

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 055**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.12.2016 PCT/EP2016/081325**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17103034**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2016 E 16815821 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020 EP 3391053**

54 Título: **Métodos de detección de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón basándose en la proteína 4 del epidídimo humano (HE 4) marcadora y usos relacionados**

30 Prioridad:

17.12.2015 EP 15003607

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

06.11.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DAYYANI, FARSHID;
KRAUSE, FRIEDEMANN;
ESCHERICH, ACHIM;
WEHNL, BIRGIT;
HE, YING;
ROLNY, VINZENT;
RUTZ, SANDRA;
MULEY, THOMAS;
HERTH, FELIX y
RIEDLINGER, JULIA**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 792 055 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

Métodos de detección de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón basándose en la proteína 4 del epidídimo humano (HE 4) marcadora y usos relacionados

5 La presente invención se refiere a un método de detección de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón en un individuo basándose en la proteína 4 del epidídimo humano (HE4) marcadora y fragmentos de citoqueratina-19 (Cyfra21-1) así como el uso de los marcadores en la evaluación *in vitro* de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón.

10 El cáncer de pulmón es el cáncer más común en todo el mundo, con aproximadamente 1,8 millones de casos nuevos y 1,6 millones de muertes en 2012. El tratamiento para el cáncer de pulmón depende del tipo de célula específica del cáncer, hasta qué punto se ha diseminado y el estado general de la persona. Los tratamientos comunes incluyen cuidados paliativos, cirugía, quimioterapia y radioterapia. La terapia dirigida del cáncer de pulmón está creciendo en importancia para el cáncer de pulmón avanzado. Después de una terapia exitosa, los pacientes necesitan monitorizarse cuidadosamente para detectar una recidiva. Los factores pronósticos en el NSCLC incluyen la presencia o ausencia de síntomas pulmonares, el tamaño del tumor, el tipo de célula (histología), el grado de diseminación (estadio) y las metástasis a múltiples ganglios linfáticos e invasión vascular. Para el NSCLC, el mejor pronóstico se logra con la resección quirúrgica completa de la enfermedad en estadio IA, con hasta un 70% de supervivencia a los cinco años.

15 El tratamiento habitual para la vigilancia de pacientes con adenocarcinoma del pulmón (ACL) después de la resección para detectar recidiva es la obtención de imágenes avanzada, en la mayoría de los casos tomografía computarizada. Hasta la fecha, las pruebas *in vitro*, por ejemplo, pruebas sanguíneas basadas en proteínas marcadoras, no se usan de manera rutinaria en la detección temprana de una recidiva.

20 Se han sugerido fragmentos de citoqueratina-19 (Cyfra21-1) como marcador para detectar recidiva en un cáncer de pulmón. Se ha demostrado en un pequeño número de pacientes con recidiva (n = 15) que los niveles de Cyfra21-1 aumentan antes o en el momento de la recaída. Sin embargo, los pacientes no se distinguen por histología, y tampoco hay ninguna enseñanza para guiar la toma de decisiones clínicas (por ejemplo, obtención de imágenes para detectar recidiva) (Niklinski *et al.*, 1995, J Cardiovasc Surg (Torino) 36(5): 501-514). Este hallazgo lo confirmó otro grupo de trabajo, que también usó Cyfra21-1, de nuevo en una pequeña cohorte de pacientes (n = 15), para describir aumentos en los niveles de Cyfra21-1 en la recidiva (Stieber *et al.*, 1999, Anticancer Research 19: 2665-2668). Sin embargo, este artículo tampoco distingue entre ACL (adenocarcinoma del pulmón) y no ACL. Además, Cyfra21-1 aún no se ha convertido en un marcador de monitorización establecido en el diagnóstico temprano de una recidiva.

30 Por consiguiente, todavía existe la necesidad de un método de prueba *in vitro* adecuado que evite o minimice la necesidad de los métodos de obtención de imágenes anteriores, que son adecuados sólo para tumores de un tamaño considerable, que son costosos y están asociados con exposición a la radiación.

35 De manera sorprendente, se encontró que la proteína 4 del epidídimo humano (HE4) en combinación con Cyfra21-1 es adecuada en la detección temprana de una recidiva. Tal como se muestra en el ejemplo y la figura 1, se encontró que HE4 era ligeramente superior a Cyfra21-1 y la combinación de HE4 y Cyfra21-1 produjo los mejores resultados en la detección temprana de recidiva con respecto a la sensibilidad y el área bajo la curva (AUC).

40 La presente divulgación proporciona un método de detección de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón en un individuo, comprendiendo el método

50 a) medir en una muestra obtenida del individuo la cantidad o concentración de la molécula marcadora proteína 4 del epidídimo humano (HE4), y

b) detectar recidiva comparando la cantidad o concentración determinada en la etapa (a) con la cantidad o concentración tal como se establece en un control, en el que un valor aumentado de HE4 en relación con el control es indicativo de la recidiva.

