antecedentes familiares (por ejemplo, cualquiera con un pariente de primer grado - padres, hermano, hermana - con cáncer de pulmón, tiene un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón); y (f) riesgo genético (variantes genéticas hereditarias asociadas a una predisposición a desarrollar cáncer de pulmón).

En una realización preferida del método del primer, segundo, tercero y cuarto aspectos de la invención, así como el uso del quinto aspecto, la molécula a detectar en la etapa (a) es un fragmento de activación de C4d.

Se ha descubierto que el nivel de los fragmentos de activación de C4d detectado en la muestra, refleja la gravedad de la enfermedad: cuanto mayor es el nivel del marcador detectado, peor es el pronóstico de la enfermedad (FIG. 3 y FIG. 9).

Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un método de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de pulmón en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4d en una muestra de ensayo del sujeto; y
b) comparar el nivel determinado en la etapa (a) con un nivel de control de referencia de dicho fragmento de activación de C4d,

en el que si el nivel determinado en la etapa (a) es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que el sujeto padece cáncer de pulmón o que el pronóstico es malo.

Se ha descubierto que el fragmento de activación de C4d permite discriminar, con alta sensibilidad y especificidad, entre controles y pacientes que padecen cáncer de pulmón (Ejemplos 2, 3 y 4, FIGS. 6, 8 y 10). Esto confiere al método del primer aspecto de la invención la capacidad de discriminar entre individuos sanos y enfermos, reduciendo la detección de positivos falsos asociados a otros métodos de diagnóstico basados en la detección de otros marcadores moleculares o la detección de ganglios con sospecha, mediante técnicas de obtención de imágenes, tales tomografía computarizada, TC.

Además, se ha descubierto que, en pacientes con cáncer de pulmón, en comparación con controles sanos, los fragmentos de activación de C4d están presentes a altas concentraciones en una fase temprana (Ejemplo 4). Como se ha indicado anteriormente, el cáncer de pulmón a menudo se detecta en fases avanzadas, cuando la enfermedad es casi incurable. Con el método de la presente invención, el diagnóstico puede realizarse a una fase temprana (porque el nivel de los fragmentos de activación de C4d es lo suficientemente alto como para que se detecte), siendo posible la intervención quirúrgica del paciente en una fase temprana. Por consiguiente, utilizando el método del primer aspecto de la invención, la tasa de supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón mejoraría.

Además, algunos de los ejemplos incluidos en la presente solicitud, muestran la valiosa información proporcionada mediante el fragmento de activación de C4d como un biomarcador de cáncer de pulmón cuando se compara con C4. Estos análisis se realizaron para determinar si los fragmentos de activación de C4d, que aparecían en plasma cuando se producía la activación del complemento de la ruta clásica, proporcionaban información diferente sobre la enfermedad de cáncer de pulmón cuando se comparaban con C4. Como se muestra en los Ejemplos 2, 3 y 4, la determinación del fragmento de activación de C4d es más selectiva y específica que la determinación de C4 cuando se analizan sus valores de diagnóstico. Además, el Ejemplo 5 ilustra que C4 no es útil como un biomarcador para proporcionar información sobre el resultado clínico de la enfermedad, al contrario que el fragmento de activación de C4d, que puede proporcionar esta información útil.

10

A partir de los datos experimentales incluidos en la presente solicitud (Ejemplo 6), se puede llegar a la conclusión de que los fragmentos de activación de C4d también pueden utilizarse como un marcador para identificar sujetos que se sospecha que padecen cáncer de pulmón.

15 Por lo tanto, en una realización preferida, la presente invención proporciona un método para identificar a un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el método:

a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4d en una muestra de ensayo del sujeto; y

20 b) comparar el nivel de la etapa (a) con un nivel de control de referencia, en el que si el nivel determinado en la etapa (a) es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que hay sospecha de que el sujeto padece cáncer de pulmón.

En una realización preferida, la presente invención proporciona un método de decisión o recomendación de si iniciar un régimen de tratamiento de un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón, cuyo método comprende las etapas de:

25 a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4d en una muestra de ensayo del sujeto; y

30 b) diagnosticar el cáncer de pulmón o determinar la sospecha de si el sujeto padece cáncer de pulmón, si el nivel del fragmento de activación de C4 en la muestra de ensayo es mayor que un nivel de control de referencia de dicho fragmento de activación de C4, como se ha definido anteriormente;

en el que:

35

i) si se diagnostica que el sujeto padece cáncer de pulmón, o que se sospecha que padece cáncer de pulmón, entonces se recomienda iniciar el régimen médico, y

ii) si se diagnostica que el paciente no padece cáncer de pulmón, el seguimiento se realiza opcionalmente teniendo en cuenta el resultado de un examen del paciente efectuado por un médico.

40

Determinando el nivel del fragmento de activación de C4d en una muestra de ensayo, el experto en la técnica puede establecer, adicionalmente, cuál es la terapia más adecuada que puede recomendarse, porque el nivel detectado en la muestra puede reflejar el grado (es decir, gravedad) de la enfermedad.

45 Además, una vez que se ha decidido iniciar el régimen médico porque el sujeto padece cáncer de pulmón, debe supervisarse cuán eficaz es el régimen: una disminución o un retorno a un nivel normal del fragmento de activación de C4d (es decir, al nivel de un sujeto sano) puede indicar que el paciente ha reaccionado favorablemente al régimen médico y, por lo tanto, dicho régimen es eficaz; si el nivel del fragmento de activación de C4d no cambia significativamente o aumenta, esto puede indicar que el régimen no es eficaz. Por último, el nivel de C4d puede medirse al final del tratamiento para controlar las recidivas.

50 Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un método para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente al cual ya se le ha diagnosticado cáncer de pulmón, comprendiendo el método las etapas de:

55

(a) medir *in vitro* el nivel de un fragmento de activación de C4d en una muestra del paciente antes de la administración del régimen médico;

(b) medir *in vitro* el nivel de dicho fragmento de activación de C4d en una muestra del paciente una vez comenzada la administración del régimen médico; y

60

(c) comparar el nivel medido en las etapas (a) y (b), de tal manera que si el nivel del fragmento de activación de C4d medido en la etapa (b) es menor que el nivel del fragmento de activación de C4d medido en la etapa (a), esto indica que el régimen médico es eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón;

o, como alternativa, el método comprende las etapas de:

65

- (i) medir *in vitro* el nivel de un fragmento de activación de C4d en una muestra del paciente una vez que ha comenzado la administración del régimen médico;
- (ii) comparar el nivel medido en la etapa (i) con un nivel de control de referencia del fragmento de activación de C4d,

5

en el que, si la cantidad del fragmento de activación de C4d medida en la etapa (i) no es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que el régimen médico es eficaz en el tratamiento del cáncer de pulmón.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona el uso de fragmentos de activación de C4d como un
10 marcador para el diagnóstico, pronóstico de cáncer de pulmón, o como un marcador para supervisar el cáncer de pulmón.

En una realización preferida del método del primer aspecto de la invención, así como el uso del quinto aspecto, la molécula a detectar en la etapa (a) es C4a.

15

El término "C4a" se refiere al fragmento de 77 aminoácidos generado por proteólisis entre los aminoácidos 756-757 de la cadena alfa de la secuencia de C4 (cualquiera de C4A o C4B) y corresponde a la SEQ ID NO: 5.

Por tanto, en una realización, la presente invención proporciona un método de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer
20 de pulmón en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:

- a) determinar, *in vitro*, el nivel de C4a en una muestra de ensayo del sujeto; y
- b) comparar el nivel de la etapa (a) con un nivel de control de referencia de dicho C4a,

25 en el que si el nivel de C4a es mayor que el del nivel de control de referencia, esto indica que el sujeto padece cáncer de pulmón o que el pronóstico es malo.

Preferentemente, los métodos de la invención son métodos de inmunoensayo. Más preferentemente el método de inmunoensayo es un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) o RIA (radioinmunoensayo).

30

Un inmunoensayo es un tipo específico de ensayo bioquímico que mide la presencia o la concentración de una sustancia (denominada "analito") en soluciones que frecuentemente contienen una mezcla compleja de sustancias. Este tipo de reacción implica la unión de un tipo de molécula, el antígeno, con un segundo tipo, el anticuerpo. Los inmunoensayos pueden realizarse utilizando bien el antígeno o el anticuerpo para ensayar el otro miembro del par
35 antígeno/anticuerpo.

En una realización, para realizar la detección de proteínas en los métodos de la presente invención, pueden utilizarse anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que tienen la capacidad de unirse a fragmentos de activación de C4d.

40

En la presente invención, la expresión "anticuerpo, o un fragmento del mismo, que tiene la capacidad de unirse a fragmentos de activación de C4d" debe entenderse como cualquier inmunoglobulina, o fragmento de la misma, que sea capaz de unirse selectivamente al antígeno definido por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. Esto incluye anticuerpos monoclonales y policlonales. La expresión "fragmento del mismo" incluye cualquier parte de un anticuerpo que tenga
45 el tamaño y la conformación adecuados para unirse a un epítipo de C4d. Los fragmentos adecuados incluyen F(ab), F(ab') y Fv. Un "epítipo" es la parte del antígeno reconocida por el sistema inmunitario (linfocitos B, linfocitos T o anticuerpos).

Cuando se realiza cualquiera de los métodos de la presente invención, el experto en la técnica puede seleccionar
50 cómo proceder cuando se seleccionan los anticuerpos. Por ejemplo, el experto en la técnica puede optar por seleccionar un solo anticuerpo o varios anticuerpos. En el caso de que el experto en la técnica opte por un solo anticuerpo para la detección combinada de C4d+C4b+iC4b, este debe de tener la capacidad de unirse a un epítipo de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, siendo dicho epítipo común a todos los fragmentos de C4d, C4b e iC4b. En el caso de que el experto en la técnica opte por varios anticuerpos, estos debe tener la capacidad de unirse a
55 diferentes epítipos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

El anticuerpo, o fragmento del mismo, para la detección de los fragmentos de activación de C4d, pueden incluirse en un kit. El kit puede comprender adicionalmente medios (aditivos, disolventes) para visualizar las interacciones entre el antígeno y el anticuerpo (tiras reactivas, reactivos quimioluminiscentes, reactivos turbidimétricos, etc.). Aunque los
60 ensayos realizados en los Ejemplos, indicados más adelante, se han efectuado con un kit que incluye un solo anticuerpo de captura con capacidad de unirse a todos los fragmentos de C4d, C4b e iC4b, la invención puede realizarse con cualquier otro anticuerpo o combinación de anticuerpos, siempre que estos reconozcan epítipos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

65 En otra realización, para realizar la detección de proteínas en los métodos de la presente invención, pueden

utilizarse anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que tengan la capacidad de unirse a C4a.

En la presente invención, la expresión "anticuerpo, o fragmento del mismo, que tenga la capacidad de unirse a C4a" debe entenderse como cualquier inmunoglobulina, o fragmento de la misma, capaz de unirse selectivamente al antígeno definido por C4a. Esto incluye anticuerpos monoclonales y policlonales. La expresión "fragmento del mismo" incluye cualquiera parte de un anticuerpo que tenga el tamaño y la conformación adecuados para unirse a un epítipo de C4a. Los fragmentos adecuados incluyen F(ab), F(ab') y Fv. Un "epítipo" es la parte del antígeno reconocida por el sistema inmunitario (linfocitos B, linfocitos T o anticuerpos).

- 10 El anticuerpo, o fragmento del mismo, para detectar C4a puede incluirse en un kit. El kit puede comprender adicionalmente medios (aditivos, disolventes) para visualizar las interacciones entre el antígeno y el anticuerpo (tiras reactivas, reactivos quimioluminiscentes, reactivos turbidimétricos, etc.).

- En una realización preferida, la muestra de ensayo se selecciona del grupo que consiste en: plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar, esputo, especímenes de biopsia y quirúrgicos.

En otra realización preferida, la muestra de control se selecciona del grupo que consiste en: plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar, esputo, especímenes de biopsia y quirúrgicos.

- 20 La muestra extraída del paciente, así como del control, puede ser una parte de tejido pulmonar extraído por biopsia o quirúrgica (utilizando técnicas habituales realizadas por un experto en la técnica), o una muestra de líquido periférico, tal como plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar o esputo, entre otras. Como se muestra más adelante, en los Ejemplos 2-3, los fragmentos de activación de C4d se detectan diferencialmente en líquido de lavado broncoalveolar y plasma de pacientes con cáncer de pulmón, con la mayor sensibilidad y especificidad. La posibilidad de diagnosticar cáncer de pulmón a partir de una muestra de plasma o de líquido de lavado broncoalveolar con alta sensibilidad y especificidad, confiere una ventaja adicional al método del primer aspecto de la invención, ya que impediría tener que realizar biopsias tisulares (que, al ser técnicas invasivas, darían lugar a complicaciones posquirúrgicas en individuos con determinados perfiles). Además, el análisis del líquido de lavado broncoalveolar o plasma puede incorporarse en protocolos de detección temprana basados en métodos de obtención de imágenes.

En la presente invención, la expresión "régimen médico" debe entenderse como que incluye cualquiera de las terapias farmacológicas (tales como quimioterapia y radioterapia) así como otras decisiones clínicas tomadas por un médico (tales como cirugía, para extirpar la parte del pulmón afectada por la enfermedad), entre otras cosas.

- 35 En la presente invención, la expresión "opcionalmente teniendo en cuenta el resultado de un examen del paciente realizado por un médico", se refiere al método del cuarto aspecto de la invención, que incluye cualquier ensayo de examen clínico útil para proporcionar pruebas de afección pulmonar.

- 40 En una realización preferida, el cáncer de pulmón se selecciona del grupo que consiste en: cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de pulmón microcítico.

A lo largo de la descripción y en las reivindicaciones, la palabra "comprende" y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Además, la palabra "comprende" y sus variaciones incluyen el término que "consiste en". Objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán obvios para los expertos en la técnica después de examinar la descripción o pueden aprenderse llevando a la práctica la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan como ilustración, y no pretenden limitar la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas descritas en el presente documento.

- 50 **Ejemplos:**

Ejemplo 1. La ruta clásica del complemento está activada en tumores primarios de pulmón

- 55 Descripción del experimento

La activación de la ruta clásica del complemento por tumores primarios de pulmón se evaluó analizando la deposición del fragmento de activación de C4d en células tumorales.

- 60 Material y métodos

Tumores de pulmón primario, extirpados de pacientes seleccionados procedentes de la Clínica Universitaria de Navarra, se fijaron en formalina y se incluyeron en parafina. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional, y todos los pacientes dieron su consentimiento firmado. Se construyó un conjunto de micromatrices tisulares y se utilizó para detección inmunohistoquímica de los fragmentos de activación de C4d de la

siguiente manera. Después de la retirada de la parafina y de la inhibición con peroxidasa (H_2O_2 al 3 %, 10min) endógena, las secciones se incubaron durante una noche a 4 °C con un anticuerpo policlonal de conejo contra C4d humano (BI-RC4d, Biomedica) diluido a 1:50 en diluyente de anticuerpo REAL (52022, Dako), seguido de la detección con el sistema Envision (K4011, Dako). Las secciones se lavaron, se tiñeron ligeramente con tinción de contraste con hematoxilina (HX090645, Merck), se deshidrataron y se montaron en bromuro de p-xileno-bis-piridinio (360294, BHD). La cuantificación de la inmunotinción del fragmento de activación de C4d fue realizada por dos observadores que desconocían las características clínicas y los resultados de los pacientes. El grado de tinción se puntuó como el porcentaje de células positivas (0-100 %), y la intensidad se evaluó comparando con un control positivo externo conocido (0, por debajo del nivel de detección; 1, débil; 2, moderado; y 3 fuerte). Las puntuaciones se calcularon multiplicando la intensidad y grado de tinción a cada nivel de intensidad.

