(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 737**

(51) Int. CI.:

G01N 33/574 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2013 PCT/EP2013/070471**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14053502**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2013 E 13779755 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2904398**

(54) Título: **Método para predecir el riesgo de contraer cáncer o para diagnosticar cáncer en un sujeto femenino**

(30) Prioridad:

02.10.2012 EP 12187050

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.07.2018

(73) Titular/es:

SPHINGOTEC GMBH (100.0%)
Neuendorfstrasse 15a
16761 Henningsdorf, DE

(72) Inventor/es:

BERGMANN, ANDREAS y
MELANDER, OLLE

(74) Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para predecir el riesgo de contraer cáncer o para diagnosticar cáncer en un sujeto femenino.

La materia objeto de la presente invención es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no sufre de cáncer, que comprende:

- determinar el nivel de proencefalina (PENK) o fragmentos de la misma en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino, y
- correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido es predictivo de un riesgo incrementado de contraer cáncer, en el que un nivel reducido significa un nivel inferior a determinado umbral,
- en el que dicha proencefalina o fragmento de la misma se selecciona de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11.

La Met-encefalina, un péptido de 5 aminoácidos derivado del precursor de encefalina (pre-proencefalina), también denominado "factor de crecimiento de opioide" (OGF), es liberado junto con fragmentos de proencefalina. El péptido maduro se une a diferentes receptores de opioide (Koneru et al., 2009). Se ha encontrado que la encefalina (OGF) presenta varias funciones fisiológicas. En el SNC regula negativamente la señalización del dolor asociada a la sustancia P; desempeña funciones de citoquina (Plotnikoff et al., 1997). Los péptidos relacionados con la proencefalina muestran acciones antibióticas (Goumon et al., 1998). La proencefalina y la encefalina muestran acción antitumoral y actúan como agentes proapoptóticos (Tavish et al., 2007; Donahue et al., 2011; Zagon et al., 2009).

La utilización de péptidos vasoactivos para la predicción del riesgo de cáncer en sujetos masculinos ha sido informada en Belting et al., Cancer, Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Se ha medido MR-pro-ANP, MR-pro-ADM y copeptina en el plasma en ayuno de participantes en el estudio 'Malmö Diet and Cancer Study' que se encontraban libres de cáncer antes del examen de línea base entre 1991 y 1994 (1.768 hombres y 2.293 mujeres). Los autores indican que entre mujeres no existía ninguna relación entre los biomarcadores y la incidencia de cáncer.

El documento EP 2 293 079 da a conocer métodos *in vitro* para determinar los fragmentos de proencefalina. El documento nº US 2008/160557 da a conocer la utilización diagnóstica de inmunoensayos. Dorgan et al., JNCI, 9 de octubre de 2009, propusieron la sustancia inhibidora mulleriana (SIM) como nuevo biomarcador de riesgo incrementado de cáncer de mama.

Un objetivo de la presente invención era investigar el poder pronóstico y diagnóstico de PENK para la predicción de la incidencia de cáncer y para la predicción del riesgo de recurrencia de cáncer. Para investigar esta cuestión, se midieron fragmentos estables de proencefalina (Ernst et al., 2006) en plasma en ayuno en dicho estudio sueco de una cohorte prospectiva (Malmö Diet and Cancer Study) y relacionaron el nivel de línea base de dicho biomarcador con la incidencia de cáncer de mama durante 15 años de seguimiento.

Inesperadamente, se demostró que la proencefalina era un biomarcador potente y altamente significativo en mujeres para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no sufre de cáncer o alternativamente para diagnosticar el cáncer en un sujeto femenino.

De esta manera, la materia objeto de la presente exposición es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no sufre de cáncer en un sujeto femenino, que comprende:

- determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino y
- correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido es predictivo de un riesgo incrementado de contraer cáncer.

Los ejemplos de cáncer pueden seleccionarse de entre el grupo que comprende cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y cáncer de colon.

En una forma de realización específica de la invención, dicho cáncer es cáncer de mama. En otra forma de realización específica de la invención, dicho cáncer es cáncer de pulmón.

De esta manera, la materia objeto de la presente invención es la determinación de la susceptibilidad de una mujer de contraer cáncer, p.ej. cáncer de mama, cáncer de pulmón, etc.

Los datos obtenidos en el presente estudio revelan además una correlación entre el riesgo de contraer cáncer en sujetos masculinos con el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto masculino; sin embargo, dicha correlación no era estadísticamente significativa para la presente base de datos, aunque se observaba una clara tendencia de riesgo incrementado de cáncer a niveles reducidos de PENK también en hombres. De esta manera, el método posee cierto valor según la invención también para sujetos masculinos, aunque en el presente estudio el efecto observado no era tan fuerte para hombres como para mujeres. Lo anterior puede deberse principalmente al bajo número de incidentes de cáncer en la población masculina.

Además, los datos obtenidos en el presente estudio también revelaron una correlación entre el riesgo de contraer cáncer en sujetos femeninos y el nivel de proencefalina o de fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino, en el que dicho cáncer no era cáncer de pulmón o cáncer de mama. Debido a que el número de incidencias en la presente población específica era bajo, dicha correlación, sin embargo, no era estadísticamente significativa en la presente base de datos. Aunque no era significativa, se observó una tendencia clara. Además, es verosímil la sugerencia por los presentes datos de que también exista dicha correlación con otros cánceres debido al conocido efecto proapoptótico de la encefalina, un fragmento de PENK. A partir de la técnica anterior resulta inesperado que la proencefalina o fragmentos de la misma puedan ser predictivos de cáncer. Partiendo de los presentes datos, que son estadísticamente muy relevantes para el cáncer de mama y el cáncer de pulmón, es esperable y verosímil que también puedan ser pronósticos de otros tipos de cáncer.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un organismo humano o no humano vivo. Preferentemente, en la presente memoria el sujeto es un sujeto humano.

La expresión "nivel reducido" se refiere a un nivel inferior a determinado nivel umbral.

Un líquido corporal puede seleccionarse de entre el grupo que comprende sangre, suero, plasma, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y saliva.

En una forma de realización de la invención, dicho sujeto femenino nunca ha sido diagnosticado de cáncer en el tiempo en que se obtiene la muestra de líquido corporal de dicho sujeto femenino.

En otra forma de realización, dicho sujeto femenino ha sido diagnostico antes de presentar cáncer y ya ha sido curado en el tiempo de obtención de la muestra de líquido corporal a partir de dicho sujeto femenino y se determina el riesgo de recurrencia de cáncer o alternativamente se predice la recurrencia de cáncer.

La proencefalina presenta la secuencia siguiente:

SEC ID nº 1 (proencefalina (1-243)):

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLPSLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL

RENSKPEESHLLAKRYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEANGSEILAKRYGGFMK

KDAEEDDSLANSSDLLKELLETGDNRERSHHQDGSDNEEEVSKRYGGFMRGLKRSPQL

EDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWMDYQKRYGGFLKRFAEALPSDEEGESYSKEVPE

MEKRYGGF MRF

Los fragmentos de proencefalina que pueden determinarse en un líquido corporal pueden seleccionarse, por ejemplo, de entre el grupo de los fragmentos siguientes:

SEC ID nº 2 (sinencefalina, proencefalina 1-73):

ECSQDCATCSYRLVRPADINFLACVMECEGKLPSLKIWETCKELLQLSKPELPQDGTSTL

RENSKPEESHLLA

SEC ID nº 3 (Met-encefalina):

YGGFM

SEC ID nº 4 (Leu-encefalina):

YGGFL

SEC ID nº 5 (proencefalina 90-109):

MDELYPMEPEEEANGSEILA

SEC ID nº 6 (proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK)

DAEEDDSLANSSDLLKELLETGDNRERSHHQDGSDNEEEVS

SEC ID nº 7 (Met-encefalina-Arg-Gly-Leu)

YGGFMRGL

SEC ID nº 8 (proencefalina 172-183)

SPQLEDEAKELQ

SEC ID nº 9 (proencefalina 193-203)

VGRPEWWMDYQ

SEC ID nº 10 (proencefalina 213-234)

FAEALPSDEEGESYSKEVPEME

SEC ID nº 11 (proencefalina 213-241)

FAEALPSDEEGESYSKEVPEMEKRYGGF M

SEC ID nº 12 (Met-encefalina-Arg-Phe)

YGGFMRF

La determinación del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma puede significar que se determina la inmunorreactividad con la proencefalina o fragmentos de la misma. Un agente de unión utilizado para la determinación de la proencefalina o fragmentos de la misma según la región de unión puede unirse a más de una de las moléculas mostradas anteriormente. Lo anterior resulta evidente para el experto en la materia.