Opcionalmente, la etapa (a) comprende además medir en una muestra obtenida del individuo la cantidad o concentración de los fragmentos de la molécula marcadora citoqueratina-19 (CYFRA 21-1), en el que un valor aumentado de CYFRA 21-1 en relación con el control es indicativo de la recidiva.

60 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de detección de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón en un individuo, comprendiendo el método

65 a) medir en una muestra obtenida del individuo la cantidad o concentración de las moléculas marcadoras HE4 y CYFRA 21-1, y

b) detectar recidiva comparando el valor combinado para los marcadores determinados en la etapa (a) con el valor combinado tal como se establece en un control, en el que un valor combinado aumentado en relación con el control es indicativo de la recidiva.

5 HE4 codifica para una proteína que contiene el dominio WAP (proteína ácida de suero) altamente conservada (13 kD), lo que sugiere una supuesta actividad inhibidora de la serina proteasa. En su forma glicosilada madura, la proteína es de aproximadamente 20-25 kD, y consiste en un péptido único que contiene dos dominios WFDC (núcleo de cuatro disulfuros ácidos de suero). La proteína está implicada en la maduración de los espermatozoides y potencialmente tiene un papel en la inmunidad natural, pero se desconoce la función biológica de HE4.
10 Curiosamente, HE4 se identificó como el gen más regulado por incremento en los riñones fibróticos de perros. También se informó que HE4 se reguló por incremento significativamente en los riñones fibróticos de ratones, y se encontró que su nivel de transcripción en biopsias de trasplante de riñón humano estaba fuertemente correlacionado con la baja tasa de filtración glomerular estimada. A pesar de estas observaciones, el papel de HE4 en la fibrosis renal y su supuesta actividad de serina proteasa ha permanecido sin explorar.

15 El ADNc de HE4 se aisló por primera vez del epidídimo humano (Kirchhoff *et al.*, 1991 Biol. Reprod. 45: 350-357), y luego se detectó el ADNc de HE4 con alta frecuencia en bibliotecas de ADNc construidas a partir de carcinomas de ovario (Wang *et al.*, 1999 Gene 229:101; Schummer *et al.*, 1999 Gene 238:375). La secuencia corregida de HE4a se dio a conocer en Hellstrom *et al.*, 2003, Cane. Res. 63: 3695-3700 y en la patente estadounidense 7.270.960. HE4a presenta una secuencia de aminoácidos que es muy similar a, pero distinta de, la secuencia deducida de la molécula que se denominó HE4 en publicaciones anteriores. Para los fines de esta divulgación, HE4 o HE4a se consideran sinónimos, y en el presente documento también se denominan HE4. Las secuencias de aminoácidos de HE4 y la secuencia corregida de HE4a se conocen a partir de Kirchhoff *et al.*, anteriormente, y la patente US 7.270.960, respectivamente.