Resultados

La deposición de los fragmentos de activación de C4d sobre tumores primarios de pulmón se evaluó mediante inmunocitoquímica para evaluar la activación de la ruta clásica del complemento. De acuerdo con las especificaciones del fabricante, el anticuerpo utilizado para esta técnica fue capaz de reconocer cualquiera de los fragmentos originados de C4d después de su activación: C4b, iC4d y/o C4d (FIG. 1). Se descubrió tinción citoplasmática en la mayoría de los tumores. En algunos de ellos, la tinción de C4d también fue aparente en la membrana celular. El epitelio normal no mostró deposición de estos fragmentos del complemento. La FIG. 2 muestra el resultado positivo de la inmunolocalización de los fragmentos de activación de C4d en algunas secciones representativas de tumor de pulmón (FIG. 2A a E). También ilustra la ausencia de tinción en epitelio alveolar normal (Figura 2F).

El resultado clínico de los pacientes se comparó con los niveles de tinción del fragmento de activación de C4d (FIG. 3). Altos niveles de fragmentos de activación de C4d se asociaron significativamente con una progresión temprana y con un empeoramiento de la supervivencia específica de cáncer de pulmón ($p=0,017$ y $p=0,016$, respectivamente).

Este resultado confirma el hecho de que los tumores de pulmón primarios son capaces de activar la ruta clásica del complemento y que esta activación está asociada a un pronóstico malo.

Ejemplo 2. Los fragmentos de activación de C4 están aumentados en líquido de lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón

Material y métodos

Setenta y ocho sujetos sometidos a broncoscopia de diagnóstico en la Clínica Universitaria de Navarra fueron incluidos consecutivamente en el estudio. La broncoscopia y la recogida de las muestras se realizaron como se describió anteriormente (Pio R. et al., 2010). Los tumores pulmonares se clasificaron de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2004 (Travis W. D. et al., 2004). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y todos los pacientes dieron su consentimiento firmado. Las muestras de lavado broncoalveolar se dividieron en dos grupos: muestras de pacientes con enfermedad pulmonar no neoplásica (grupo de control; $n=22$) y muestras de pacientes con neoplasia maligna de pulmón (grupo de tumores; $n=55$). Las enfermedades pulmonares benignas en el grupo de control y las histologías en el grupo con cáncer de pulmón ya se han descrito (Pio R. et al., 2010). Las muestras se conservaron a -80 °C hasta su análisis.

Para la determinación del marcador, las muestras se centrifugaron a 30 g durante 10 min, y los sobrenadantes se recogieron. Se utilizaron ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) disponibles en el comercio, para las determinaciones de los fragmentos de activación de C4 (EC3202-1, Assaypro), C4d (A008, Quidel), C4a (550947, BD) y C5a (DY2037, R&D). Las muestras se diluyeron a 1:1000 para C4; a 1:10 para C4d, a 1:250 para C4a y a 1:100 para C5a. A las muestras del kit por debajo del límite de cuantificación se les asignó una concentración de la mitad del límite de cuantificación.

El kit utilizado para detectar fragmentos de activación de C4d, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, es capaz de detectar C4b, C4d e iC4b.

Resultados

El hecho de que la ruta clásica del complemento esté activada en tumores pulmonares primarios no implica que los factores de activación del complemento se puedan liberar del microambiente tumoral y que se encuentren en los líquidos biológicos del paciente. Para probar esta posibilidad, se evaluó la activación de la ruta clásica del complemento en líquidos de las vías respiratorias de pacientes con cáncer de pulmón y de pacientes con enfermedades no neoplásicas.

Para esta finalidad, se cuantificaron las concentraciones de los fragmentos de activación de C4, C5a, C4d y C4a. C4 y C5a se seleccionaron basándose en su implicación previa en el cáncer. Se seleccionaron los fragmentos de

activación de C4d y C4a como marcadores específicos de la activación de la ruta clásica del complemento. Anteriormente, se había determinado la proteína total en esta serie de pacientes (Pio R. et al., 2010). Los sobrenadantes del lavado broncoalveolar de pacientes con cáncer de pulmón presentaron niveles significativamente más altos de fragmentos de activación de C4, C4d y C4a que los de pacientes sin cáncer (FIG. 4). Las concentraciones de todos los marcadores en los sujetos de control frente a los sujetos con tumor fueron, respectivamente, (media $\pm$ DT): C4: $2,43 \pm 3,12$ frente a $5,90 \pm 7,59$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,013$); C5a: $26,33 \pm 25,84$ frente a $41,37 \pm 39,66$ ng/ml ($p=0,109$); fragmentos de activación de C4d: $0,16 \pm 0,11$ frente a $0,59 \pm 0,83$ $\mu\text{g/ml}$ ($p<0,001$); C4a: $32,67 \pm 44,07$ frente a $134,9 \pm 212,2$ ng/ml ($p=0,003$). En el grupo de sujetos con cáncer, no se encontraron diferencias entre los niveles de los marcadores y la histología de los tumores (FIG. 5).

Previamente se había descrito que en los líquidos de lavado broncoalveolar había un aumento significativo en las proteínas plasmáticas, tal como el factor H (Pio R. et al., 2010). Teniendo en cuenta esto, la concentración de los componentes del complemento se normalizó (dividió) entre la concentración del factor H. En este análisis, únicamente los niveles de los fragmentos de activación de C4d/factor H y C4a/factor H fueron diferentes entre los sujetos de control y los pacientes con cáncer. Los datos fueron C4/factor H: $2,028 \pm 1,071$ frente a $2,575 \pm 2,515$ ($p=0,596$); C5a/factor H: $0,055 \pm 0,067$ frente a $0,084 \pm 0,206$ ($p=0,787$); fragmentos de activación de C4d/factor H: $0,091 \pm 0,021$ frente a $0,218 \pm 0,294$ ($p<0,001$); C4a/factor H: $0,027 \pm 0,019$ frente a $0,045 \pm 0,033$ ($p=0,017$). Estos resultados demuestran que la determinación de los elementos activados de la ruta clásica del complemento es sustancialmente diferente de la de los componentes inactivos del complemento (por ejemplo, C4) o elementos activados comunes a diferentes rutas de activación (por ejemplo C5a). En el caso de C4 y C5a, su aumento se debe probablemente a un aumento inespecífico de las proteínas plasmáticas en los líquidos de las vías respiratorias; mientras que en el caso de los fragmentos de activación de C4d y C4a, el aumento se debe a un acontecimiento relacionado con cáncer.

Se generó una curva ROC (acrónimo de *receiver operating characteristics*, en español curva de eficacia diagnóstica) para cada uno de los cuatro biomarcadores. Para impedir la influencia ejercida por las proteínas plasmáticas, la concentración de cada marcador se dividió entre la concentración de factor H. Los resultados se muestran en la FIG. 6. C4 y C5a no tuvieron la capacidad de diferenciar pacientes de controles. En cambio, los fragmentos de activación de C4d permitieron discriminar entre pacientes y controles. Se obtuvieron altas sensibilidades y especificidades a diferentes valores límite (por ejemplo, con un límite de 0,00013, la sensibilidad fue de 49 % y la especificidad de 91 %; y con un límite de 0,0007, la sensibilidad fue de 70 % y la especificidad de 81 %). C4a, también fue útil para diferenciar entre pacientes y controles.

Este estudio demuestra que los líquidos de las vías respiratorias de pacientes con cáncer de pulmón contienen concentraciones más altas de algunos componentes del complemento en comparación con los fluidos de las vías respiratorias de pacientes con enfermedades pulmonares benignas. Este estudio también ilustra la diferencia crucial en la utilidad de la determinación de los componentes del complemento previamente evaluados (tal como C4 o C5a) o elementos específicos activados de la ruta clásica (fragmentos de activación de C4d o C4a), que nunca se habían evaluado en los líquidos biológicos de pacientes con cáncer. Basándose en estos resultados, se puede llegar a la conclusión de que la determinación de los fragmentos de activación de C4 puede utilizarse para el diagnóstico de cáncer de pulmón en líquidos de las vías respiratorias.

Ejemplo 3. Los fragmentos de activación de C4d están aumentados en plasma de pacientes con cáncer de pulmón en fases avanzadas

Materia y métodos

Se obtuvieron muestras de plasma de cincuenta pacientes con cáncer de pulmón avanzado (fases IIIB y IV) y de cincuenta personas sanas, de la misma edad, sexo y antecedentes de tabaquismo (cajetillas al día por años fumando) procedentes de la Clínica Universitaria de Navarra. Los tumores de pulmón se clasificaron de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2004 (Travis W. D. et al., 2004). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y todos los pacientes dieron su consentimiento firmado.

Las determinaciones de los fragmentos de activación de C4, C4d y C5a se realizaron como se explica en el Ejemplo 2. La proteína total se midió utilizando el ensayo de proteínas BCA (23225, Pierce), con albúmina de suero bovino como patrón. Las diluciones plasmáticas fueron: $1:10^5$ para C4, $1:50$ para los fragmentos de activación de C4d, $1:100$ para C5a y $1:100$ para la proteína total. A las muestras del kit por debajo del límite de cuantificación se las asignó una concentración de la mitad del límite de cuantificación.

Resultados

La activación de la ruta clásica del complemento se evaluó en muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón en fases avanzadas (IIIB y IV) y de controles sanos. Ambos grupos eran del mismo sexo, tenían la misma edad y antecedentes de tabaquismo. Las concentraciones de los fragmentos de activación de C4, C4d y proteína

total se cuantificaron. Las muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón, presentaron niveles significativamente más altos de los fragmentos de activación de C4, C4d y proteína total en comparación con los de las muestras de voluntarios sanos (FIG. 7). Las concentraciones de todos los marcadores en los sujetos de control y en los sujetos con tumor fueron, respectivamente (media $\pm$ DT): C4: $0,73 \pm 0,27$ frente a $0,96 \pm 0,23$ mg/ml (p<0,001); fragmentos de activación de C4d: $1,86 \pm 0,95$ frente a $4,13 \pm 2,02$ μ g/ml (p<0,001); proteína total: $69,53 \pm 9,58$ frente a $76,80 \pm 11,24$ mg/ml (p=0,001). Los niveles de estos marcadores moleculares no estaban relacionados con la edad, el género o las cajetillas al día por años fumando.

Utilizando el programa informático SPSS 1.0 (FIG. 8), se generaron curvas ROC para los fragmentos de activación de C4 y C4d. Las diferencias más notables entre los pacientes con cáncer y los voluntarios normales se encontraron en la determinación de los niveles del fragmento de activación de C4d. De hecho, la determinación de los niveles del fragmento de activación de C4d fue sustancialmente superior que la determinación de los niveles de C4 para la discriminación entre pacientes y controles. Cabe destacar que se obtuvieron altas sensibilidades y especificidades a diferentes valores límite de C4d (por ejemplo, con un límite de $4,00$ μ g/ml, la sensibilidad fue de 46 % y la especificidad de 98 %; y con un límite de $2,00$ μ g/ml, la sensibilidad fue de 90 % y la especificidad de 68 %).

Este estudio resalta de nuevo la diferencia sustancial entre la determinación de los fragmentos de activación C4 y la de los fragmentos de activación de C4d. Basándose en estos resultados, se puede llegar a la conclusión de que la determinación de los fragmentos de activación de C4d puede utilizarse para el diagnóstico en sangre de cáncer de pulmón.

Ejemplo 4. Los fragmentos de activación de C4d están aumentados en plasma de pacientes con cáncer de pulmón en fases tempranas

25 Material y métodos

Se obtuvieron muestras de plasma de ochenta y cuatro pacientes con cáncer de pulmón de fases tempranas (I y II) extirpado quirúrgicamente y de cuarenta y cinco personas sanas (de la misma edad y antecedentes de tabaquismo) procedentes de la Clínica Universitaria de Navarra. Solo se incluyeron pacientes con adenocarcinoma (n=45) o carcinoma epidermoide (n=39). Los tumores pulmonares se clasificaron de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud 2004 (Travis W. D. et al., 2004). El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y todos los pacientes dieron su consentimiento firmado.

Las determinaciones de los fragmentos de activación de C4, C4d y proteína total se realizaron como se explica en los Ejemplos 2 y 3.

Resultados

La activación de la ruta clásica del complemento se evaluó en muestras de plasma de pacientes con cáncer de pulmón en fases tempranas (I y II) y de controles sanos. Ambos grupos tenían la misma edad y antecedentes de tabaquismo. Las concentraciones de los fragmentos de activación de C4, C4d y proteína total se cuantificaron. Las muestras de plasma de los pacientes con cáncer de pulmón presentaron niveles significativamente más altos de fragmentos de activación de C4d que las muestras de los voluntarios sanos (FIG. 9). No se encontraron diferencias significativas en los niveles de C4 y proteína total entre los grupos. Las concentraciones de todos los marcadores en los sujetos de control y con tumor fueron, respectivamente (media $\pm$ DT): C4: $0,94 \pm 0,36$ frente a $0,89 \pm 0,37$ mg/ml (p=0,312); fragmentos de activación de C4d: $1,13 \pm 0,69$ frente a $3,18 \pm 3,21$ μ g/ml (p<0,001); proteína total: $78,12 \pm 11,16$ frente a $79,96 \pm 24,0$ mg/ml (p=0,529). No hubo asociación estadística entre los niveles de estos marcadores moleculares y la edad, sexo, cajetillas al día por años fumando o histología.

Con los datos de las determinaciones de los fragmentos de activación de C4 y C4d se generaron curvas ROC (FIG. 10). La determinación de los fragmentos de activación de C4d permitió la discriminación entre pacientes y controles. En cambio, C4 no pudo distinguir pacientes de controles. Utilizando la determinación de C4d se obtuvieron altas sensibilidades y especificidades (por ejemplo, con un límite de $2,40$ μ g/ml, la sensibilidad fue de 44 % y la especificidad de 98 %).

Este análisis pone de manifiesto que la sangre de pacientes con cáncer de pulmón en fases tempranas contiene mayores concentraciones de fragmentos de activación de C4d pero no de C4. Basándose en estos resultados, se puede llegar a la conclusión de que la determinación de los fragmentos de activación de C4d puede utilizarse para el diagnóstico del cáncer de pulmón, incluso en el caso de pacientes en fases muy tempranas de la enfermedad.

Ejemplo 5. Los fragmentos de activación de C4d están asociados a un pronóstico de cáncer de pulmónMaterial y métodos

- 5 Para cada paciente, se analizaron los niveles de los fragmentos de activación de C4d (obtenidos en el Ejemplo 4) junto con información sobre el grado y resultado clínico de la enfermedad.