De esta manera, según la presente invención, el nivel de analito inmunorreactivo se determina mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a una región dentro de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos y fragmentos de péptido anteriores, en el que dicha proencefalina o fragmento de la misma se selecciona de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11, en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto y se correlaciona con las formas de realización específicas de relevancia clínica.

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de MRPENK (SEC ID nº 6: proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK). En una forma de realización más específica, el nivel de analito inmunorreactivo se determina mediante la utilización de por lo menos un agente de unión que se une a MR-PENK y se correlaciona con las formas de realización específicas de relevancia clínica según la invención.

La determinación del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma puede implicar que se determina la inmunorreactividad con la proencefalina o fragmentos de la misma. Un agente de unión utilizado para la determinación de proencefalina o fragmentos de la misma según la región de unión puede unirse a más de una de las moléculas mostradas anteriormente. Lo anterior resulta evidente parar el experto en la materia. En la forma de realización de la invención, el fragmento no es Leu-encefalina o Met-encefalina; en la forma de realización de la invención, se determina la inmunorreactividad con proencefalina o fragmentos de la misma, sin incluir Leu-encefalina y Met-encefalina.

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de MRPENK (SEC ID nº 6 (proencefalina 119-159, fragmento de región intermedia de proencefalina, MRPENK, DAEEDDSLANSSDLLKELLETGDNRERSHHQDGSDNEEEVS).

Alternativamente, puede determinarse el nivel de cualquiera de los analitos anteriormente indicados mediante otros métodos analíticos, por ejemplo la espectroscopía de masas.

En una forma de realización específica, se mide el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con un inmunoensayo que utiliza anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agentes de unión de proencefalina o de fragmentos de la misma. Un inmunoensayo que puede resultar útil para determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos puede comprender las etapas descritas de manera general en el ejemplo 2. Todos los umbrales y valores deben considerarse en correlación con el ensayo y la calibración utilizados según el ejemplo 2. El experto en la materia puede conocer que el valor absoluto de un umbral puede estar influido por la calibración utilizada. Lo anterior significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria deben entenderse en el contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (Ejemplo 2).

Según la invención, el agente de unión diagnóstico de la proencefalina se selecciona de entre el grupo que consiste en anticuerpos, p.ej. IgG, una inmunoglobulina de longitud completa típica, o fragmentos de anticuerpo que contienen por lo menos el dominio variable F de la cadena pesada y/o ligera en forma de, p.ej., anticuerpos acoplados químicamente (unión a antígeno de fragmentos), incluyendo, aunque sin limitación, fragmentos Fab que incluyen minicuerpos Fab, anticuerpos Fab de cadena sencilla, anticuerpos Fab monovalentes con etiquetas epítopo, p.ej. Fab-V5Sx2, Fab bivalente (minianticuerpo) dimerizado con el dominio CH3; Fab bivalente o Fab multivalente, p.ej. formado mediante multimerización con ayuda de un dominio heterólogo, p.ej. mediante dimerización de dominios dHLX, p.ej. Fab-dHLX-FSx2, fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos scFv, fragmentos scFv multivalentes y/o multiespecíficos multimerizados, diacuerpos bivalentes y/o biespecíficos, BITE® (acoplador biespecífico de células T), anticuerpos trifuncionales, anticuerpos polivalentes, p.ej. de una clase diferente a G; anticuerpos de dominio único, p.ej. anticuerpos derivados de inmunoglobulinas de camélido o de pez.

En una forma de realización específica, el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma se miden con un ensayo utilizando agentes de unión seleccionados de entre el grupo que comprende aptámeros, andamiajes no Ig tal como se indica en mayor detalle posteriormente agentes de unión de proencefalina o fragmentos de la misma.

El agente de unión que puede utilizarse para determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma muestra una constante de afinidad para la proencefalina de por lo menos 10^7 M^{-1}, preferentemente de 10^8 M^{-1}; preferentemente una constante de afinidad superior a 10^9 M^{-1}, más preferentemente superior a 10^{10} M^{-1}. El experto en la materia conoce la posibilidad de compensar una afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y dicha medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método Biacore, ofrecido en forma de análisis como servicio, p.ej. en Biaffin, Kassel, Alemania (http://www.biaffin.com/de/).

Se encuentra disponible una muestra de control de proencefalina humana en ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania, http://www.ici-diagnostics.com/. El ensayo también puede calibrarse mediante proencefalina sintética (para los experimentos de los presentes inventores se utilizó MRPENK sintético, SEC ID nº 6) o proencefalina recombinante o fragmentos de las mismas.

El umbral para determinar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino según los métodos de la presente invención es inferior a 100 pmoles/l de PENK, preferentemente inferior a 50 pmoles/l, más preferentemente inferior a 40,4 pmoles/l. En una forma de realización específica, dicho umbral es de aproximadamente 40,4 pmoles/l. Estos umbrales se relacionan con el método de calibración anteriormente indicado. Un valor de PENK inferior a dicho umbral significa que el sujeto presenta un riesgo incrementado de contraer cáncer.

En una forma de realización de la invención, dicho método se lleva a cabo más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino o con el fin de monitorizar el curso del tratamiento. En una forma de realización específica, dicha monitorización se lleva a cabo con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto femenino a las medidas preventivas adoptadas.

En una forma de realización de la invención, se utiliza el método con el fin de estratificar dichos sujetos femeninos en grupos de riesgo.

Un objeto de la presente exposición también es un método para predecir el riesgo de contraer cáncer de una mujer o para identificar un sujeto femenino que presenta un riesgo incrementado de contraer cáncer según cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino solo o junto con otros parámetros de laboratorio o clínicos útiles para el pronóstico se utiliza para la predicción del riesgo de un sujeto de sufrir un suceso adversos, mediante un método que puede seleccionarse de entre las alternativas siguientes:

- comparación con la mediana del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",

- comparación con un cuantil del nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino en un conjunto de muestras predeterminadas en una población de sujetos "sanos" o "aparentemente sanos",

- cálculo basado en el análisis de riesgos proporcionales de Cox o mediante la utilización de cálculos de índice de riesgo, tales como el IRN (índice de reclasificación neta) o el IDI (índice de discriminación integrada).

Se da a conocer además un método para predecir el riesgo de contraer cáncer en una mujer o para identificar un sujeto femenino que presenta un riesgo incrementado de contraer cáncer según cualquiera de las formas de realización anteriores, en el que el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino solo o junto con otro biomarcador útil para el pronóstico. Dicho biomarcador útil puede ser proneurotensina y fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos.

En una forma de realización más específica del método según la presente invención, se determina el nivel de proneurotensina 1-117 además de determinar la proencefalina o fragmentos de la misma.

De esta manera, la materia objeto de la presente exposición es además un método para predecir el riesgo de contraer cáncer que presenta un sujeto femenino que no sufre de cáncer, que comprende:

- determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma, incluyendo Leu-encefalina y Met-encefalina de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino, y

- determinar el nivel de proneurotensina o fragmento de la misma de por lo menos 5 aminoácidos en un líquido corporal obtenido de dicho sujeto femenino, y

- correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma y proneurotensina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos con el riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido de proencefalina es predictivo de un riesgo incrementado de contraer cáncer y en le que un nivel incrementado de proneurotensina es predictivo de un riesgo incrementado de contraer cáncer.

SEC ID nº 13 (proneurotensina 1-147):

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPAE

ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ

EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY ENKPRRPYIL KRDSYYY

SEC ID nº 14 (proneurotensina 1-125 (neuromedina N grande)):

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPAE

ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ

EDILDTGNDK NGKEEVI KR KIPYIL

SEC ID nº 15 (neuromedina N)

KIPYIL

SEC ID nº 16 (neurotensina)

piroQLYENKPRRP YIL

SEC ID nº 17 (proneurotensina 1-117)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPAE

ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ

EDILDTGNDK NGKEEVI

SEC ID nº 18 (proneurotensina 1-132)

SDSEEEMKAL EADFLTNMHT SKISKAHVPS WKMTLLNVCS LVNNLNSPAE
ETGEVHEEEL VARRKLPTAL DGFSLEAMLT IYQLHKICHS RAFQHWELIQ
EDILDTGNDK NGKEEVIKRK IPYILKRQLY EN

SEC ID nº 19 (proneurotensina 120-140)

KIPYILKRQL YENKPRRPYI L

SEC ID nº 20 (proneurotensina 120-147)

KIPYILKRQL YENKPRRPYIL KRDSYYY

SEC ID nº 21 (proneurotensina 128-147)

QLYENKPRRP YILKRDSYYY

En una forma de realización específica, se mide el nivel de proneurotensina con un inmunoensayo. Más específicamente, se utiliza un inmunoensayo tal como se describe en Ernst et al. (Peptides (27):1787-1793, 2006). Un inmunoensayo que puede resultar útil para determinar el nivel de proneurotensina o fragmentos de la misma de por lo menos 5 aminoácidos puede comprender las etapas descritas de manera general en el ejemplo 2. Todos los umbrales y valores deben considerarse en correlación con el ensayo y la calibración utilizados según el ejemplo 2. El experto en la materia puede conocer que el valor absoluto de un umbral podría estar influido por la calibración utilizada. Lo anterior significa que todos los valores y umbrales proporcionados en la presente memoria deben entenderse en el contexto de la calibración utilizada en la presente memoria (Ejemplo 2). Se encuentra disponible un calibrador de proneurotensina humana de ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania. Alternativamente, el ensayo también puede calibrarse con P-NT 1-117 sintético o recombinante o fragmentos del mismo (ver también Ernst et al., 2006).