Resultados

- 10 Los cambios en la expresión de una proteína no implican ninguna asociación con el pronóstico de la enfermedad. Para evaluar la capacidad de los fragmentos de activación de C4d para predecir el resultado de los pacientes con cáncer de pulmón, se investigó la asociación entre los niveles de este marcador y las características clínico-patológicas, tales como la fase, el tamaño del tumor o la supervivencia.
- 15 En primer lugar, se evaluaron las diferencias en los niveles del fragmento de activación de C4d en plasma de pacientes con cáncer de pulmón en fase I o II (FIG. 11). Los pacientes en fase I (n=65) tuvieron niveles significativamente más bajos de fragmentos de activación de C4d en comparación con los pacientes en fase II (n=19): $2,80 \pm 2,85$ frente a $4,49 \pm 4,01$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,023$). Por otra parte, dentro de la fase I, los pacientes en fase IA (n=37) tendieron a tener niveles más bajos de fragmentos de activación de C4d en comparación con los de en fase IB (n=28): $1,96 \pm 1,10$ frente a $3,89 \pm 3,94$ $\mu\text{g/ml}$ ($p=0,078$). No se observaron diferencias estadísticas ($p=0,600$) entre pacientes en fase IIA (n=8) y IIB (n=11). No se encontraron diferencias cuando los niveles de C4 se compararon con las fases de la enfermedad: fase I frente a fase II: $0,90 \pm 0,38$ frente a $0,85 \pm 0,34$ mg/ml ($p=0,554$); fase IA frente a fase IB: $0,87 \pm 0,32$ frente a $0,96 \pm 0,44$ mg/ml ($p=0,435$).
- 25 También se examinaron las diferencias en la fase T (T1 frente a T2/T3), en el tamaño e implicación de ganglios linfáticos (N0 frente a N1). Los niveles de los fragmentos de activación de C4d eran mayores en pacientes con fases T2/T3 ($4,05 \pm 4,02$ $\mu\text{g/ml}$; n=39) que en pacientes con fase T1 ($2,42 \pm 2,04$ $\mu\text{g/ml}$, n=45), aunque las diferencias no alcanzaron un significado estadístico ($p=0,018$). Además, hubo una correlación significativa entre el tamaño del tumor y los niveles del fragmento de activación de C4d (correlación ordinal de Spearman=0,37, $p=0,001$). En el caso
- 30 del estado N, los niveles en pacientes con tumores N0 ($2,77 \pm 2,81$ $\mu\text{g/ml}$, n=68), fueron significativamente más bajos que en los pacientes con tumores N1 ($4,84 \pm 4,22$ $\mu\text{g/ml}$, n=16) ($p=0,017$). En el caso de C4, no se encontraron diferencias entre las fases T ($0,87 \pm 0,32$ frente a $0,95 \pm 0,43$ mg/ml , $p=0,791$) o estado N ($0,89 \pm 0,38$ frente a $0,89 \pm 0,35$ mg/ml , $p=0,991$).
- 35 Finalmente, el resultado clínico de los pacientes se comparó con los niveles de los fragmentos de activación de C4d o C4 en plasma (FIG. 12). Niveles altos de fragmentos de activación de C4d se asociaron significativamente con una peor supervivencia específica de cáncer de pulmón ($p<0,001$). No se encontró asociación entre la supervivencia y los niveles de C4.
- 40 Por lo tanto, se puede llegar a la conclusión de que la determinación de los fragmentos de activación de C4d puede utilizarse para el pronóstico de pacientes con cáncer de pulmón.

Ejemplo 6. Los fragmentos de activación de C4d pueden utilizarse para identificar individuos con un riesgo alto de desarrollar cáncer de pulmón

45

Material y métodos

Los niveles de los fragmentos de activación de C4d se determinaron en plasma de una cohorte anidada de individuos asintomáticos con o sin cáncer de pulmón.

50

Se utilizaron muestras de plasma de individuos incluidos en un estudio de exploración con TC en la Clínica Universitaria de Navarra. Los criterios de elegibilidad para el programa de exploración incluyeron una edad de ≥ 40 años y antecedentes de tabaquismo de 1 cajetilla al día durante 10 años. Los sujetos con síntomas de cáncer de pulmón se excluyeron del programa de exploración. El protocolo de estudio se había publicado previamente

55 (Henschke CI et al., 1999) y fue aprobado por el Comité de Ética Institucional. Todos los pacientes dieron su consentimiento firmado. La serie completa incluyó más de 2500 individuos con alto riesgo.

Se seleccionaron a treinta dos personas diagnosticadas con cáncer de pulmón después de finalizar el protocolo de exploración basándose en la disponibilidad de las muestras. Cada uno de estos casos coincidía en edad, género y

60 antecedentes de tabaquismo, obteniéndose de cuatro a cinco sujetos sin cáncer de la misma cohorte de personas (158 controles en total).

La determinación de los fragmentos de activación de C4d en las muestras de plasma diluidas a 1:50 se realizó como se explica en el Ejemplo 2.

Se utilizó la prueba de Cochran-Mantel-Haenszel para estimar las razones de probabilidades (OR, *odds ratios*) y los intervalos de confianza del 95 % para la asociación del riesgo de cáncer de pulmón con los niveles del fragmento de activación de C4d categorizados en altos y bajos utilizando diferentes límites (1, 1,5, y 2 µg/ml) y se ajustaron con respecto a la edad, el sexo y los antecedentes de tabaquismo (cajetillas al día por años fumando).

Resultados

Los niveles de los fragmentos de activación de C4d se determinaron en muestras de plasma de 115 individuos asintomáticos con alto riesgo. Treinta y dos de ellos se diagnosticaron con cáncer de pulmón en el contexto de un programa de exploración con TC. La concentración de los fragmentos de activación de C4d se cuantificó en todos los casos. Los niveles del marcador en los individuos con cáncer de pulmón eran significativamente más altos que en los que no tenían cáncer de pulmón: $1,80 \pm 1,36$ µg/ml frente a $0,80 \pm 0,47$ µg/ml ($p < 0,001$).

La asociación con el riesgo de cáncer de pulmón se evaluó utilizando una regresión logística condicional. Los niveles de los fragmentos de activación de C4d se dicotomizaron utilizando 1, 1,5 y 2 µg/ml como límite. Los individuos con niveles altos de marcador mostraron un riesgo aumentado estadísticamente significativo de cáncer de pulmón en comparación con los que tenían niveles bajos: límite 1 µg/ml: OR=5,79 (IC de 95 % = 2,43-13,76, $p < 0,001$); límite 1,5 µg/ml: OR=9,26 (IC de 95 % = 3,26-26,27, $p < 0,001$); límite 2 µg/ml: OR=54,18 (IC de 95 % = 7,01-418,84, $p < 0,001$).

Este análisis pone de manifiesto que la determinación de los fragmentos de activación de C4d es un biomarcador útil para evaluar el riesgo de cáncer de pulmón en individuos asintomáticos.

Ejemplo 7. Los fragmentos de activación de C4d pueden utilizarse como un biomarcador para obtener eficacia en el tratamiento, supervisar la respuesta al tratamiento y el avance de la enfermedad

Material y métodos

La capacidad de los fragmentos de activación de C4d, como un indicador molecular de la activación de la ruta clásica del complemento, para supervisar la respuesta al tratamiento, se evaluó en pacientes con cáncer de pulmón antes y después de la extirpación quirúrgica del tumor.

En el estudio se incluyó a diecinueve pacientes con cáncer de pulmón resecable. De cada paciente, se utilizaron muestras de plasma antes y después de la extirpación quirúrgica completa del tumor (muestras pretratamiento y postratamiento respectivamente). Los pacientes se seleccionaron basándose en la disponibilidad de las muestras y en determinaciones previas de niveles del fragmento de activación de C4d en el plasma de muestra pretratamiento (en todos los pacientes seleccionados, los niveles del fragmento de activación de C4d en el plasma de muestras pretratamiento eran mayores de 2 µg/ml). Para las muestras postratamiento, el número medio de meses después de la cirugía fue de 7 meses (intervalo: 4-44 meses). Las muestras se obtuvieron en la Clínica Universitaria de Navarra. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética Institucional y todos los pacientes dieron su consentimiento firmado.

La determinación de los fragmentos de activación de C4d en las muestras de plasma diluidas a 1:50 se realizó como se explica en el Ejemplo 2.

Resultados

En la mayoría de los casos, los niveles de los fragmentos de activación de C4d se redujeron drásticamente después de la extirpación quirúrgica del tumor (FIG. 13). De hecho, en más del 70 % de los casos (14 de 19), los niveles de los fragmentos de activación de C4d disminuyeron por debajo del límite de cuantificación del ensayo. Esta observación era independiente del tiempo transcurrido entre la cirugía y la recogida de la muestra de seguimiento.

Este resultado pone de manifiesto que los fragmentos de activación de C4d pueden utilizarse como un biomarcador de cáncer para evaluar la eficacia del tratamiento y supervisar el avance de la enfermedad.

En resumen, todos estos resultados de los experimentos demuestran que los fragmentos de activación de C4, y particularmente los fragmentos de activación de C4d, pueden utilizarse como una herramienta de diagnóstico y pronóstico para el cáncer de pulmón, con una sensibilidad y especificidad excepcionales sobre otras moléculas componentes del complemento.

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

- Aberle D.R. et al., "Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening", N. Engl. J. Med., 2011, vol. 365, págs. 395-409.

- Burtis C. A. et al., "Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry", capítulo 14: Establishment and Use of Reference values, Saunders/Elsevier, 6ª edición, St Louis, 2008, págs. 229-238)
- Henschke C.I. et al., "Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening", Lancet, 1999, vol. 354, págs. 99-105.
- Henschke C.I. et al., "Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening", N. Engl. J. Med., 2006, vol. 355, págs. 1763-1771.
- 10 - Hou et al., "Preparation of C4 antiserum and detection of complement C4 activation in plasma with crossed immunoelectrophoresis", 1985, Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao, vol. 7, págs. 473-474.
- Niehans G.A. et al., "Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin)", Am. J. Pathol., 1996, vol. 149, págs. 129-142.
- 15 - Nishioka K. et al., "The complement system in tumor immunity: significance of elevated levels of complement in tumor bearing hosts", Ann. N. Y. Acad. Sci., 1976, vol. 276, págs. 303-315.
- 20 - Oner F. et al., "Immunoglobulins and complement components in patients with lung cancer", Tuberk Toraks, 2004, vol. 52, págs. 19-23.
- Pio R. et al., "Complement factor H is elevated in bronchoalveolar lavage fluid and sputum from patients with lung cancer", Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2010, vol. 19, págs. 2665-2672.
- 25 - Travis W.D. et al., World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon: IARC Press; 2004.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 30 <110> Proyecto de Biomedicina CIMA S.L.
- <120> Nuevos marcadores de cáncer de pulmón
- 35 <130> P2219PC00
- <150> EP12382113.4
- <151> 29-03-2012
- 40 <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 45 <211> 380
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <300>
- 50 <308> Uniprot / P0C0L4
- <309> 21-07-1986
- <313> (957)..(1336)
- <400> 1

ES 2 670 661 T3

Thr	Leu	Glu	Ile	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Pro	Asn	Met	Ile	Pro	Asp	Gly
1				5					10					15	
Asp	Phe	Asn	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Thr
			20					25					30		
Leu	Gly	Ser	Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Val	Ala	Ser	Leu	Leu
		35					40					45			
Arg	Leu	Pro	Arg	Gly	Cys	Gly	Glu	Gln	Thr	Met	Ile	Tyr	Leu	Ala	Pro
	50					55					60				
Thr	Leu	Ala	Ala	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Lys	Thr	Glu	Gln	Trp	Ser	Thr
65					70					75					80
Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Lys	Asp	His	Ala	Val	Asp	Leu	Ile	Gln	Lys	Gly
				85					90					95	
Tyr	Met	Arg	Ile	Gln	Gln	Phe	Arg	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ala
			100					105					110		
Trp	Leu	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Thr	Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Lys
		115					120					125			
Val	Leu	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Pro	Glu	Lys	Leu
	130					135					140				

Gln	Glu	Thr	Ser	Asn	Trp	Leu	Leu	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Asp	Gly	Ser	
145					150					155					160	
Phe	Gln	Asp	Pro	Cys	Pro	Val	Leu	Asp	Arg	Ser	Met	Gln	Gly	Gly	Leu	
				165					170					175		
Val	Gly	Asn	Asp	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Thr	Ile	Ala	
			180					185					190			
Leu	His	His	Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Gln	Asp	Glu	Gly	Ala	Glu	Pro	Leu	
		195					200					205				
Lys	Gln	Arg	Val	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Gly	
	210					215					220					
Glu	Lys	Ala	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu	Gly	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Ile	Thr	
225					230					235					240	
Ala	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Thr	Lys	Ala	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Val	
				245					250					255		
Ala	His	Asn	Asn	Leu	Met	Ala	Met	Ala	Gln	Glu	Thr	Gly	Asp	Asn	Leu	
			260					265					270			
Tyr	Trp	Gly	Ser	Val	Thr	Gly	Ser	Gln	Ser	Asn	Ala	Val	Ser	Pro	Thr	
		275					280					285				
Pro	Ala	Pro	Arg	Asn	Pro	Ser	Asp	Pro	Met	Pro	Gln	Ala	Pro	Ala	Leu	
		290				295					300					
Trp	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Leu	His	Leu	Leu	Leu	His	Glu	
305					310					315					320	
Gly	Lys	Ala	Glu	Met	Ala	Asp	Gln	Ala	Ser	Ala	Trp	Leu	Thr	Arg	Gln	
				325					330					335		
Gly	Ser	Phe	Gln	Gly	Gly	Phe	Arg	Ser	Thr	Gln	Asp	Thr	Val	Ile	Ala	
			340					345					350			
Leu	Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Tyr	Trp	Ile	Ala	Ser	His	Thr	Thr	Glu	Glu	
		355					360					365				
Arg	Gly	Leu	Asn	Val	Thr	Leu	Ser	Ser	Thr	Gly	Arg					
	370					375					380					

ES 2 670 661 T3

5 <210> 2
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <300>
 <308> Uniprot / P0C0L5
 <309> 21-07-1986
10 <313> (957)..(1336)

 <400> 2

Thr	Leu	Glu	Ile	Pro	Gly	Asn	Ser	Asp	Pro	Asn	Met	Ile	Pro	Asp	Gly	1		5		10				15
Asp	Phe	Asn	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Thr			20		25				30
Leu	Gly	Ser	Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	Pro	Gly	Gly	Val	Ala	Ser	Leu	Leu			35		40				45
Arg	Leu	Pro	Arg	Gly	Cys	Gly	Glu	Gln	Thr	Met	Ile	Tyr	Leu	Ala	Pro			50		55				60
Thr	Leu	Ala	Ala	Ser	Arg	Tyr	Leu	Asp	Lys	Thr	Glu	Gln	Trp	Ser	Thr	65			70			75		80
Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Lys	Asp	His	Ala	Val	Asp	Leu	Ile	Gln	Lys	Gly				85			90		95
Tyr	Met	Arg	Ile	Gln	Gln	Phe	Arg	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ala			100		105				110
Trp	Leu	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Thr	Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Lys			115		120				125
Val	Leu	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln	Val	Gly	Gly	Ser	Pro	Glu	Lys	Leu			130		135				140
Gln	Glu	Thr	Ser	Asn	Trp	Leu	Leu	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Asp	Gly	Ser	145			150			155		160
Phe	Gln	Asp	Leu	Ser	Pro	Val	Ile	His	Arg	Ser	Met	Gln	Gly	Gly	Leu			165		170				175
Val	Gly	Asn	Asp	Glu	Thr	Val	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Thr	Ile	Ala			180		185				190
Leu	His	His	Gly	Leu	Ala	Val	Phe	Gln	Asp	Glu	Gly	Ala	Glu	Pro	Leu			195		200				205
Lys	Gln	Arg	Val	Glu	Ala	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Gly			210		215				220

Glu Lys Ala Ser Ala Gly Leu Leu Gly Ala His Ala Ala Ala Ile Thr
225 230 235 240

Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Thr Lys Ala Pro Val Asp Leu Leu Gly Val
245 250 255

Ala His Asn Asn Leu Met Ala Met Ala Gln Glu Thr Gly Asp Asn Leu
260 265 270

Tyr Trp Gly Ser Val Thr Gly Ser Gln Ser Asn Ala Val Ser Pro Thr
275 280 285

Pro Ala Pro Arg Asn Pro Ser Asp Pro Met Pro Gln Ala Pro Ala Leu
290 295 300

Trp Ile Glu Thr Thr Ala Tyr Ala Leu Leu His Leu Leu Leu His Glu
305 310 315 320

Gly Lys Ala Glu Met Ala Asp Gln Ala Ser Ala Trp Leu Thr Arg Gln
325 330 335

Gly Ser Phe Gln Gly Gly Phe Arg Ser Thr Gln Asp Thr Val Ile Ala
340 345 350

Leu Asp Ala Leu Ser Ala Tyr Trp Ile Ala Ser His Thr Thr Glu Glu
355 360 365

Arg Gly Leu Asn Val Thr Leu Ser Ser Thr Gly Arg
370 375 380

<210> 3

<211> 690

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Ala Leu Glu Ile Leu Gln Glu Glu Asp Leu Ile Asp Glu Asp Asp Ile
1 5 10 15

Pro Val Arg Ser Phe Phe Pro Glu Asn Trp Leu Trp Arg Val Glu Thr
20 25 30

Val Asp Arg Phe Gln Ile Leu Thr Leu Trp Leu Pro Asp Ser Leu Thr
35 40 45

Thr Trp Glu Ile His Gly Leu Ser Leu Ser Lys Thr Lys Gly Leu Cys
50 55 60

Val	Ala	Thr	Pro	Val	Gln	Leu	Arg	Val	Phe	Arg	Glu	Phe	His	Leu	His	65	70	75	80
Leu	Arg	Leu	Pro	Met	Ser	Val	Arg	Arg	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Leu	Arg	85	90	95	
Pro	Val	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Asp	Lys	Asn	Leu	Thr	Val	Ser	Val	His	100	105	110	
Val	Ser	Pro	Val	Glu	Gly	Leu	Cys	Leu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Leu	Ala	115	120	125	
Gln	Gln	Val	Leu	Val	Pro	Ala	Gly	Ser	Ala	Arg	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	130	135	140	
Val	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ser	Leu	Lys	Val	Val	Ala	Arg	145	150	155	160
Gly	Ser	Phe	Glu	Phe	Pro	Val	Gly	Asp	Ala	Val	Ser	Lys	Val	Leu	Gln	165	170	175	
Ile	Glu	Lys	Glu	Gly	Ala	Ile	His	Arg	Glu	Glu	Leu	Val	Tyr	Glu	Leu	180	185	190	
Asn	Pro	Leu	Asp	His	Arg	Gly	Arg	Thr	Leu	Glu	Ile	Pro	Gly	Asn	Ser	195	200	205	
Asp	Pro	Asn	Met	Ile	Pro	Asp	Gly	Asp	Phe	Asn	Ser	Tyr	Val	Arg	Val	210	215	220	
Thr	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Ser	Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	225	230	235	240
Pro	Gly	Gly	Val	Ala	Ser	Leu	Leu	Arg	Leu	Pro	Arg	Gly	Cys	Gly	Glu	245	250	255	
Gln	Thr	Met	Ile	Tyr	Leu	Ala	Pro	Thr	Leu	Ala	Ala	Ser	Arg	Tyr	Leu	260	265	270	
Asp	Lys	Thr	Glu	Gln	Trp	Ser	Thr	Leu	Pro	Pro	Glu	Thr	Lys	Asp	His	275	280	285	
Ala	Val	Asp	Leu	Ile	Gln	Lys	Gly	Tyr	Met	Arg	Ile	Gln	Gln	Phe	Arg	290	295	300	
Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Tyr	Ala	Ala	Trp	Leu	Ser	Arg	Asp	Ser	Ser	Thr				

ES 2 670 661 T3

305		310		315		320									
Trp	Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Lys	Val	Leu	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Gln
				325					330					335	
Val	Gly	Gly	Ser	Pro	Glu	Lys	Leu	Gln	Glu	Thr	Ser	Asn	Trp	Leu	Leu
			340					345					350		
Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Asp	Gly	Ser	Phe	Gln	Asp	Pro	Cys	Pro	Val	Leu
		355					360					365			
Asp	Arg	Ser	Met	Gln	Gly	Gly	Leu	Val	Gly	Asn	Asp	Glu	Thr	Val	Ala
	370					375					380				
Leu	Thr	Ala	Phe	Val	Thr	Ile	Ala	Leu	His	His	Gly	Leu	Ala	Val	Phe
385					390					395					400
Gln	Asp	Glu	Gly	Ala	Glu	Pro	Leu	Lys	Gln	Arg	Val	Glu	Ala	Ser	Ile
				405					410					415	
Ser	Lys	Ala	Asn	Ser	Phe	Leu	Gly	Glu	Lys	Ala	Ser	Ala	Gly	Leu	Leu
			420					425					430		
Gly	Ala	His	Ala	Ala	Ala	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ala	Leu	Ser	Leu	Thr	Lys
		435					440					445			
Ala	Pro	Val	Asp	Leu	Leu	Gly	Val	Ala	His	Asn	Asn	Leu	Met	Ala	Met
	450					455					460				
Ala	Gln	Glu	Thr	Gly	Asp	Asn	Leu	Tyr	Trp	Gly	Ser	Val	Thr	Gly	Ser
465					470					475					480
Gln	Ser	Asn	Ala	Val	Ser	Pro	Thr	Pro	Ala	Pro	Arg	Asn	Pro	Ser	Asp
				485					490					495	
Pro	Met	Pro	Gln	Ala	Pro	Ala	Leu	Trp	Ile	Glu	Thr	Thr	Ala	Tyr	Ala
			500					505					510		
Leu	Leu	His	Leu	Leu	Leu	His	Glu	Gly	Lys	Ala	Glu	Met	Ala	Asp	Gln
		515					520					525			
Ala	Ser	Ala	Trp	Leu	Thr	Arg	Gln	Gly	Ser	Phe	Gln	Gly	Gly	Phe	Arg
	530					535					540				
Ser	Thr	Gln	Asp	Thr	Val	Ile	Ala	Leu	Asp	Ala	Leu	Ser	Ala	Tyr	Trp
545					550					555					560

Ile Ala Ser His Thr Thr Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Leu Ser
565 570 575

Ser Thr Gly Arg Asn Gly Phe Lys Ser His Ala Leu Gln Leu Asn Asn
580 585 590

Arg Gln Ile Arg Gly Leu Glu Glu Glu Leu Gln Phe Ser Leu Gly Ser
595 600 605

Lys Ile Asn Val Lys Val Gly Gly Asn Ser Lys Gly Thr Leu Lys Val
610 615 620

Leu Arg Thr Tyr Asn Val Leu Asp Met Lys Asn Thr Thr Cys Gln Asp
625 630 635 640

Leu Gln Ile Glu Val Thr Val Lys Gly His Val Glu Tyr Thr Met Glu
645 650 655

Ala Asn Glu Asp Tyr Glu Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Leu Pro Ala Lys
660 665 670

Asp Asp Pro Asp Ala Pro Leu Gln Pro Val Thr Pro Leu Gln Leu Phe
675 680 685

Glu Gly
690

<210> 4

<211> 690

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Ala Leu Glu Ile Leu Gln Glu Glu Asp Leu Ile Asp Glu Asp Asp Ile
1 5 10 15

Pro Val Arg Ser Phe Phe Pro Glu Asn Trp Leu Trp Arg Val Glu Thr
20 25 30

Val Asp Arg Phe Gln Ile Leu Thr Leu Trp Leu Pro Asp Ser Leu Thr
35 40 45

Thr Trp Glu Ile His Gly Leu Ser Leu Ser Lys Thr Lys Gly Leu Cys
50 55 60

Val Ala Thr Pro Val Gln Leu Arg Val Phe Arg Glu Phe His Leu His
65 70 75 80

5

10

Leu Arg Leu Pro Met Ser Val Arg Arg Phe Glu Gln Leu Glu Leu Arg
 85 90 95
 Pro Val Leu Tyr Asn Tyr Leu Asp Lys Asn Leu Thr Val Ser Val His
 100 105 110
 Val Ser Pro Val Glu Gly Leu Cys Leu Ala Gly Gly Gly Gly Leu Ala
 115 120 125
 Gln Gln Val Leu Val Pro Ala Gly Ser Ala Arg Pro Val Ala Phe Ser
 130 135 140
 Val Val Pro Thr Ala Ala Ala Ala Val Ser Leu Lys Val Val Ala Arg
 145 150 155 160
 Gly Ser Phe Glu Phe Pro Val Gly Asp Ala Val Ser Lys Val Leu Gln
 165 170 175
 Ile Glu Lys Glu Gly Ala Ile His Arg Glu Glu Leu Val Tyr Glu Leu
 180 185 190
 Asn Pro Leu Asp His Arg Gly Arg Thr Leu Glu Ile Pro Gly Asn Ser
 195 200 205
 Asp Pro Asn Met Ile Pro Asp Gly Asp Phe Asn Ser Tyr Val Arg Val
 210 215 220
 Thr Ala Ser Asp Pro Leu Asp Thr Leu Gly Ser Glu Gly Ala Leu Ser
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Val Ala Ser Leu Leu Arg Leu Pro Arg Gly Cys Gly Glu
 245 250 255
 Gln Thr Met Ile Tyr Leu Ala Pro Thr Leu Ala Ala Ser Arg Tyr Leu
 260 265 270
 Asp Lys Thr Glu Gln Trp Ser Thr Leu Pro Pro Glu Thr Lys Asp His
 275 280 285
 Ala Val Asp Leu Ile Gln Lys Gly Tyr Met Arg Ile Gln Gln Phe Arg
 290 295 300
 Lys Ala Asp Gly Ser Tyr Ala Ala Trp Leu Ser Arg Asp Ser Ser Thr
 305 310 315 320
 Trp Leu Thr Ala Phe Val Leu Lys Val Leu Ser Leu Ala Gln Glu Gln
 325 330 335

Val Gly Gly Ser Pro Glu Lys Leu Gln Glu Thr Ser Asn Trp Leu Leu
 340 345 350
 Ser Gln Gln Gln Ala Asp Gly Ser Phe Gln Asp Leu Ser Pro Val Ile
 355 360 365
 His Arg Ser Met Gln Gly Gly Leu Val Gly Asn Asp Glu Thr Val Ala
 370 375 380
 Leu Thr Ala Phe Val Thr Ile Ala Leu His His Gly Leu Ala Val Phe
 385 390 395 400
 Gln Asp Glu Gly Ala Glu Pro Leu Lys Gln Arg Val Glu Ala Ser Ile
 405 410 415
 Ser Lys Ala Asn Ser Phe Leu Gly Glu Lys Ala Ser Ala Gly Leu Leu
 420 425 430
 Gly Ala His Ala Ala Ala Ile Thr Ala Tyr Ala Leu Ser Leu Thr Lys
 435 440 445
 Ala Pro Val Asp Leu Leu Gly Val Ala His Asn Asn Leu Met Ala Met
 450 455 460
 Ala Gln Glu Thr Gly Asp Asn Leu Tyr Trp Gly Ser Val Thr Gly Ser
 465 470 475 480
 Gln Ser Asn Ala Val Ser Pro Thr Pro Ala Pro Arg Asn Pro Ser Asp
 485 490 495
 Pro Met Pro Gln Ala Pro Ala Leu Trp Ile Glu Thr Thr Ala Tyr Ala
 500 505 510
 Leu Leu His Leu Leu Leu His Glu Gly Lys Ala Glu Met Ala Asp Gln
 515 520 525
 Ala Ser Ala Trp Leu Thr Arg Gln Gly Ser Phe Gln Gly Gly Phe Arg
 530 535 540
 Ser Thr Gln Asp Thr Val Ile Ala Leu Asp Ala Leu Ser Ala Tyr Trp
 545 550 555 560
 Ile Ala Ser His Thr Thr Glu Glu Arg Gly Leu Asn Val Thr Leu Ser
 565 570 575
 Ser Thr Gly Arg Asn Gly Phe Lys Ser His Ala Leu Gln Leu Asn Asn
 580 585 590

ES 2 670 661 T3

Arg Gln Ile Arg Gly Leu Glu Glu Glu Leu Gln Phe Ser Leu Gly Ser
595 600 605

Lys Ile Asn Val Lys Val Gly Gly Asn Ser Lys Gly Thr Leu Lys Val
610 615 620

Leu Arg Thr Tyr Asn Val Leu Asp Met Lys Asn Thr Thr Cys Gln Asp
625 630 635 640

Leu Gln Ile Glu Val Thr Val Lys Gly His Val Glu Tyr Thr Met Glu
645 650 655

Ala Asn Glu Asp Tyr Glu Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Leu Pro Ala Lys
660 665 670

Asp Asp Pro Asp Ala Pro Leu Gln Pro Val Thr Pro Leu Gln Leu Phe
675 680 685

Glu Gly
690

<210> 5

<211> 77

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Asn Val Asn Phe Gln Lys Ala Ile Asn Glu Lys Leu Gly Gln Tyr Ala
1 5 10 15

Ser Pro Thr Ala Lys Arg Cys Cys Gln Asp Gly Val Thr Arg Leu Pro
20 25 30

Met Met Arg Ser Cys Glu Gln Arg Ala Ala Arg Val Gln Gln Pro Asp
35 40 45

Cys Arg Glu Pro Phe Leu Ser Cys Cys Gln Phe Ala Glu Ser Leu Arg
50 55 60

Lys Lys Ser Arg Asp Lys Gly Gln Ala Gly Leu Gln Arg
65 70 75

10

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de pulmón en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
5
a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo del sujeto; y
b) comparar el nivel determinado en la etapa (a) con un nivel de control de referencia de dicho fragmento de activación de C4,
10 en el que si el nivel determinado en la etapa (a) es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que el sujeto padece cáncer de pulmón o que el pronóstico es malo.
2. Un método de identificación de un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón, comprendiendo el método:
15
a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo del sujeto, y
b) comparar el nivel de la etapa (a) con un nivel de control de referencia, en el que si el nivel determinado en la etapa (a) es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que hay sospecha de que el sujeto padece cáncer de pulmón.
20
3. Un método de decisión o recomendación de que un sujeto que se sospecha que padece cáncer de pulmón inicie un régimen médico, comprendiendo el método las etapas de:
25
a) determinar, *in vitro*, el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra de ensayo del sujeto; y
b) diagnosticar el cáncer de pulmón o determinar que el sujeto es sospechoso de padecer cáncer de pulmón, si el nivel de fragmento de activación de C4 en la muestra de ensayo es mayor que un nivel de control de referencia de dicho fragmento de activación de C4, como se define en el método de la reivindicación 1 o reivindicación 2;
30 en el que:
i) si se diagnostica que el sujeto padece cáncer de pulmón, o se sospecha que padece cáncer de pulmón, entonces se recomienda iniciar el régimen médico, y
ii) si se diagnostica que el paciente no padece cáncer de pulmón, el seguimiento se realiza opcionalmente
35 teniendo en cuenta el resultado de un examen del paciente efectuado por un médico.
4. Un método para determinar la eficacia de un régimen médico en un paciente al que ya se le ha diagnosticado cáncer de pulmón, comprendiendo el método las etapas de:
40 (a) medir *in vitro* el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra del paciente antes de la administración del régimen médico;
(b) medir *in vitro* el nivel de dicho fragmento de activación de C4 en una muestra del paciente una vez iniciada la administración del régimen médico; y
(c) comparar los niveles medidos en las etapas (a) y (b), de tal manera que si el nivel del fragmento de activación
45 de C4 medido en la etapa (b) es menor que el nivel del fragmento de activación de C4 medido en la etapa (a), indica que el régimen médico es eficaz en el tratamiento de cáncer de pulmón;
o, como alternativa, el método comprende las etapas de:
50 (i) medir *in vitro* el nivel de un fragmento de activación de C4 en una muestra del paciente una vez iniciada la administración del régimen médico; y
(ii) comparar el nivel medido en la etapa (i) con un nivel de control de referencia del fragmento de activación de C4,
55 en el que, si el nivel del fragmento de activación de C4 medido en la etapa (i) no es mayor que el nivel de control de referencia, esto indica que el régimen médico es eficaz en el tratamiento de cáncer de pulmón.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra de ensayo se selecciona de:
60 plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar, esputo, especímenes de biopsia y quirúrgicos.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la muestra de control se selecciona de:
65

plasma, suero, líquido de lavado broncoalveolar, esputo, especímenes de biopsia y quirúrgicos.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el cáncer de pulmón se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de pulmón microcítico.

5

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que es un inmunoensayo.

9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que se determina el nivel de un fragmento de activación de C4d, debiéndose el fragmento de activación de C4d a la proteólisis de C4 y comprendiendo o bien la secuencia de SEQ ID NO: 1 o de SEQ ID NO: 2 y siempre que no incluya la secuencia completa de C4.

10

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1-9, en el que se determina el nivel de C4a.