El agente de unión que puede utilizarse para determinar el nivel proneurotensina o fragmentos de la misma muestra una constante de afinidad para proneurotensina de por lo menos 10^7 M^{-1}, preferentemente de 10^8 M^{-1}; una constante de afinidad preferente superior a 10^9 M^{-1}, más preferentemente superior a 10^{10} M^{-1}. El experto en la materia posibilidad de compensar una afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y que dicha medida no se apartaría del alcance de la invención. La afinidad de unión puede determinarse utilizando el método Biacore, ofrecido en forma de análisis como servicio, p.ej. en Biaffin, Kassel, Alemania (http://www.biaffin.com/de/). El umbral para determinar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto masculino o para diagnosticar cáncer de mama en un sujeto femenino según los métodos de la presente invención es superior a 78 pmoles/l de PNT, preferentemente de 100 pmoles/l, más preferentemente de 150 pmoles/l. En una forma de realización específica, dicho umbral es de aproximadamente 100 pmoles/l. Dichos umbrales se relacionan con el método de calibración anteriormente indicado. Un valor de P-NT superior a dicho umbral significa que el sujeto presenta un riesgo incrementado de contraer cáncer o de que ya presenta cáncer.

En una forma de realización de la invención, dicho método se lleva a cabo más de una vez con el fin de monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino o con el fin de monitorizar el curso del tratamiento. En una forma de realización específica, dicha monitorización se lleva a cabo con el fin de evaluar la respuesta de dicho sujeto femenino a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.

En una forma de realización de la invención, el método se utiliza con el fin de estratificar dichos sujetos femeninos en grupos de riesgo.

En una forma de realización de la invención, el cáncer se selecciona de entre el grupo que comprende cáncer de mama y cáncer de pulmón.

La materia objeto de la exposición es además un ensayo para determinar la proencefalina y fragmentos de proencefalina en una muestra que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de proencefalina que son los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 22) y los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 23), en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

En un aspecto de los ensayos para determinar proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, la sensibilidad de ensayo de dicho ensayo es capaz de cuantificar la proencefalina o fragmentos de proencefalina de los sujetos sanos y es <15 pmoles/l, preferentemente <10 pmoles/l y más preferentemente <6 pmoles/l.

En un aspecto de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, dicho agente de unión muestra una afinidad de unión a su pareja de unión de por lo menos 10^7 M^{-1},

preferentemente de 10^8 M^{-1}; la constante de afinidad preferente es inferior a 10^9 M^{-1}, más preferentemente es inferior a 10^{10} M^{-1}. El experto en la materia conocerá la posibilidad de compensar una afinidad más baja mediante la aplicación de una dosis más alta de compuestos y dicha medida no conduciría a apartarse del alcance de la invención; la afinidad de unión puede determinarse tal como se ha indicado anteriormente.

En un aspecto de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra según la presente exposición, dicho ensayo es un ensayo de tipo sándwich, preferentemente un ensayo totalmente automatizado. Puede ser un ELISA totalmente automatizado o manual. Puede ser un ensayo denominado de PDA (punto de atención). Los ejemplos de ensayos automatizados o totalmente automatizados comprenden ensayos que pueden utilizarse para uno de los sistemas siguientes: Roche Elecsys®, Abbott Architect®, Siemens Centauer®, Brahms Kryptort®, Biomerieux Vidas®, Alere Triage®. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de formatos de ensayo.

En un aspecto de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, se marca por lo menos uno de dichos dos agentes de unión con el fin de ser detectado. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de marcajes.

En un aspecto de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, se une por lo menos uno de dichos dos agentes de unión a una fase sólida. Se han proporcionado anteriormente ejemplos de fases sólidas.

En un aspecto de los ensayos para determinar la proencefalina o fragmentos de proencefalina en una muestra, se selecciona dicho marcaje de entre el grupo que comprende un marcaje quimioluminiscente, un marcaje enzimático, un marcaje fluorescente y un marcaje de yodo radioactivo.

Un objeto adicional de la presente exposición es un kit que comprende un ensayo según la presente invención, en el que los componentes de dicho ensayo pueden encontrarse comprendidos en uno o más recipientes.

La invención proporciona además un kit para determinar la proencefalina y fragmentos de proencefalina en una muestra que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la proencefalina que son los aminoácidos 133 a 140 (LKELLETG, SEC ID nº 22) y los aminoácidos 152 a 159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 23), en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.
20

Ejemplos

Ejemplo 1

Desarrollo de anticuerpos

Péptidos

Se sintetizaron los péptidos (JPT Technologies, Berlin, Alemania).

Péptidos/conjugados para la inmunización

Los péptidos para la inmunización se sintetizaron (JPT Technologies, Berlin, Alemania) con un residuo de cisteína N-terminal adicional para la conjugación de los péptidos a albúmina de suero bovina (BSA). Los péptidos se unieron covalentemente a BSA mediante la utilización de Sulfo-SMCC (Perbio-science, Bonn, Alemania). El procedimiento de acoplamiento se llevó a cabo según el manual de Perbio.

Tabla 1:

Péptido para la inmunización	Secuencia de la proencefalina
(C)DAEEDD	119-125
(C)EEDDSLANSSDLLK	121-134
(C)LKELLETG	133-140
(C)TGDNRERSHHQDGSDNE	139-155
(C)SDNEEEVS	152-159

Los anticuerpos se generaron según el método siguiente:

se inmunizó un ratón BALB/c con 100 µg de conjugado de péptido-BSA los días 0 y 14 (emulsionados en 100 µl de adyuvante completo de Freund) y 50 µg los días 21 y 28 (en 100 µl de adyuvante incompleto de Freund). Tres días antes de llevar a cabo el experimento de fusión, el animal recibió 50 µg del conjugado

disueltos en 100 µl de solución salina, administrada por vía intraperitoneal y una inyección intravenosa.

Los esplenocitos procedentes del ratón inmunizado y células de la línea celular de mieloma SP2/0 se fusionaron con 1 ml de polietilenglicol al 50% durante 30 s a 37ºC. Tras el lavado, las células se sembraron en placas de cultivo celular de 96 pocillos. Se seleccionaron los clones híbridos mediante el cultivo en medio HAT [medio de cultivo RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 20% y complemento HAT]. Tras dos semanas, se sustituyó el medio HAT por medio HT durante tres pases mediante el retorno al medio de cultivo celular normal.

Los sobrenadantes de cultivo celular se sometieron a un cribado primario para anticuerpos IgG específicos de antígeno tres semanas después de la fusión. Los microcultivos positivos en el ensayo se transfirieron a placas de 24 pocillos para la propagación. Tras someter a ensayo nuevamente los cultivos seleccionados se clonaron y se reclonaron utilizando la técnica de dilución limitante y se determinaron los isotipos.

(Lane R.D., "A short-duration polyethylene glycol fusiontechnique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas", J. Immunol. Meth. 81:223-228, 1985; Ziegler B. et al., "Glutamate decarboxylase (GAD) is not detectable on the surface of rat islet cells examined by cytofluorometry and complement-dependent antibody-mediated cytotoxicity of monoclonal GAD antibodies", Horm. Metab. Res. 28:11-15, 1996).

Producción de anticuerpos monoclonales

Se produjeron anticuerpos mediante métodos estándares de producción de anticuerpos (Marx et al., Monoclonal Antibody Production, ATLA 25, 121, 1997) y se purificaron mediante cromatografía de proteína A. Las purezas de los anticuerpos eran >95% según el análisis de electroforesis en gel de SDS.