11. Uso de un fragmento de activación de C4 como marcador diagnóstico o pronóstico de cáncer de pulmón, o como marcador de seguimiento de cáncer de pulmón.

15

12. Uso de un fragmento de activación de C4d que se debe a la proteólisis de C4 y que comprende o bien la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2, siempre que no incluya la secuencia completa de C4, como marcador diagnóstico o pronóstico de cáncer de pulmón, o como marcador de seguimiento de cáncer de pulmón.

20

13. Uso de C4a como marcador diagnóstico de cáncer de pulmón.

FIG. 1

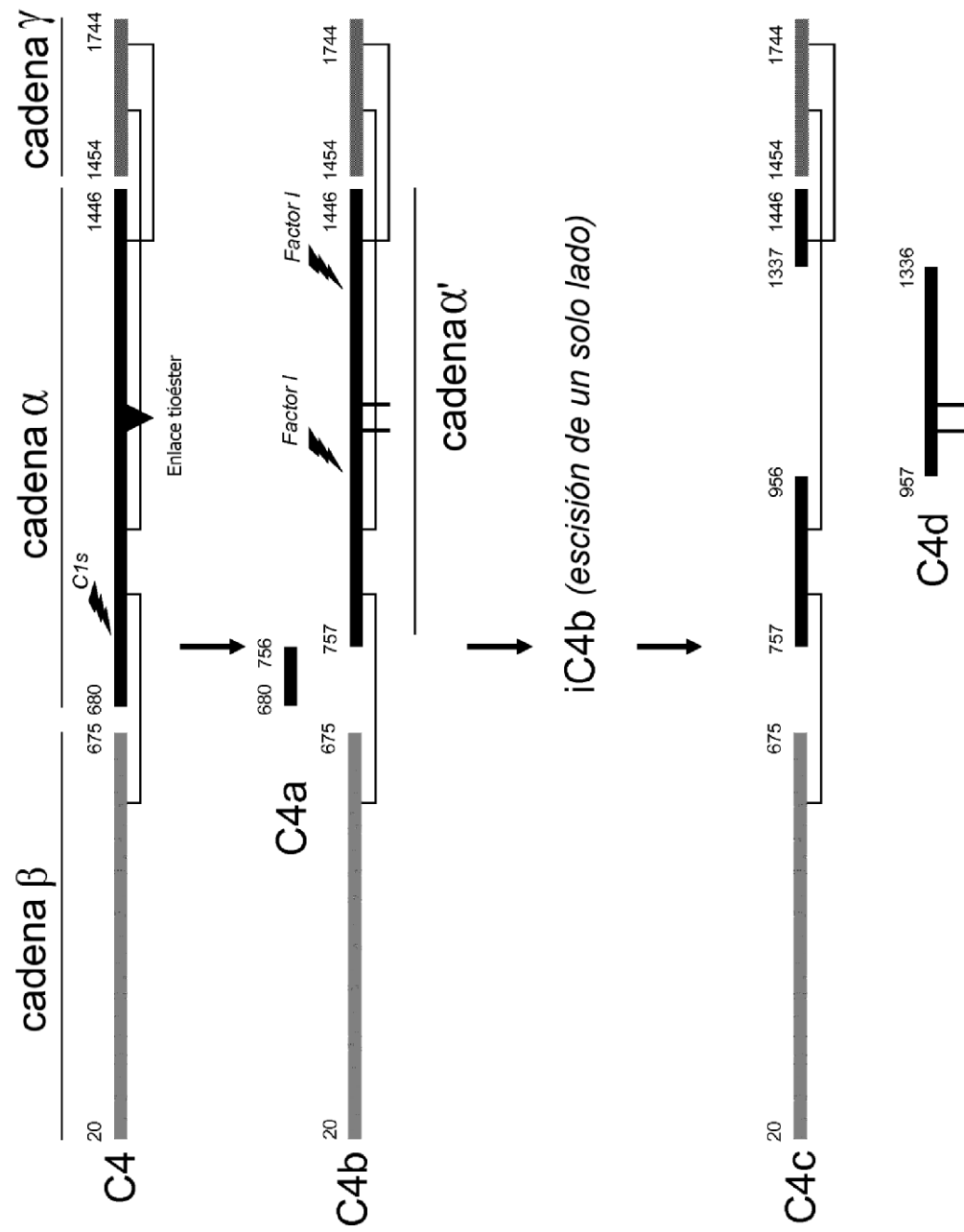


FIG. 2

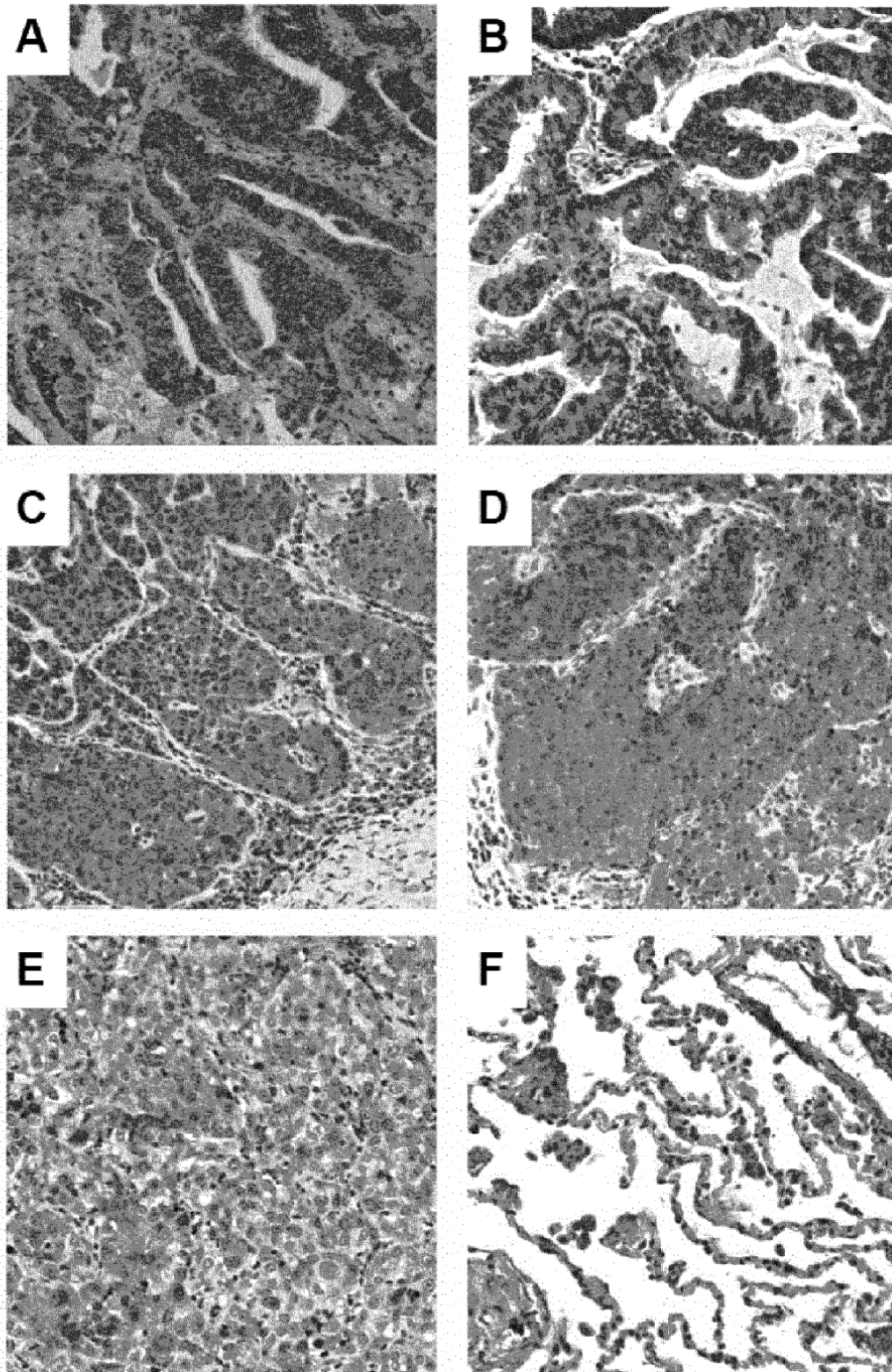


FIG. 3

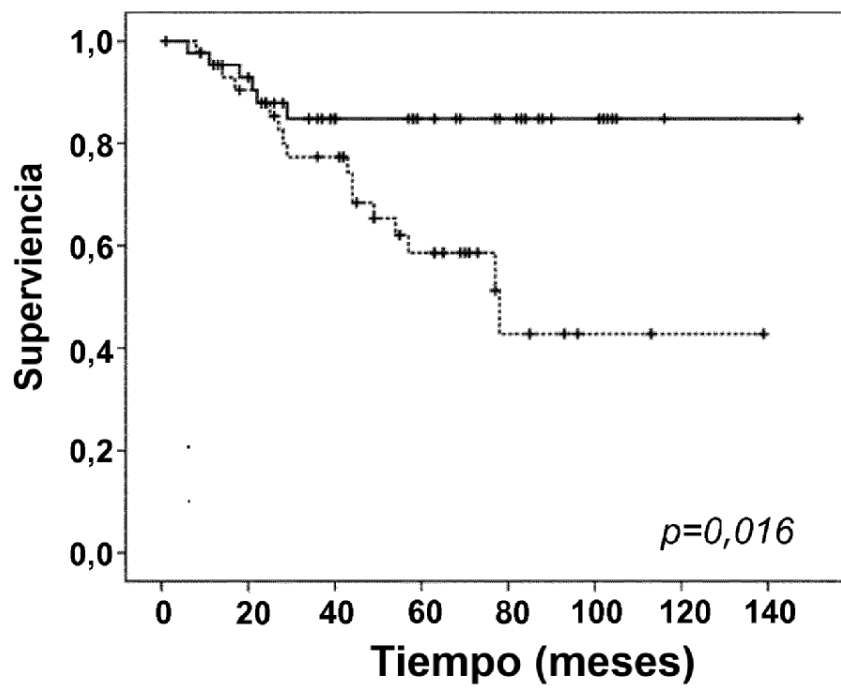
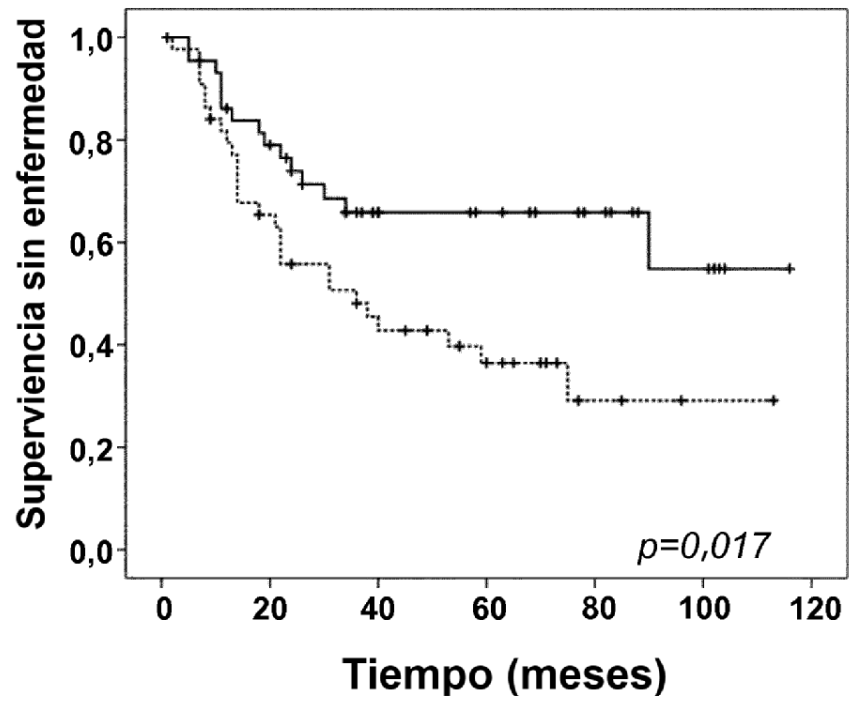


FIG. 4

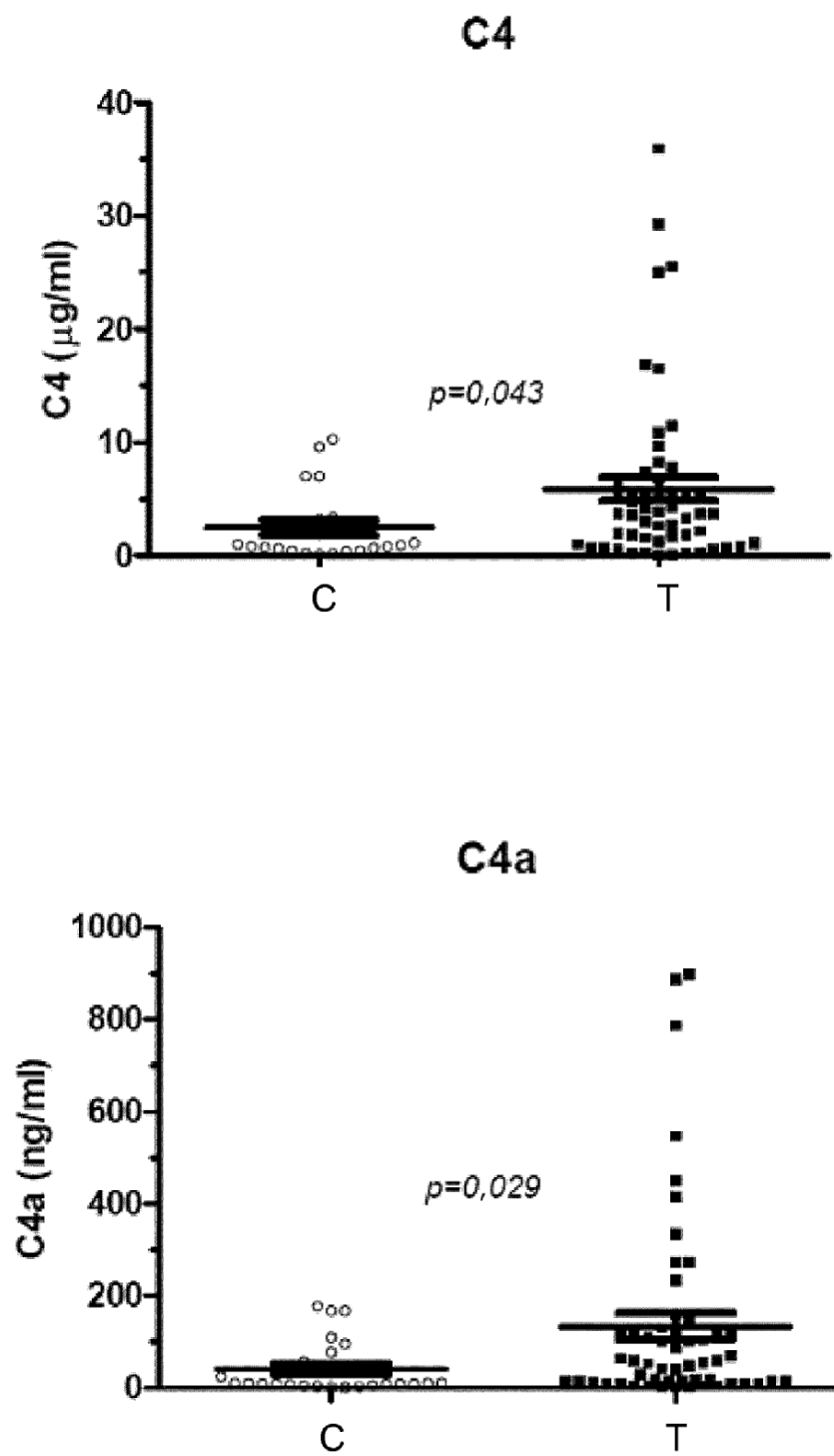


FIG. 4 (Continuación)

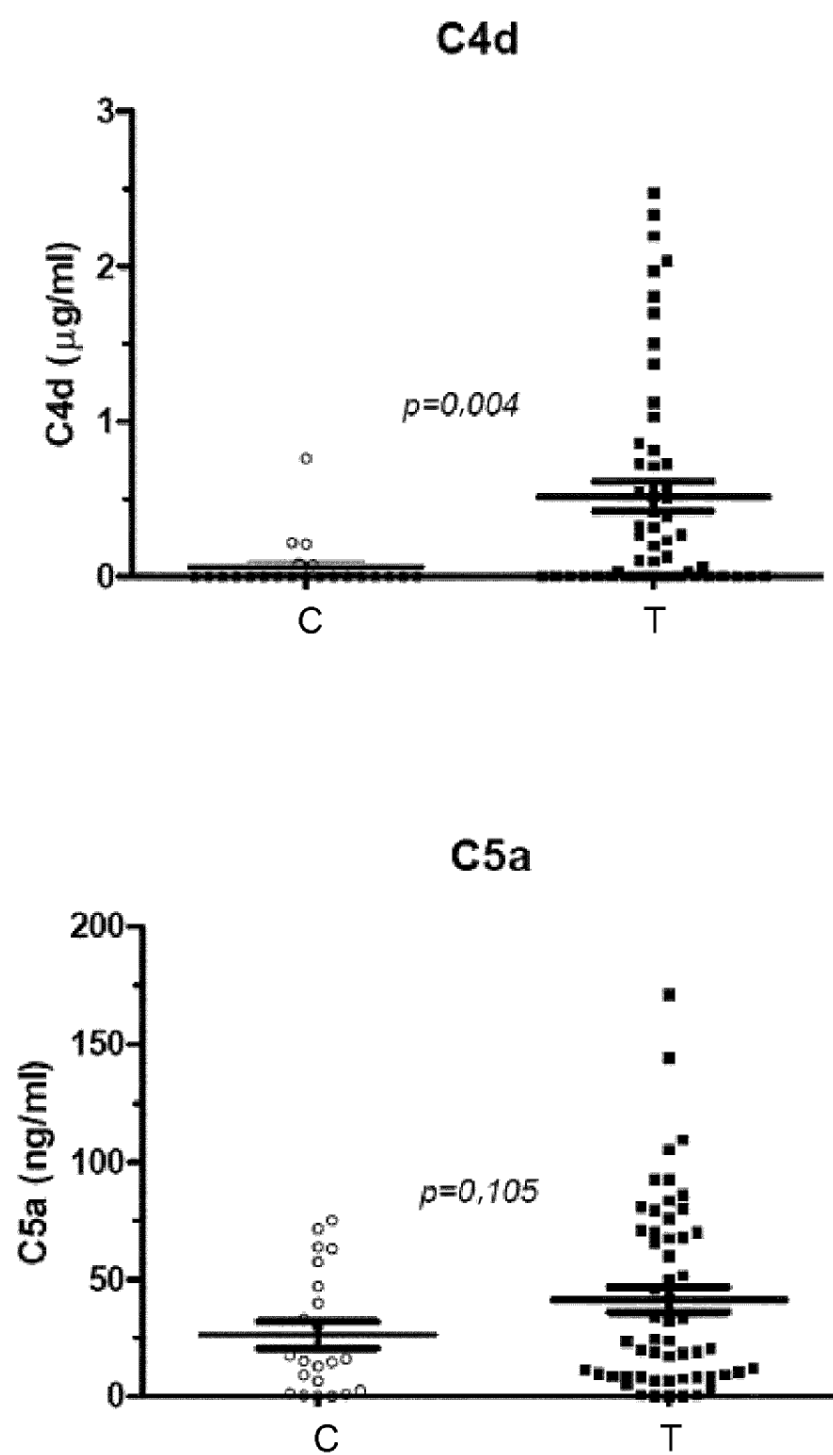


FIG. 5

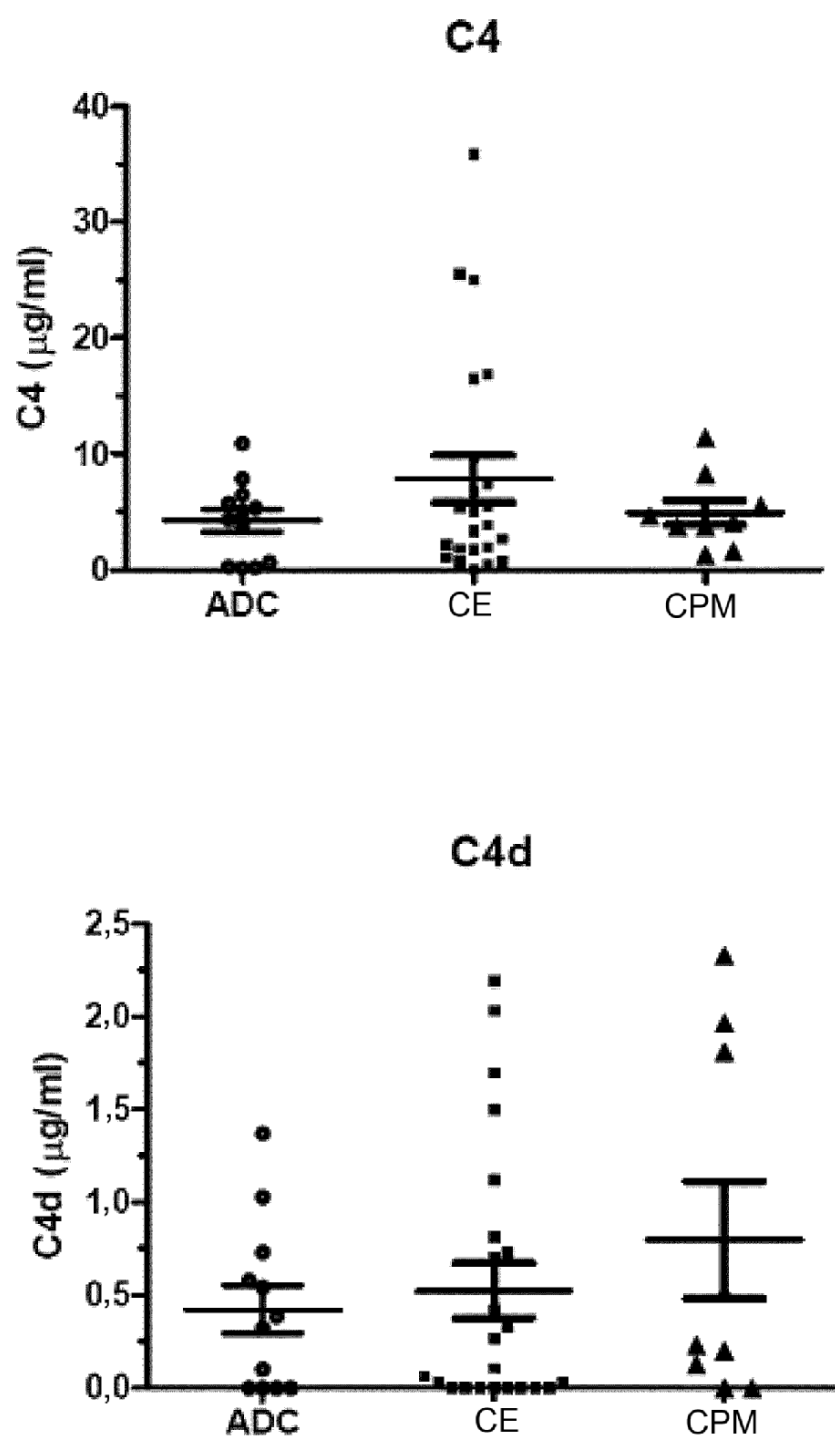


FIG. 5 (Continuación)

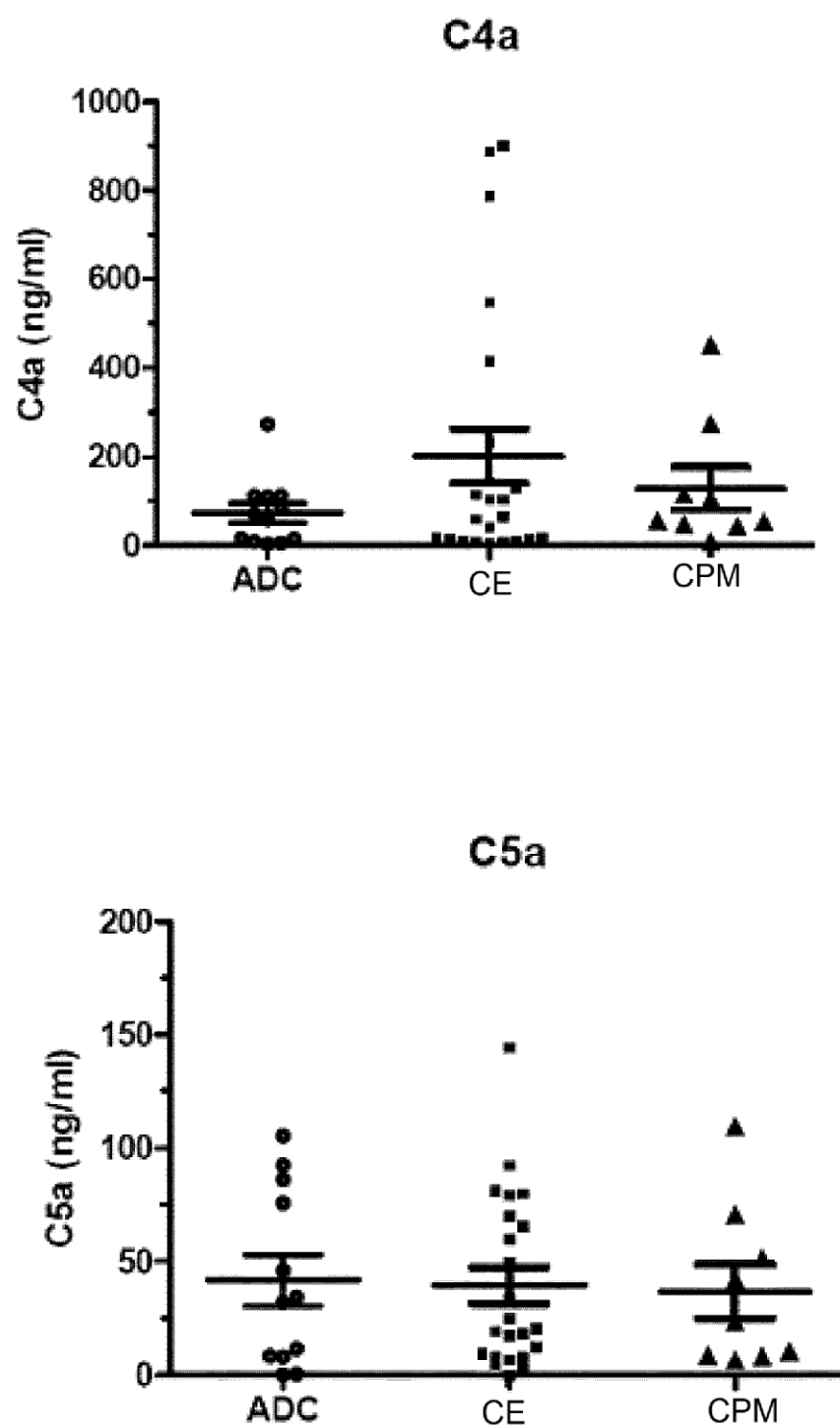


FIG. 6

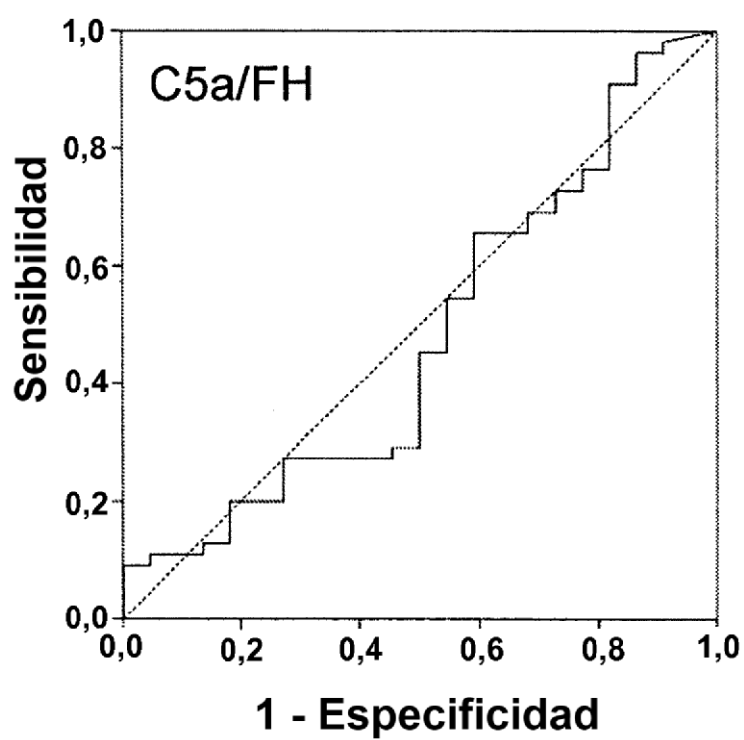
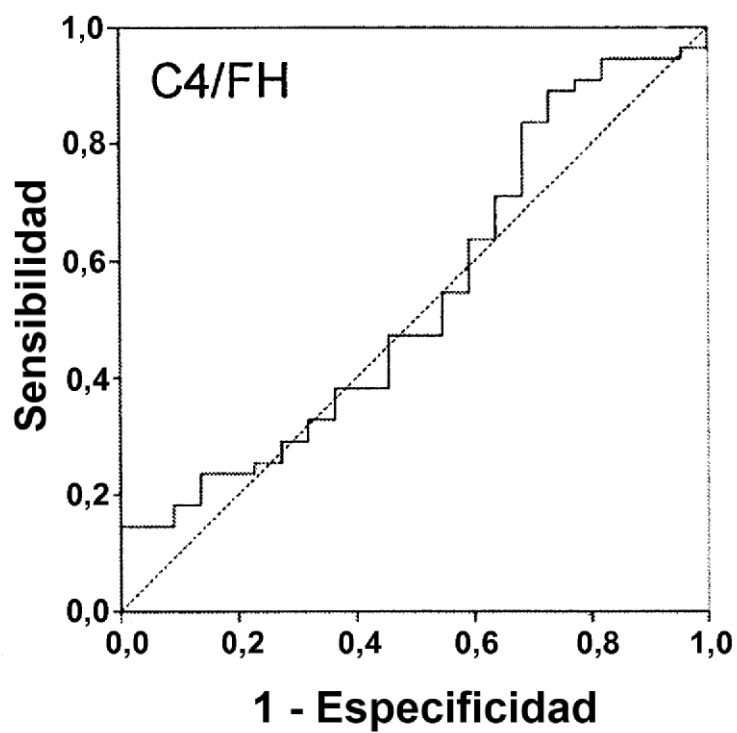


FIG. 6 (Continuación)