Marcaje y recubrimiento de anticuerpos

Todos los anticuerpos se marcaron con éster de acridinio siguiendo el procedimiento siguiente:

compuesto marcado (trazador): 100 µg (100 µl) de anticuerpo (1 mg/ml en PBS, pH 7,4, se mezcló con 10 µl de éster de NHS acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (patente nº EP 0 353 971) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se purificó mediante HPLC de filtración en gel Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). El anticuerpo marcado y purificado se diluyó en (fosfato de potasio 300 mmoles/l, NaCl 100 mmoles/l, Na-EDTA 10 mmoles/l y albúmina de suero bovino 5 g/l, pH 7,0). La concentración final era de aproximadamente 800.000 unidades relativas de luz (URL) de compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio mediante la utilización de un instrumento AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

Anticuerpo en fase sólida (anticuerpo de recubrimiento)

Fase sólida: se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con anticuerpo (1,5 µg de anticuerpo/0,3 ml de NaCl 100 mmoles/l, Tris/HCl 50 mmoles/l, pH 7,8). Tras el bloqueo con albúmina de suero bovino al 5%, se lavaron los tubos con PBS, pH 7,4, y se secaron al vacío.

Especificidad de los anticuerpos

Las reactividades cruzadas de los diferentes anticuerpos se listan en la tabla 2.

Tabla 2:

Péptido para la inmunización	Secuencia de pre-proencefalina	Nombre de anticuerpo
(C)DAEEDD	119-125	NT-MRPENK
(C)EEDDSLANSSDLLK	121-134	NM-MRPENK
(C)LKELLETG	133-140	MR-MRPENK
(C)TGDNRERSHHQDGSDNE	139-155	MC-MRPENK
(C)SDNEEEVS	152-159	CT-MRPENK

Las reactividades cruzadas de los anticuerpos se determinaron de la manera siguiente:

se introdujo en tubos de poliestireno 1 µg de péptido en 300 µl de PBS, pH 7,4, mediante pipeteado y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, los tubos se lavaron 5 veces (cada vez con 1 ml) utilizando BSA al 5% en PBS, pH 7,4. SE añadió cada uno de los anticuerpos marcados (300 µl en PBS, pH 7,4, 800.000 URL/300 µl) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar 5 veces (cada vez con 1 ml de solución de lavado (PBS 20 mmoles/l, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%)), se cuantificó la

luminiscencia remanente (anticuerpo marcado) utilizando el instrumento AutoLumat LB 953. Se utilizó el péptido MRPENK como sustancia de referencia (100%).

Tabla 3:

Anticuerpo	DAEEDD	EEDDSLANSSDLLK	LKELLETG	TGDNRERSHHQDGSDNE	SDNEEEVS	MRPENK (SEC ID nº 6)
Péptido						
NT-MRPENK	121	10	<1	<1	<1	100
NM-MRPENK	<1	98	<1	<1	<1	100
MR-MRPENK	<1	<1	105	<1	<1	100
MC-MRPENK	<1	<1	<1	115	<1	100
CT-MRPENK	<1	<1	<1	<1	95	100

Todos los anticuerpos se unieron al péptido MRPENK, de manera comparable a los péptidos que se utilizaron para la inmunización. Excepto por el anticuerpo NT-MRPENK (reacción cruzada de 10% con EEDDSLANSSDLLK), ningún anticuerpo mostró una reacción cruzada con los péptidos MRK-PENK no utilizados para la inmunización del anticuerpo.

Inmunoensayo de proencefalina

Se introdujeron 50 µl de muestra (o calibrador) en tubos recubiertos; tras la adición de anticuerpo marcado (200 µl), los tubos se incubaron durante 2 h a una temperatura de entre 18ºC y 25ºC. El trazador no unido se eliminó mediante lavado 5 veces (cada vez con 1 ml) con solución de lavado (PBS 20 mmoles/l, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%). Se midió el anticuerpo marcado unido al tubo mediante la utilización de un instrumento Luminumeter LB 953 y una concentración fija de 1.000 pmoles/l de MRPENK. La proporción de señal (URL con 1.000 pmoles de MRPENK/l) a ruido (URL sin MRPENK) de las diferentes combinaciones de anticuerpos se proporciona en la tabla 4. Todos los anticuerpos fueron capaces de generar un complejo de tipo sándwich con cualquier otro anticuerpo. Inesperadamente, la proporción de señal a ruido más fuerte (la mejor sensibilidad) se generó mediante la combinación de anticuerpo de MR-MRPENK y anticuerpo de CT-MRPENK. Seguidamente, los presentes inventores utilizaron dicha combinación de anticuerpos como anticuerpo de recubrimiento de tubo y se utilizó el anticuerpo de CT-MRPENK como anticuerpo marcado.

Tabla 4:

	Anticuerpo de fase sólida	NT-MRPENK	NM-MRPENK	MR-MRPENK	MC-MRPENK	CT-MRPENK
Anticuerpo marcado						
NT-MRPENK		/	27	212	232	<1
NM-MRPENK		36	/	451	487	<1
MR-MRPENK		175	306	/	536	1050
MC-MRPENK		329	577	542	/	<1
CT-MRPENK		<1	615	1117	516	/

Calibración

El ensayo se calibró utilizando diluciones de MRPENK sintético, diluido en K_2PO_4 20 mM, EDTA 6 mM, BSA al 0,5%, amastatina 50 µM, leupeptina 100 µM, pH 8,0. El plasma de control con proencefalina se encuentra disponible de ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania.

La figura 1 muestra una curva de dosis/señal de proencefalina típica. Curva estándar de proencefalina.

La sensibilidad de ensayo era 20 determinaciones de calibrador 0 (sin adición de MRPENK + 2SD): 5,5 pmoles/l.

Estudio poblacional

Métodos

Los presentes inventores midieron la proencefalina en plasma en ayuno procedente de 2.559 participantes femeninos de la población basada en el examen de línea base del Malmö Diet and Cancer Study en 1991 a 1994 (edad: 58 ± 6 años y 59% de mujeres). Los presentes inventores utilizaron modelos de riesgos proporcionales de Cox ajustados para múltiples variables (todos los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, factores de riesgo de diabetes y en análisis de cáncer, también herencia de cáncer) para relacionar PENK de línea base (proporción de riesgos por cada incremento de desviación estándar de PENK transformada logarítmicamente)

con el tiempo del primer suceso de cada criterio de valoración estudiado durante una mediana de tiempo de seguimiento de más de 12 años. Se recuperaron los criterios de valoración del registro de altas hospitalarias del Swedish National Hospital, del registro sueco de infartos de miocardio, del registro de ictus de Malmö y del registro de cáncer sueco. Se validó la extracción de los criterios de valoración de dichos registros y se encontró que era exacta (ver también Belting et al., Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev; 1-10.2012 AACR).

Características clínicas de las mujeres en el estudio

Tabla 5:

Estadísticos descriptivos			
	N	Media	Desviación est.
Edad en el cribado en la unidad diagnóstica multidisciplinar (MDCS)	2559	57,554	5,9403
Presión sanguínea sistólica (mmHg)	2559	140,50	19,311
Presión sanguínea diastólica (mmHg)	2559	85,65	9,117
Índice de masa corporal (peso/kg x kg)	2559	25,5196	4,19083
CINTURA (cm)	2559	76,99	10,245
Glucosa (mmoles/l)	2559	5,0418	1,21798
Triglicéridos (mmoles/l)	2559	1,2245	0,58404
Lipoproteína de alta densidad (mmoles/l)	2559	1,5123	0,36949
Lipoproteína de baja densidad (mmoles/l)	2559	4,2016	1,04762
P-INSULINA	2512	7,223	5,4223

Figura 2: distribución de las frecuencias de proencefalina en la población femenina:

el valor medio era de 47,2 pmoles/l, desviación estándar=1,2 pmoles/l. El eje x es el logaritmo natural (LN) de la concentración de PENK. Todos los resultados se encontraban dentro de las mediciones del ensayo; la concentración de PENK más baja era de 9 pmoles/l. Estos resultados indican la idoneidad del ensayo utilizado (sensibilidad del ensayo: 5,5 pmoles/l).

PENK y predicción del cáncer de mama

Los presentes inventores evaluaron la relación entre la proencefalina y el cáncer de mama (Tabla 6). Se observó una relación fuerte entre proencefalina y cáncer de mama en mujeres. En un modelo totalmente ajustado, cada incremento de SD de proencefalina se asoció a una reducción del riesgo de 28,6% o cada SD de reducción de proencefalina (revPENK) se asoció a un riesgo incrementado en 40% de futuro cáncer de mama (Tabla 5) y el cuartil más alto frente al cuartil más bajo de proencefalina identificó una diferencia de más de 3 veces del riesgo de cáncer de mama (ver la tabla 7 y la figura 3).

Tabla 6:

Variables en la Ecuación°								
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	IC al 95,0% para Exp(B)	
							Inferior	Superior
EDAD	0,007	0,016	0,228	1	0,633	1,007	0,977	1,039
SEXO				0[a]				
BMI_B	0,026	0,025	1,139	1	0,286	1,027	0,978	1,077
DM_B	-0,242	0,407	0,352	1	0,553	0,785	0,354	1,744
HDL_B	0,044	0,252	0,031	1	0,860	1,045	0,638	1,714
LDL_B	-0,001	0,090	0,000	1	0,988	0,999	0,837	1,191
Fumador_actual	0,330	0,195	2,886	1	0,089	1,392	0,950	2,037
HER_CANCER_0	0,034	0,176	0,038	1	0,846	1,035	0,733	1,461
LNINS	-0,288	0,197	2,127	1	0,145	0,750	0,509	1,104
PuntuaciónZ-LNPENK_ mujeres_noCa	-0,337	0,082	16,858	1	0,000	0,714	0,608	0,839

Tabla 7:

CÁNCER DE MAMA							
	HR por cada 1 SD	Valor de P	cuartil 4	cuartil 3	cuartil 2	cuartil 1	P de la tendencia
Mujeres (2140 / 135)	1,40 (13-1,6)	<0,001	1,0 (ref)	1,50 (0,81-2,1)	2,7 (1,7-3,4)	3,6 (2,7-4,9)	<0,001

Modelos de riesgos proporcionales de Cox multivariante para proencefalina de línea base vs. incidencia de cáncer de mama.

Figura 3: gráficos de Kaplan-Meier, que ilustran el diagnóstico acumulado de cáncer de mama en mujeres. Cuartil (Q) 1 (inferior a 40,4 pmoles/l), cuartil 2 (40,4 a 47,1 pmoles/l), cuartil 3 (47,2 a 54,1 pmoles/l) y cuartil 4 (superior a 54,1 pmoles/l). Una PENK reducida indica un riesgo incrementado a largo plazo de desarrollo de cáncer de mama. Debido a que se excluyeron todas las mujeres con antecedentes de cáncer el día de la línea base (muestro de sangre) la proencefalina es altamente predictiva de futuro desarrollo de cáncer de mama. Globalmente, las mujeres de Q1 presentan un riesgo 3,6 veces más alto de desarrollar cáncer de mama que las mujeres de Q4.

Combinación de proencefalina y proneurotensina

Debido a que recientemente se ha demostrado que una proneurotensina creciente es altamente predictiva de cáncer de mama, los presentes inventores combinaron ambos biomarcadores para la predicción del cáncer de mama.

Ejemplos

Ensayo de proneurotensina

Se generaron los anticuerpos tal como se ha indicado anteriormente. Se generó el anticuerpo de marcaje (AM) contra P-NT 1-19 (H-CSDSEEEMKALEADFLTNMH (SEC ID nº 24) y el anticuerpo de fase sólida (AFS) contra el péptido P-NT 44-62 (CNLNSPAEETGEVHEEELVA (SEC ID nº 25)).

Inmunoensayo para la cuantificación de la proneurotensina humana

La tecnología utilizada fue un inmunoensayo de luminiscencia de tubo recubierto en sándwich, basado en el marcaje con éster de acridinio.

Se mezcló compuesto marcado (trazador): 100 µg (100 µl) de AM (se mezcló 1 mg/ml en PBS, pH 7,4, con 10 µl de NHS-éster de acridinio (1 mg/ml en acetonitrilo, InVent GmbH, Alemania) (patente nº EP 0 353 971) y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Se purificó el AM marcado mediante HPLC de filtración en gel en un instrumento Bio-Sil SEC 400-5 (Bio-Rad Laboratories Inc., USA). El AM purificado se diluyó en (fosfato de potasio 300 mmoles/l, NaCl 100 mmoles/l, Na-EDTA 10 mmoles/l y albúmina de suero bovino 5 g/l, pH 7,0). La concentración final era de aprox. 800.000 unidades relativas de luz (URL) de compuesto marcado (aprox. 20 ng de anticuerpo marcado) por cada 200 µl. Se midió la quimioluminiscencia del éster de acridinio mediante la utilización de un instrumento AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG).

Fase sólida: se recubrieron tubos de poliestireno (Greiner Bio-One International AG, Austria) (18 h a temperatura ambiente) con SPA (1,5 µg de SPA/0,3 ml de NaCl 100 mmoles/l, Tris/HCl 50 mmoles/l, pH 7,8). Tras el bloqueo con albúmina de suero bovino al 5%, los tubos se lavaron con PBS, pH 7,4 y se secaron al vacío.

Calibración:

El ensayo se calibró utilizando diluciones de suero humano que contenía proneurotensina. Se diluyó un pool de sueros humanos con elevada inmunorreactividad con proneurotensina (InVent Diagnostika, Hennigsdorf, Alemania) utilizando suero de caballo (Biochrom AG, Alemania) (estándares de ensayo).

Los estándares se calibraron mediante la utilización del calibrador de proneurotensina humana (ICI-Diagnostics, Berlin, Alemania). Alternativamente, el ensayo puede calibrarse con P-NT 1-117 sintético o recombinante o fragmentos del mismo (ver también Ernst et al., 2006).

Inmunoensayo de ProNT:

En tubos recubiertos con AFS se introdujeron 50 µl de muestra (o calibrador), tras añadir AM marcado (200 µl), los tubos se incubaron durante 16 a 22 h a una temperatura de entre 18ºC y 25ºC. El trazador no unido se eliminó mediante lavado 5 veces (cada vez con 1 ml) con solución de lavado (PBS 20 mmoles/l, pH 7,4, Triton X-100 al 0,1%). El AM unido al tubo se midió mediante la utilización de un instrumento Luminumeter LB 953. Se calcularon los resultados a partir de la curva de calibración.

Análisis combinado de proencefalina y PNT en la población femenina:

No se observó correlación significativa entre proencefalina y proneurotensina (p=0,56). En un modelo combinado en el que utilizaban ambos biomarcadores, los presentes inventores encontraron que ambos eran independientes

en la predicción del cáncer de mama.

En modelo totalmente ajustado, cada incremento de SD de PNT se asociaba a un incremento de riesgo de 49,9% de futuro cáncer de mama. Inesperadamente, tras la adición de PNT a la ecuación, PENK era todavía más fuerte que sin PTN y mostraba que por cada incremento de SD de proencefalina, se producía una reducción de riesgo de 30,8% o cada SD de reducción de proencefalina (revPENK) se asociada a un riesgo incrementado en 44,5% de futuro cáncer de mama (Tabla 8).

Tabla 8: análisis combinado de PNT y PENK en la predicción de cáncer de mama.

Variables en la ecuación								
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	IC al 95,0% para Exp(B)	
							Inferior	Superior
EDAD	-0,003	0,019	0,020	1	0,888	0,997	0,960	1,036
fumador_actual0	0,434	0,204	4,505	1	0,034	1,543	1,034	2,304
IMC_B	0,001	0,027	0,001	1	0,979	1,001	0,948	1,056
GFR_CG_BSAcorr	-0,005	0,008	0,357	1	0,550	0,995	0,979	1,011
hrt_curr	0,730	0,201	13,146	1	0,000	2,075	1,399	3,079
PNT	0,405	0,091	19,731	1	0,000	1,499	1,254	1,793
PENK	-0,368	0,088	17,416	1	0,000	0,692	0,582	0,823

El cuartil más alto vs. el cuartil más bajo de PNT indicó un riesgo 2,56 veces más alto de desarrollo de cáncer de mama y proencefalina sumada a PNT cuartil más bajo vs. cuartil más alto (rev=cuartiles inversos Q1=Q4, Q2=Q3, Q3=Q2, Q4=Q1) un riesgo independiente 3,6 veces superior (Tabla 9).

La combinación del cuartil más alto de PNT y el cuartil más bajo de proencefalina vs. cuartil de PNT más bajo y cuartil de proencefalina más alto mostraron un riesgo combinado de 6,17 (ver la figura 3).

Tabla 9: análisis combinado de PNT y PENK para la predicción del cáncer de mama.