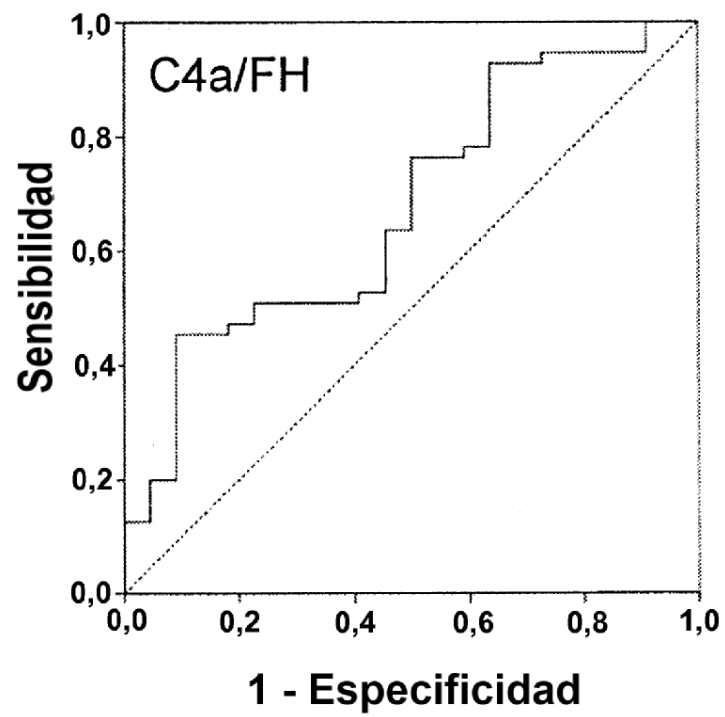
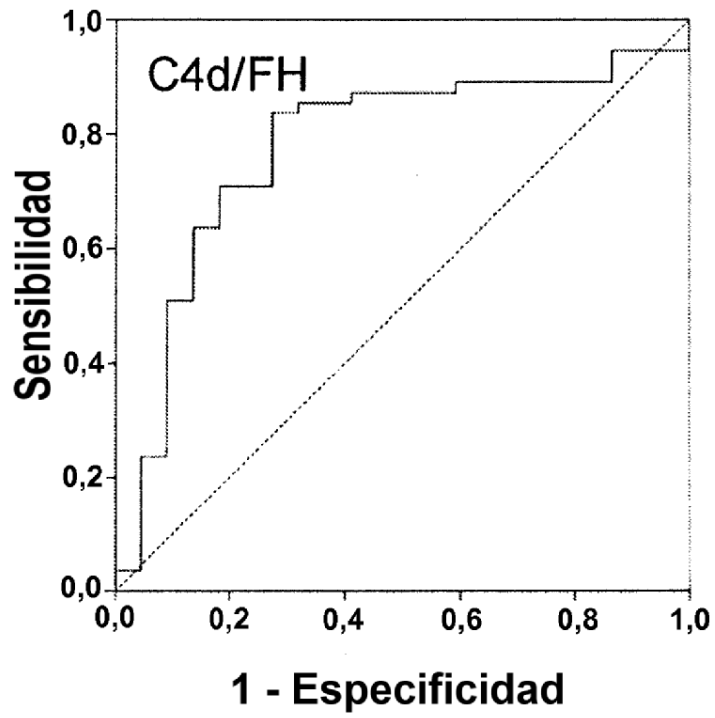


FIG. 7

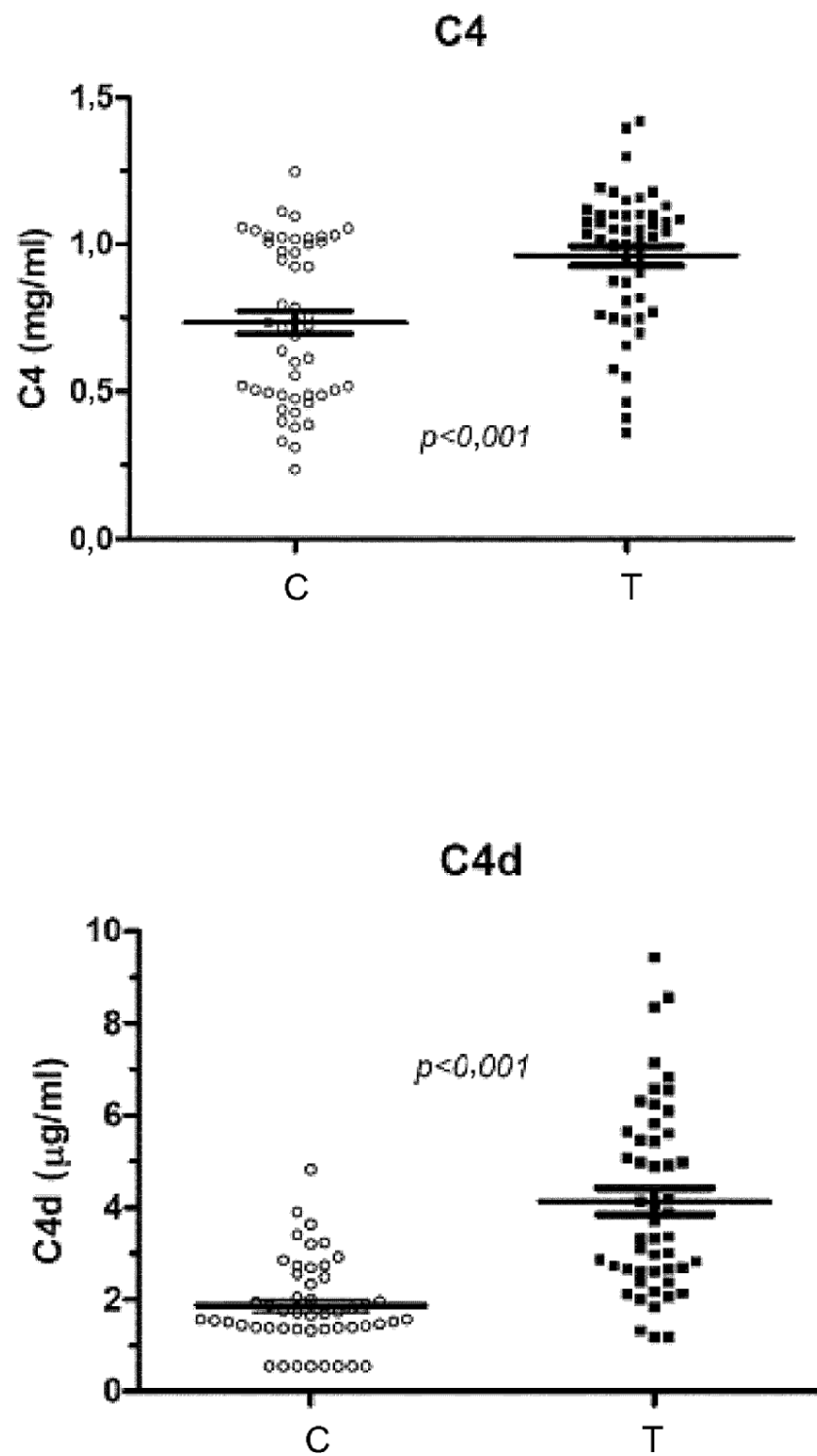


FIG. 7 (Continuación)

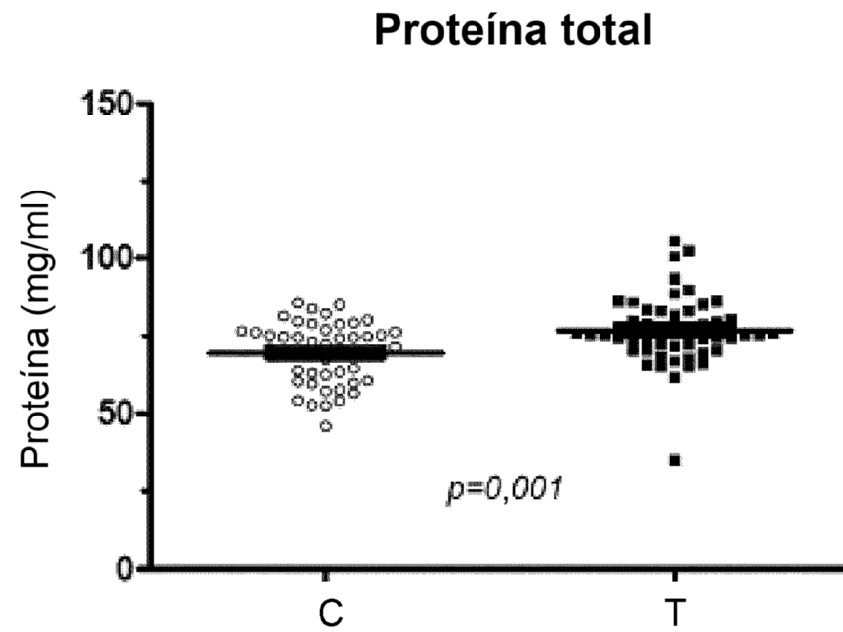


FIG. 8

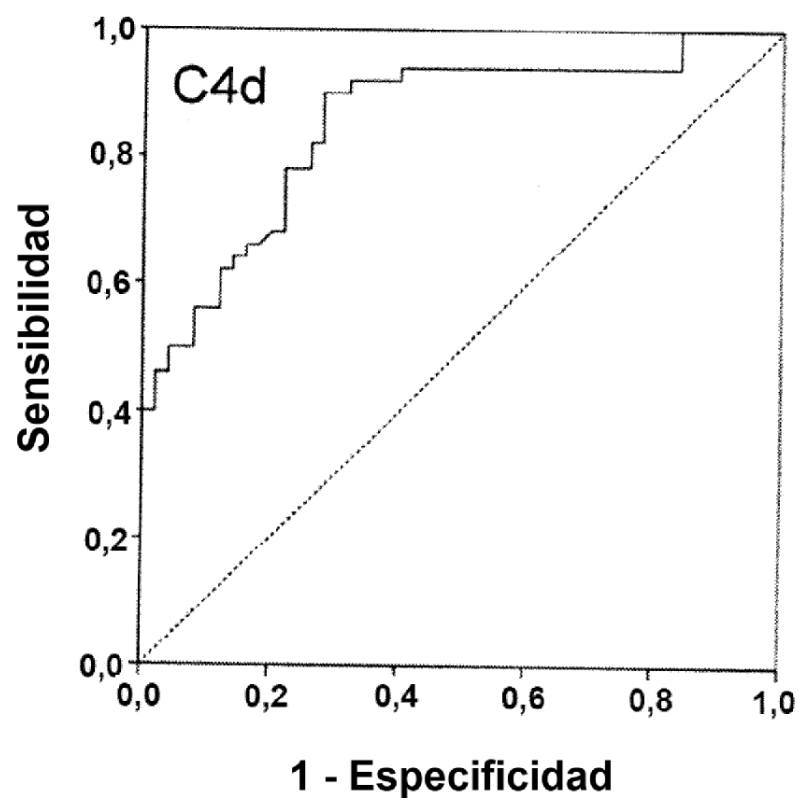
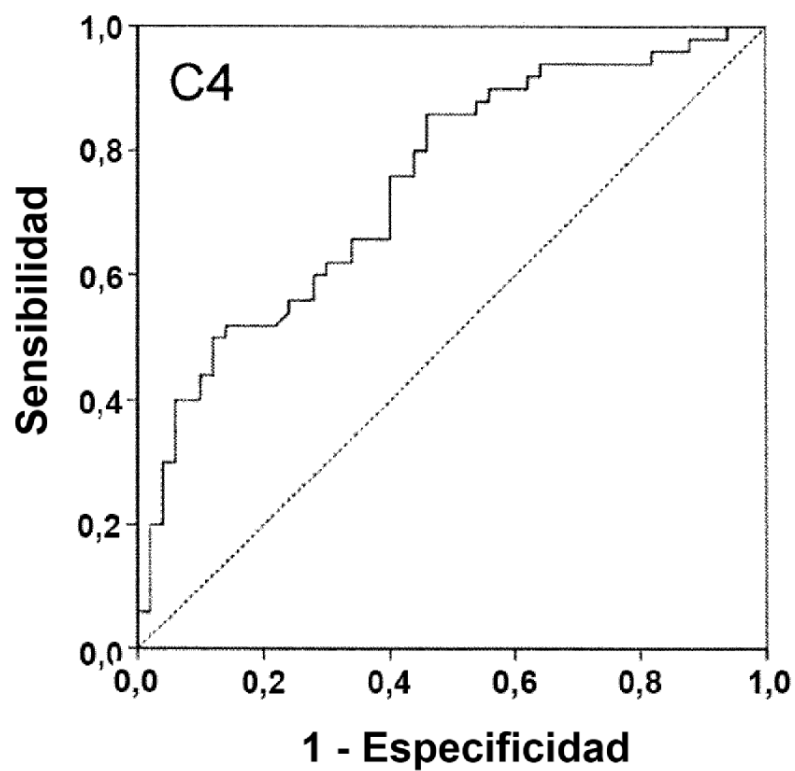


FIG. 9

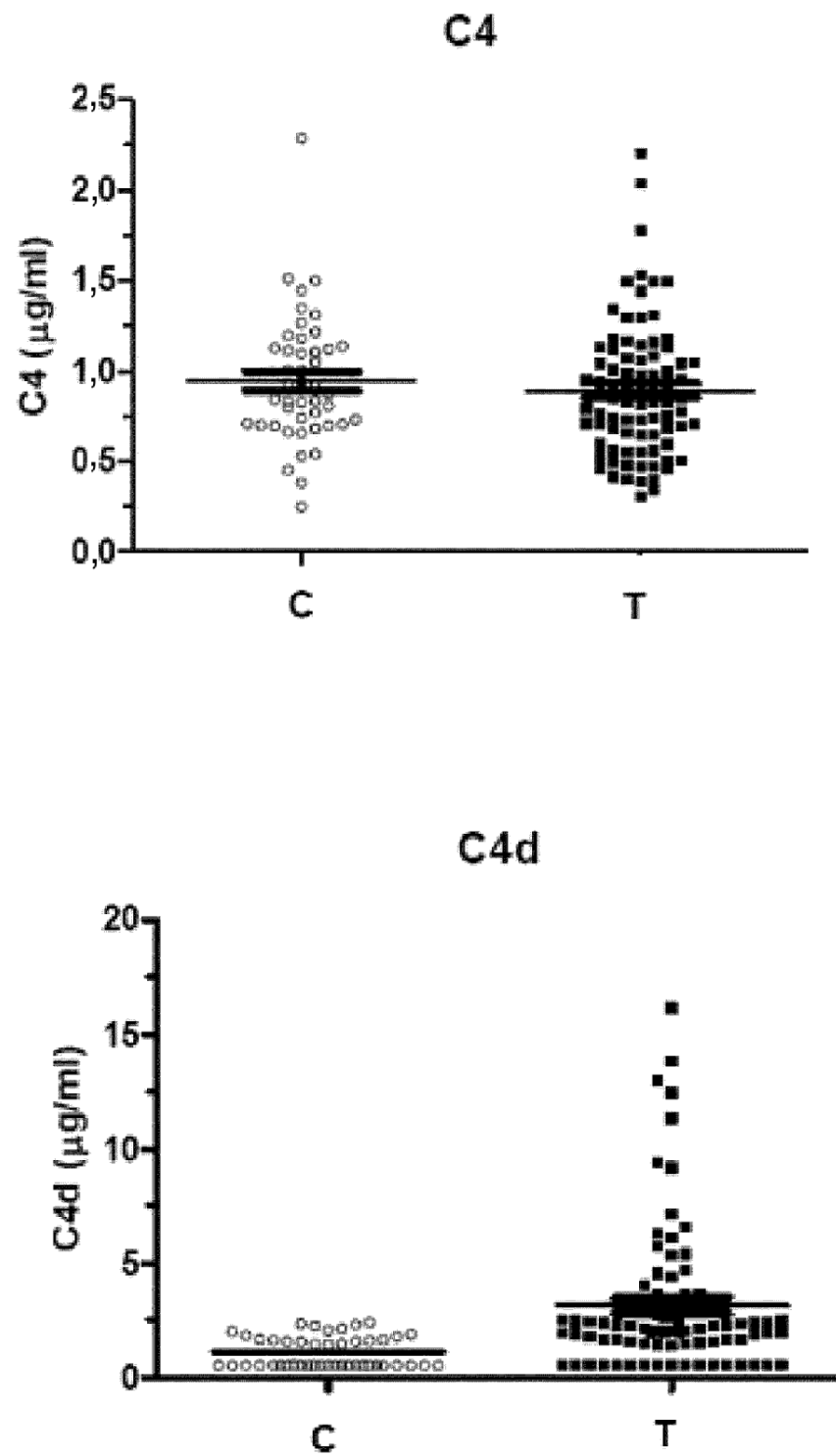


FIG. 9 (Continuación)