Tabla 9:

Variables en la ecuación							
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	IC al 95,0%
							Inferior
EDAD	-0,022	0,018	1,468	1	0,226	0,978	0,943
fumador-actual0	0,391	0,200	3,808	1	0,051	1,478	0,998
hrt_curr	0,652	0,195	11,145	1	0,001	1,920	1,309
IMC_b	0,012	0,025	0,247	1	0,619	1,012	0,964
GFR_CG_BSAcorr	-0,012	0,008	2,279	1	0,131	0,988	0,972
NLN_PNT			13,898	3	0,003		
NLN_PNT(1)	0,353	0,301	1,378	1	0,241	1,424	0,789
NLN_PNT(2)	0,604	0,286	4,452	1	0,035	1,830	1,044
NLN_PNT(3)	0,942	0,269	12,260	1	0,000	2,566	1,514
Q_PENK_rev			23,361	3	0,000		
Q_PENK_rev(1)	0,410	0,331	1,534	1	0,215	1,507	0,787
Q_PENK_rev(2)	0,979	0,305	10,299	1	0,001		1,464
4 PENK rev(3)	1,284	0,300	18,315	1	0,000	3,610	2,005

Figura 4: ejemplo ilustrativo del análisis combinado de proencefalina para la predicción del cáncer de mama:

los presentes inventores combinaron las mujeres con el cuartil de proencefalina más bajo (1º) y el cuartil de proneurotensina más alto (4º) (grupo 3). En ese grupo de alto riesgo, aproximadamente 19,02% de las mujeres desarrollaron cáncer de mama dentro de los 15 años siguientes.

El grupo 2 es una combinación de mujeres con 3º cuartil de proneurotensina y 2º cuartil de proencefalina más 2º cuartil de proneurotensina y 3º cuartil de proencefalina. Dentro de dicho grupo de riesgo intermedio, aproximadamente 7,48% de las mujeres desarrollaron cáncer de mama dentro de los 15 años siguientes.

El grupo 1 es una combinación de mujeres con 1º cuartil de proneurotensina y 4º cuartil de proencefalina. Dentro de dicho grupo de bajo riesgo, aproximadamente 3,08% de las mujeres desarrollaron cáncer de mama dentro de los 15 años siguientes. El cociente de riesgos entre el grupo 1 y el grupo 3 era de aproximadamente 6,17.

Cáncer de pulmón

La proencefalina también predice el cáncer de pulmón en mujeres.

Desarrollaron cáncer de pulmón 40 mujeres durante el periodo de observación. La proencefalina no es diferente en mujeres fumadoras y no fumadoras (p=0,44). Tal como se esperaba, el tabaquismo es un marcador predictivo fuerte de riesgo de cáncer de pulmón (p<0,0001). Inesperadamente, aunque el tabaquismo es parte de la ecuación, un nivel bajo de proencefalina indicaba un riesgo de 3,2 veces de desarrollar cáncer de pulmón (Tablas 10a y 10b).

Tablas 10a y 10b: PENK en la predicción de cáncer de pulmón en mujeres. Las mujeres se agruparon en terciles (ver la tabla 10a) y después se analizaron para el desarrollo de cáncer de pulmón (ver la tabla 10b). rev=tercil más alto (tercil 3), rev (1)=tercil 2 y rev(2)=tercil más bajo (tercil 1).

Tabla 10a:

PENK [pmoles/l]			
Grupo percentil de PENK (pmoles/l)	Mediana	Mínimo	Máximo
1	37,80000	9,000	42,800
2	47,20000	42,900	51,300
3	58,30000	51,400	518,100
Total	47,25000	9,000	518,100

Tabla 10b:

Variables en la ecuación						
	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)
EDAD	0,045	0,040	1,251	1	0,263	1,046
fumador actual0	1,897	0,427	19,761	1	0,000	6,667
IMC_B	-0,034	0,063	0,287	1	0,592	0,967
GFR_CG_BSAcorr	-0,024	0,019	1,592	1	0,207	0,976
T_PENK_mujeres_rev			6,698	2	0,035	
T_PENK_mujeres_rev(1)	0,208	0,580	0,128	1	0,721	1,231
T_PENK_mujeres_rev(2)	1,168	0,511	5,220	1	0,022	3,214

Descripción de las figuras

Figura 1: muestra una curva típica de dosis de proencefalina/señal. Curva estándar de proencefalina.

Figura 2: distribución de frecuencias de proencefalina en la población de mujeres.

Figura 3: gráficos de Kaplan-Meier que ilustran el diagnóstico acumulado de cáncer de mama en mujeres, cuartil (Q) 1 (inferior a 40,4 pmoles/l), cuartil 2 (40,4 a 47,1 pmoles/l), cuartil 3 (47,2 a 54,1 pmoles/l y cuartil 4 (superior a 54,1 pmoles/l). PENK reducido indica un riesgo incrementado a largo plazo de desarrollo de cáncer de mama. Debido a que se excluyeron cualesquiera mujeres con antecedentes de cáncer el día de línea base (muestreo de sangre), la proencefalina es altamente predictiva del futuro desarrollo de cáncer de mama. Globalmente, las mujeres de Q1 presentan un riesgo 3,6 veces más alto de desarrollar cáncer de mama que las mujeres de Q4.

Figura 4: ejemplo ilustrativo del análisis combinado de proencefalina para la predicción del cáncer de mama.

REIVINDICACIONES

1. Método para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no padece cáncer, que comprende:

- determinar el nivel de proencefalina o fragmentos de la misma en un líquido corporal obtenido a partir de dicho sujeto femenino; y

- correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma con el riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer;

en el que un nivel reducido significa un nivel inferior a un umbral determinado;

en el que dicha proencefalina o fragmento de la misma se selecciona de entre el grupo que comprende SEC ID nº 1, SEC ID nº 2, SEC ID nº 5, SEC ID nº 6, SEC ID nº 8, SEC ID nº 9, SEC ID nº 10 y SEC ID nº 11.

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho cáncer es cáncer de mama o cáncer de pulmón.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que dicho sujeto femenino nunca ha presentado antecedentes de diagnóstico de cáncer en el momento de toma de muestra de líquido corporal de dicho sujeto femenino.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho sujeto femenino ha presentado antecedentes de diagnóstico de cáncer y se ha curado en el momento de toma de muestra de líquido corporal de dicho sujeto femenino y se determina el riesgo de reincidencia de contraer cáncer de mama.

5. Método según las reivindicaciones 1 a 4, en el que, en el momento de toma de muestra de líquido corporal de dicho sujeto femenino, se diagnostica que dicho sujeto femenino presenta una enfermedad cardiovascular o diabetes.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5, en el que se determina adicionalmente por lo menos un parámetro clínico seleccionado de entre el grupo que comprende: edad, presencia de diabetes mellitus y tabaquismo actual.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de proencefalina se mide con un inmunoensayo.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho método se lleva a cabo más de una vez para monitorizar el riesgo de contraer cáncer de mama en un sujeto femenino o para monitorizar el curso del tratamiento.

9. Método según la reivindicación 8, en el que dicha monitorización se lleva a cabo para evaluar la respuesta de dicho sujeto femenino a las medidas preventivas y/o terapéuticas adoptadas.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para estratificar dichos sujetos femeninos en grupos de riesgo.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que se encuentran comprendidas las etapas siguientes:

- determinar el nivel de proneurotensina 1-117 (SEC ID nº 17) en un líquido corporal obtenido a partir de dicho sujeto femenino; y

- correlacionar dicho nivel de proencefalina o fragmentos de la misma y proneurotensina 1-117 (SEC ID nº 17) con un riesgo de contraer cáncer, en el que un nivel reducido de proencefalina es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer y en el que un nivel incrementado de proneurotensina es predictivo de un riesgo aumentado de contraer cáncer.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que un nivel reducido de proencefalina o fragmentos de la misma es un nivel inferior a un umbral en el que dicho umbral es inferior a 100 pmoles/l.

13. Método según las reivindicaciones 11 y 12, en el que un nivel incrementado de proneurotensina o fragmentos de la misma es un nivel superior a un umbral, en el que dicho umbral es superior a 78 pmoles/l.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el líquido corporal es sangre o plasma o suero.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que se determina el nivel de MR-proencefalina (SEC ID nº 6) y/o proneurotensina 1-117 (SEC ID nº 17).

16. Kit para determinar la proencefalina y los fragmentos de proencefalina en una muestra que comprende dos agentes de unión que se unen a dos regiones diferentes dentro de la región de la proencefalina que es el aminoácido 133-140 (LKELLETG, SEC ID nº 22) y aminoácido 152-159 (SDNEEEVS, SEC ID nº 23), en el que cada una de dichas regiones comprende por lo menos 4 o 5 aminoácidos.