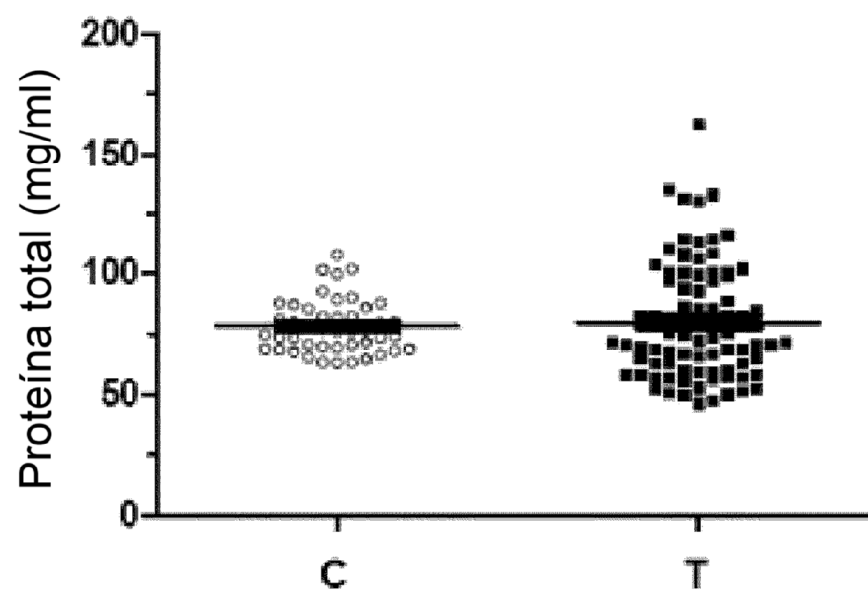


FIG. 10

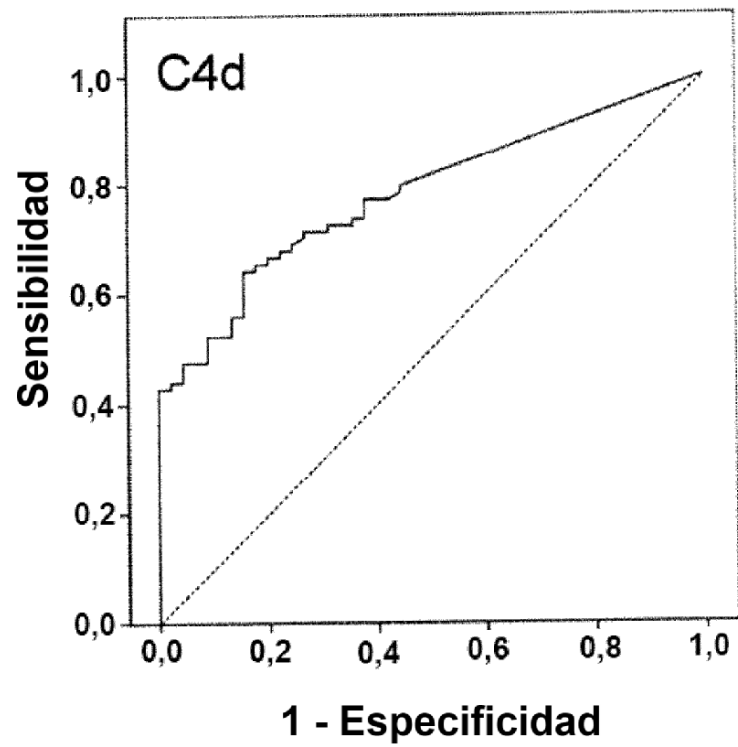
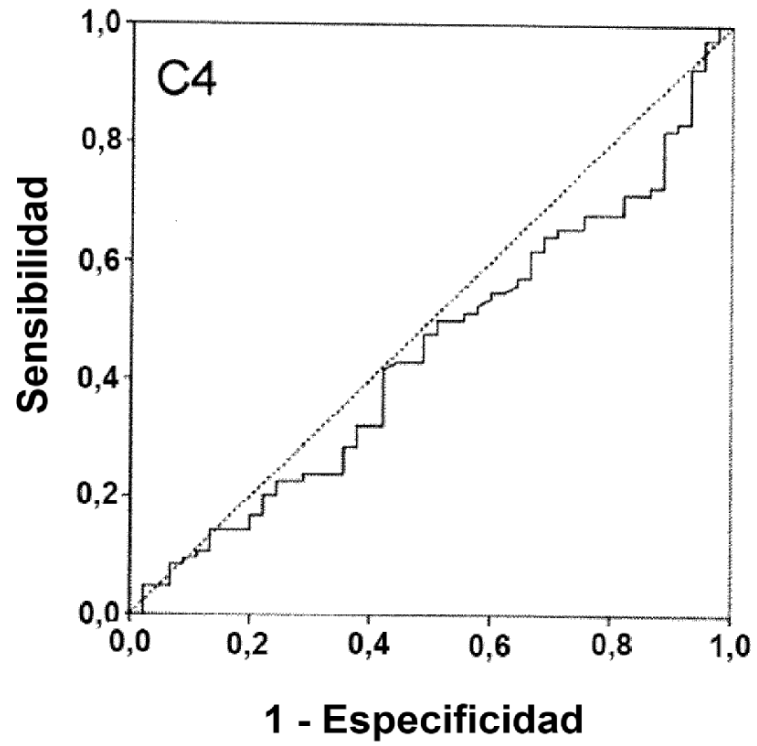


FIG. 11

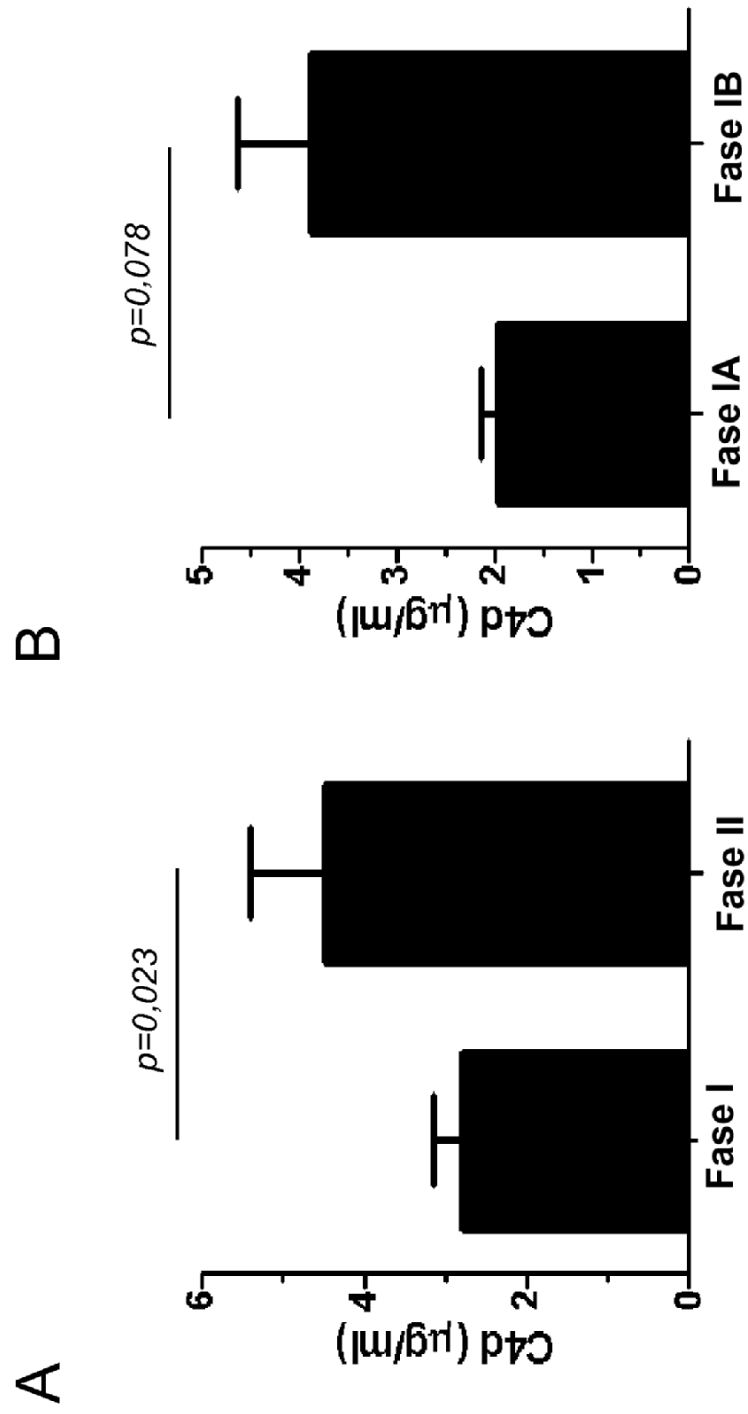


FIG. 12

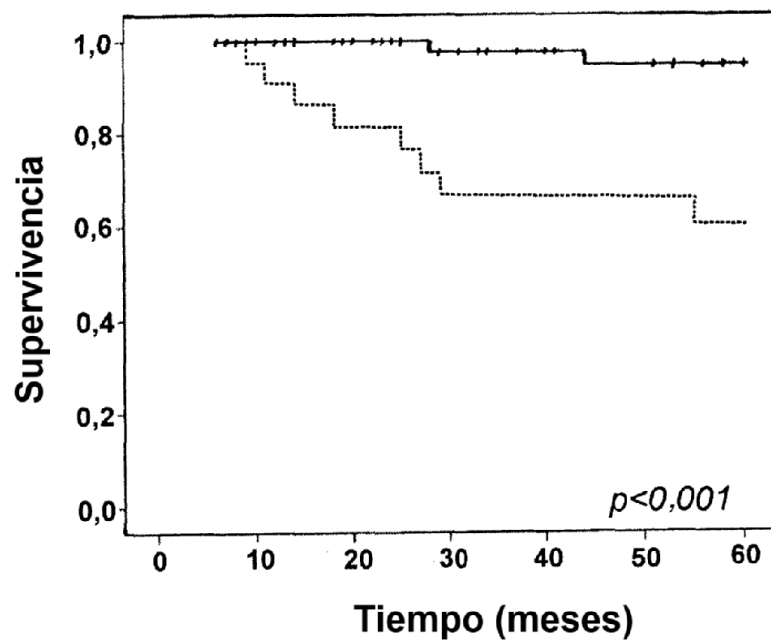
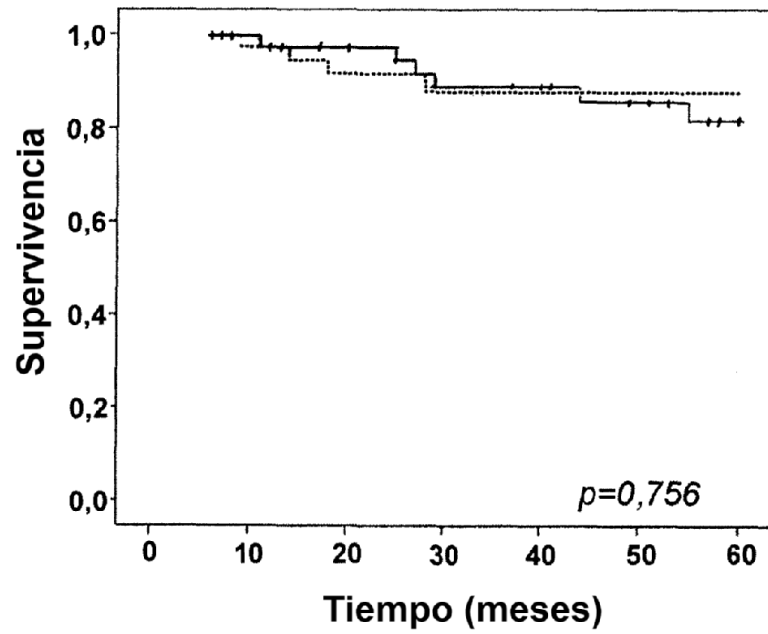
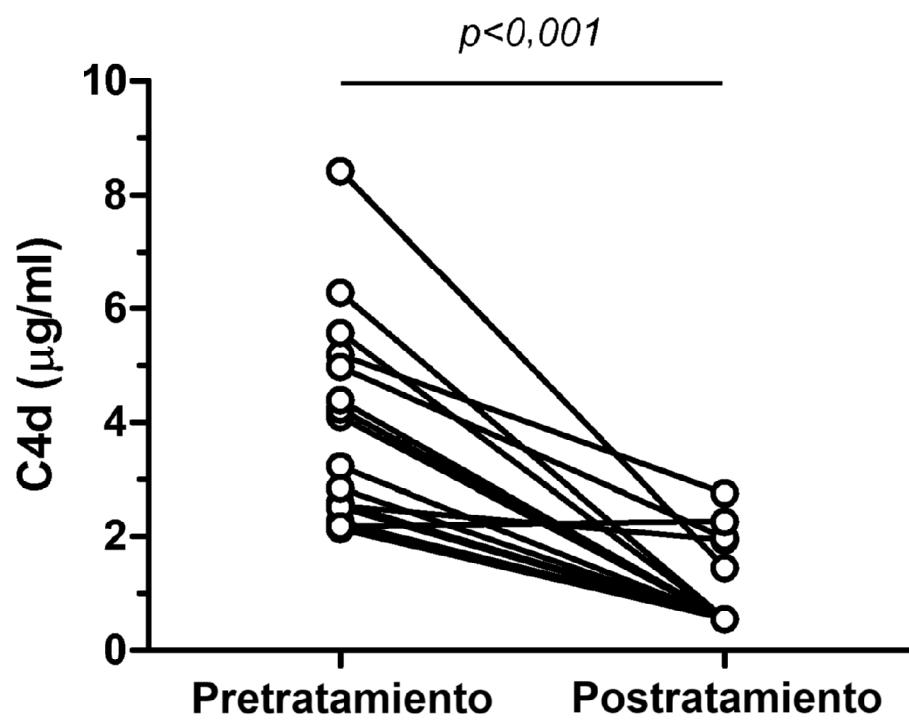


FIG. 13



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- KR 100925147 [0006]
- EP 12382113 A [0107]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **BURTIS C. A. et al.** *Statistical Treatment of Reference Values*, 2008 [0030]
- **ABERLE D.R. et al.** Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *N. Engl. J. Med.*, 2011, vol. 365, 395-409 [0106]
- Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. **BURTIS C. A. et al.** Establishment and Use of Reference values. Saunders/Elsevier, 2008, 229-238 [0106]
- **HENSCHKE C.I. et al.** Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet*, 1999, vol. 354, 99-105 [0106]
- **HENSCHKE C.I. et al.** Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N. Engl. J. Med.*, 2006, vol. 355, 1763-1771 [0106]
- **HOU et al.** Preparation of C4 antiserum and detection of complement C4 activation in plasma with crossed immunoelectrophoresis. *Zhongguo Yixue Kexueyuan Xuebao*, 1985, vol. 7, 473-474 [0106]
- **NIEHANS G.A. et al.** Human carcinomas variably express the complement inhibitory proteins CD46 (membrane cofactor protein), CD55 (decay-accelerating factor), and CD59 (protectin). *Am. J. Pathol.*, 1996, vol. 149, 129-142 [0106]
- **NISHIOKA K. et al.** The complement system in tumor immunity: significance of elevated levels of complement in tumor bearing hosts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1976, vol. 276, 303-315 [0106]
- **ONER F. et al.** Immunoglobulins and complement components in patients with lung cancer. *Tuberk Toraks*, 2004, vol. 52, 19-23 [0106]
- **PIO R. et al.** Complement factor H is elevated in bronchoalveolar lavage fluid and sputum from patients with lung cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2010, vol. 19, 2665-2672 [0106]
- World Health Organization Classification of Tumours. **TRAVIS W.D. et al.** Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. IARC Press, 2004 [0106]