17. Kit según la reivindicación 16, en el que dicho kit es suficientemente sensible para cuantificar la proencefalina o los fragmentos de proencefalina de sujetos sanos y presenta una sensibilidad de ensayo analítica <15 pmoles/l.

18. Utilización de un kit según la reivindicación 16 o 17 para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no padece cáncer y/o para la estratificación de dichos sujetos femeninos en grupos de riesgo, que comprende un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

19. Utilización de un kit según la reivindicación 16 o 17 para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no padece cáncer y/o para la estratificación de dichos sujetos femeninos en un grupo que debería obtener una terapia de factor de crecimiento opioide (OGF), que comprende un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

20. Kit según la reivindicación 16 o 17, en el que el nivel de proencefalina y fragmentos de proencefalina se utiliza para predecir el riesgo de contraer cáncer en un sujeto femenino que no padece cáncer.

Fig. 1:

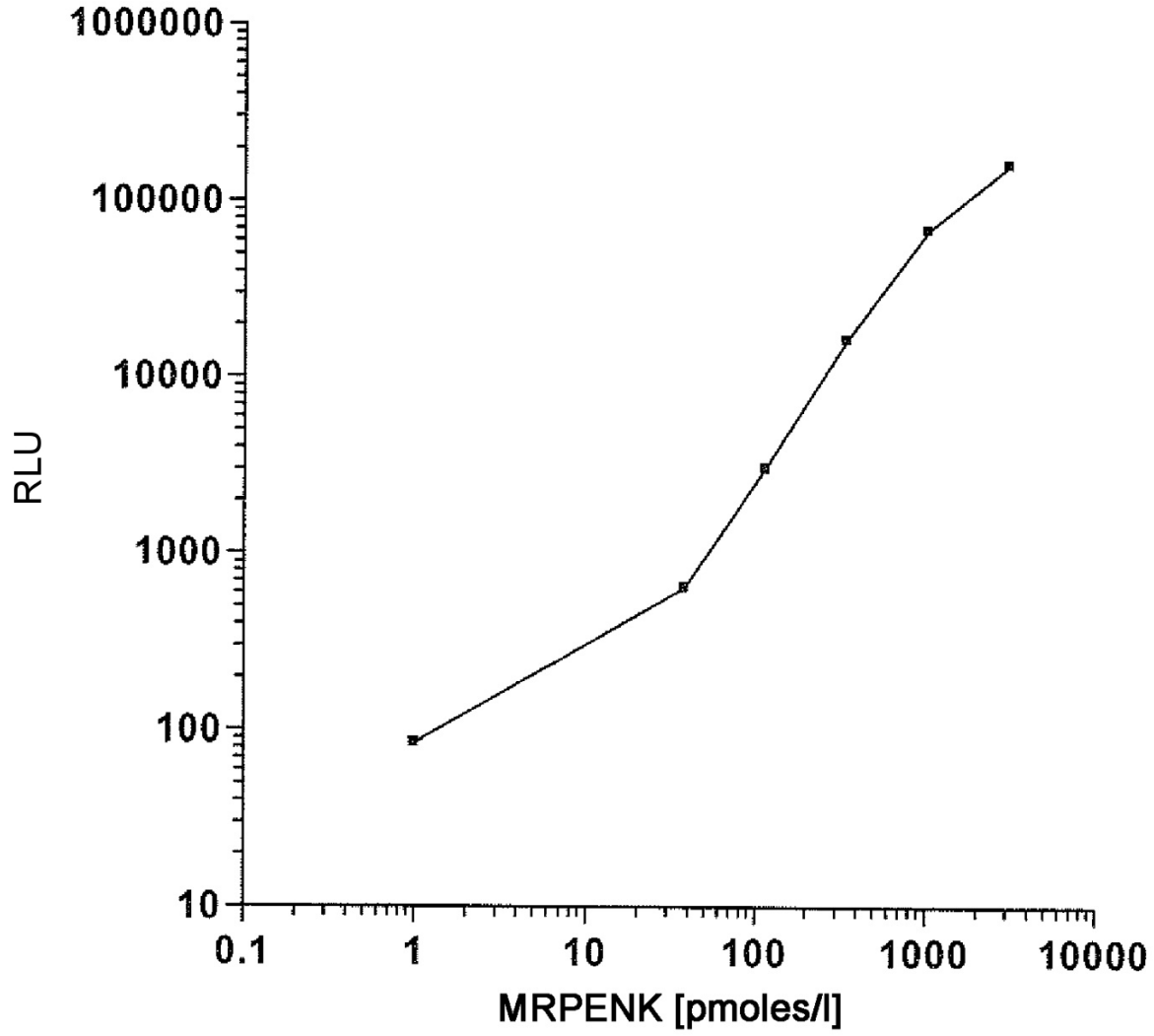

1000000
100000
10000
1000
100
10
RLU
0.1
1
10
100
1000
10000
MRPENK [pmoles/l]

Fig. 2:

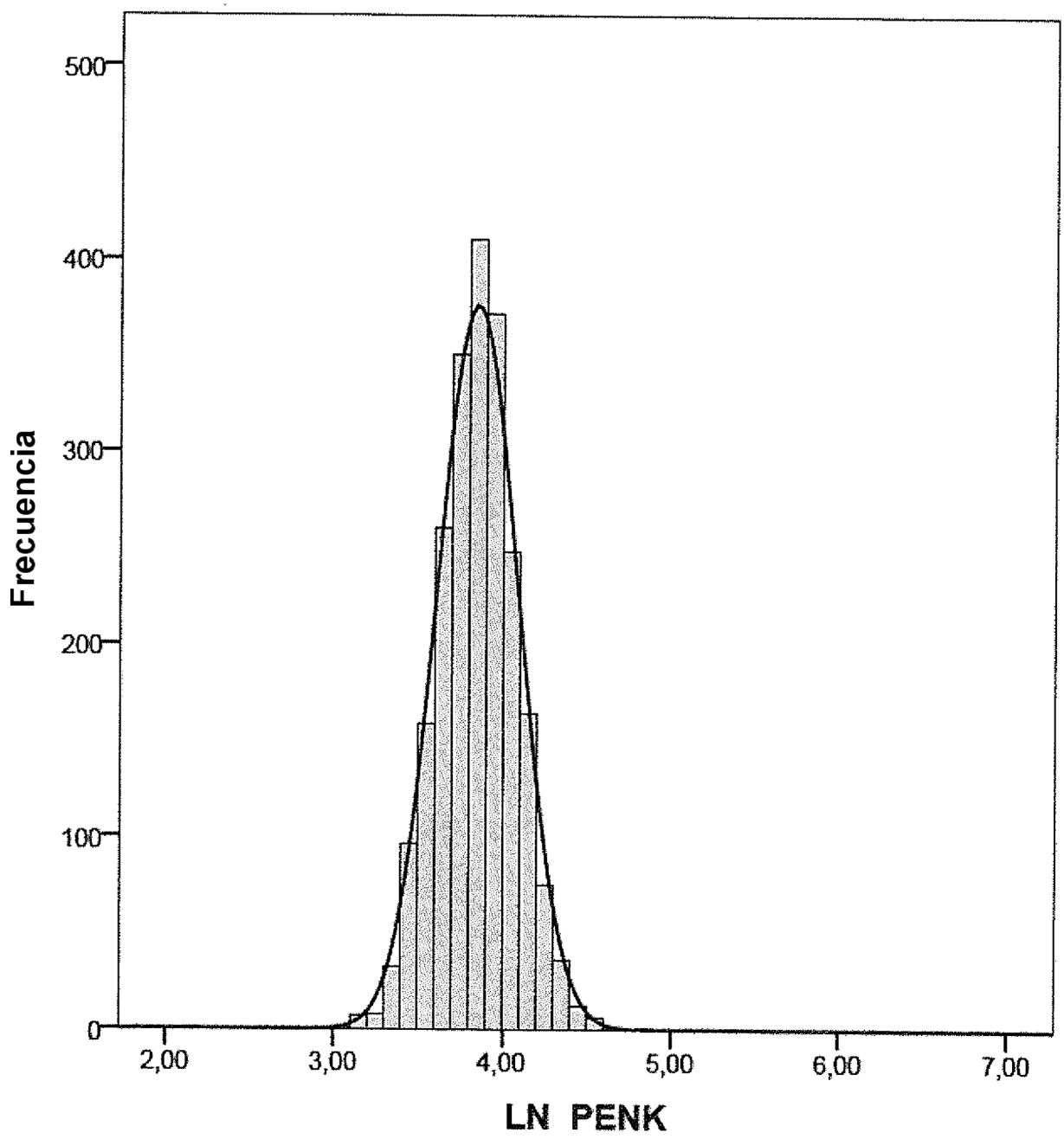

500
400
300
200
100
0
Frecuencia
2,00
3,00
4,00
5,00
6,00
7,00
LN PENK

Fig. 3:

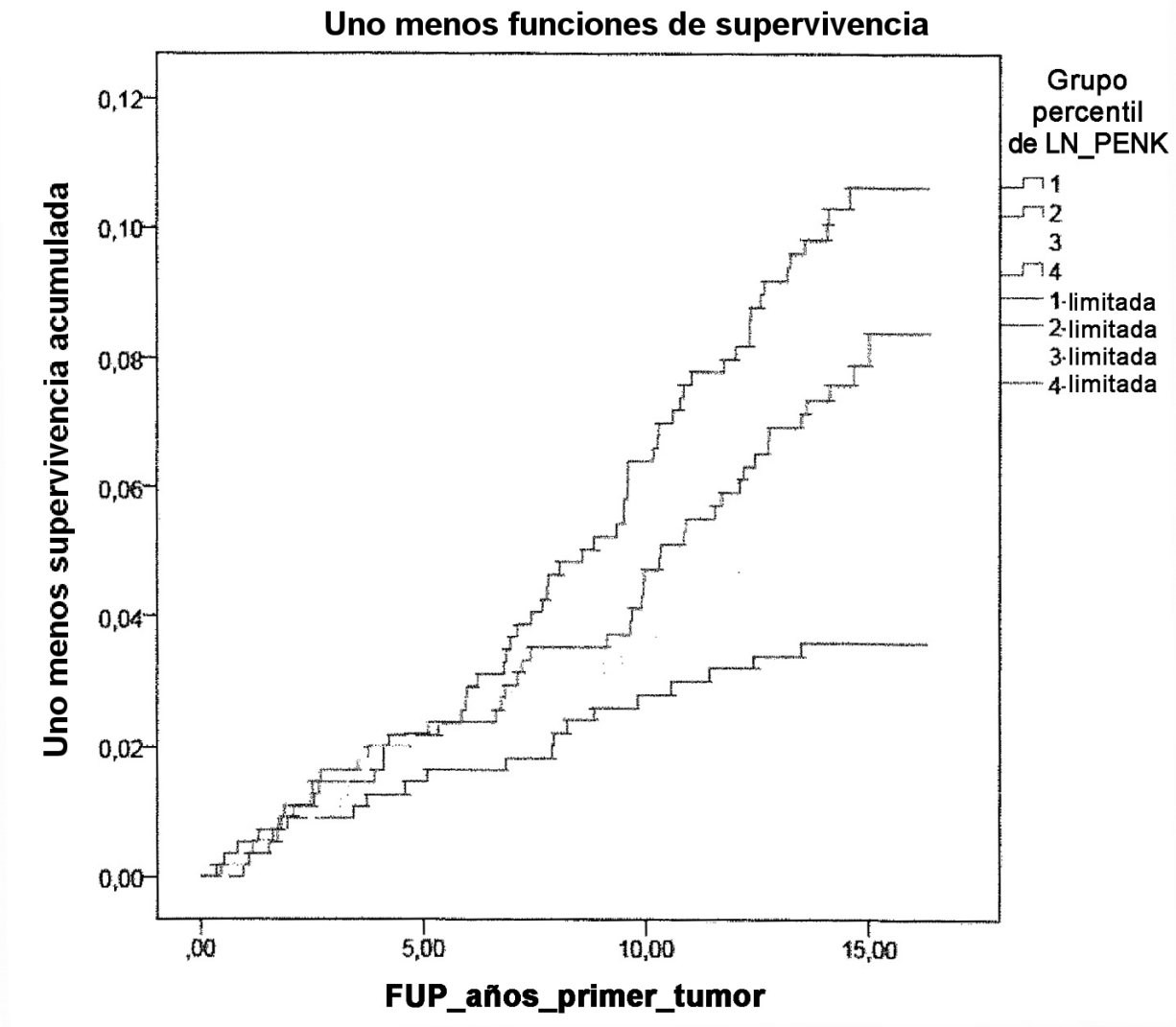
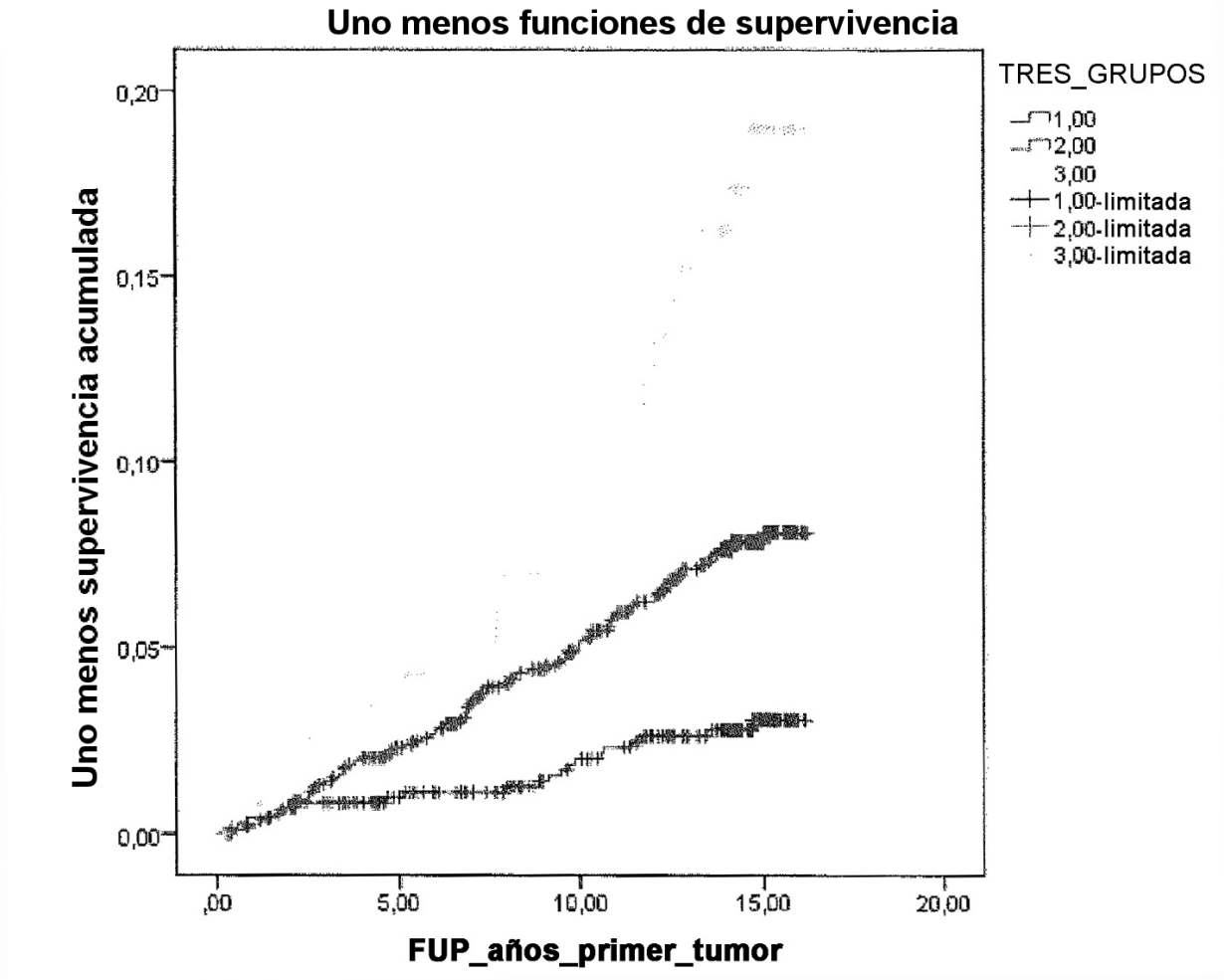

Uno menos funciones de supervivencia
Uno menos supervivencia acumulada
0,12
0,10
0,08
0,06
0,04
0,02
0,00
,00
5,00
10,00
15,00
FUP_años_primer_tumor
Grupo percentil de LN_PENK
1
2
3
4
1-limitada
2-limitada
3-limitada
4-limitada

Fig. 4:


Uno menos funciones de supervivencia
Uno menos supervivencia acumulada
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
,00
5,00
10,00
15,00
20,00
FUP_años_primer_tumor
TRES_GRUPOS
1,00
2,00
3,00
1,00-limitada
2,00-limitada
3,00-limitada