25 Hasta ahora, HE4 se ha sugerido como agente pronóstico, pero no como marcador de monitorización. Los biomarcadores tumorales pueden dividirse en diferentes tipos. Un marcador pronóstico es una característica clínica o biológica que puede medirse objetivamente y que proporciona información sobre el resultado probable de la enfermedad del cáncer. Indica cómo evolucionará probablemente el paciente durante el transcurso de la enfermedad (por ejemplo, si tiene una enfermedad más agresiva y una supervivencia corta o no, etc.) y cómo se comportará probablemente la enfermedad en cualquier momento. Su objetivo es evaluar objetivamente el resultado global del paciente, tal como la probabilidad de recaída del cáncer después del tratamiento convencional. Normalmente, los biomarcadores pronósticos se miden y evalúan en el momento del diagnóstico. La presencia o ausencia de un marcador pronóstico puede ser útil para la selección de pacientes para el tratamiento. Por el contrario, un marcador de monitorización es una característica clínica o biológica que proporciona información sobre el momento de la recaída del cáncer y predice o indica cuándo va a regresar o ha regresado el cáncer. Su objetivo es evaluar objetivamente el momento de necesidad de una intervención clínica específica. De manera importante, los factores pronósticos definen los efectos de las características del paciente o del tumor en el resultado del paciente, mientras que los factores de monitorización definen el momento para la recaída de la enfermedad. Por consiguiente, el marcador de monitorización se mide después del tratamiento. La medición puede repetirse con el fin de monitorizar al paciente, por ejemplo, con frecuencia (al menos 3, 4 ó 5 veces), a intervalos fijos (por ejemplo, cada 3 ó 6 meses) o en momentos predeterminados, etc. (por ejemplo, 3, 6 ó 9 meses desde el tratamiento o cada año completo después del tratamiento). Antes de la presente invención, se encontró que la expresión de HE4 está asociada con un peor pronóstico y es un posible factor pronóstico de adenocarcinoma de pulmón (Yamashita *et al.*, 2011, Tumor Biol. 32: 265-271; Yamashita *et al.*, 2012, Tumor Biol. 33: 2365-2370; Yamashita *et al.*, 2012, J Thoracic Oncology 7 (6), supl. 1, S44, Tokushi *et al.*, 2012, Tumor Biol. 33: 103-109). Por consiguiente, se sugirió que HE4 tenía un valor pronóstico. HE4 aún no se conoce como marcador de monitorización, y menos aún para el adenocarcinoma de pulmón. Cyfra21-1 pertenece a la familia de las citoqueratinas. Las citoqueratinas son proteínas estructurales que forman las subunidades de los filamentos intermedios epiteliales, que es un componente principal del citoesqueleto celular. Hasta ahora se han identificado veinte polipéptidos de citoqueratina diferentes con pesos moleculares que oscilan entre 40 y 70 kilodaltons (kD). El tipo de citoqueratina sintetizada por una célula también se ve afectada por la tasa de crecimiento y de diferenciación. Debido a sus patrones de distribución específicos, son eminentemente adecuados para su uso como marcadores de diferenciación en patología tumoral. CYFRA21-1 es un fragmento de citoqueratina 19 que forma parte del citoesqueleto en las células epiteliales y puede encontrarse de forma sobreexpresada en tumores de origen epitelial. Los polipéptidos de citoqueratina intactos son poco solubles, pero pueden detectarse fragmentos solubles en suero (Bodenmueller *et al.*, 1994, Int. J. Biol. Markers 9: 75-81). CYFRA21-1 es un marcador bien establecido para el carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La indicación principal para CYFRA21-1 es monitorizar el transcurso del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) (Sturgeon, 2001, Clinical Chemistry 48: 1151-1159). En el diagnóstico primario, altos niveles séricos de CYFRA21-1 indican un estadio tumoral avanzado y un mal pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (van der Gaast *et al.*, 1994, Br. J. Cancer 69: 525-528). Un valor normal o sólo ligeramente elevado no descarta la presencia de un tumor. La terapia exitosa está documentada por una caída rápida en el nivel sérico de CYFRA21-1 dentro del intervalo normal. Un valor constante de CYFRA21-1 o una disminución leve o sólo lenta en el valor de CYFRA21-1 indica la extirpación incompleta de un tumor o la presencia de múltiples tumores con las correspondientes consecuencias terapéuticas y pronósticas. CYFRA 21-1 se ha sugerido como marcador de monitorización (Yeh *et al.*, 2002, Lung 180: 273-279 y Kao *et al.*, 1999, Lung 177: 333-337).

El cáncer de pulmón también se conoce como carcinoma de pulmón o carcinoma pulmonar, y es un tumor pulmonar maligno caracterizado por un crecimiento celular descontrolado en los tejidos del pulmón. Si no se trata, este crecimiento puede diseminarse más allá del pulmón mediante el proceso de metástasis en el tejido cercano u otras partes del cuerpo. La mayoría de los cánceres que comienzan en el pulmón, conocidos como cánceres primarios de pulmón, son carcinomas que se derivan de las células epiteliales. Los cuatro tipos histológicos principales de cáncer de pulmón son carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas (SCLC). Los primeros tres subtipos se denominan generalmente carcinoma de células no pequeñas (NSCLC) y representan aproximadamente el 80% del cáncer de pulmón. En general, el diagnóstico del tumor pulmonar se basa en métodos de obtención de imágenes y análisis de muestras de biopsia. El esquema de tumores de pulmón de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2004 ha sido la base para la clasificación del cáncer de pulmón. Esto incorporó una serie de desarrollos, incluyendo el reconocimiento de la heterogeneidad del carcinoma de pulmón, la introducción de técnicas de tinción inmunohistoquímica diagnóstica (IHC) para el diagnóstico de rutina de algunos tumores neuroendocrinos y el reconocimiento de entidades recientemente descritas tales como adenocarcinoma fetal, tumores quísticos mucinosos y carcinoma neuroendocrino de células grandes.

En 2011, un panel de expertos multidisciplinario que representaba a la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC), la Sociedad Torácica Americana (ATS) y la Sociedad Respiratoria Europea (ERS) propuso una revisión importante del sistema de clasificación. Estos cambios afectan principalmente a la clasificación del adenocarcinoma y a su distinción del carcinoma de células escamosas. El criterio internacional actual para la clasificación de tumores por oncólogos y patólogos se proporciona por la "Clasificación de tumores de pulmón, pleura, timo y corazón de la OMS" (Travis *et al*, 2015, Clasificación de tumores de la OMS, volumen 7, cuarta edición). En caso de duda en el contexto de la presente invención, se aplicará el criterio anterior.

El adenocarcinoma es el tipo de cáncer de pulmón más común en las series contemporáneas, y representa aproximadamente la mitad de los casos de cáncer de pulmón. Se piensa que la mayor incidencia de adenocarcinoma se debe a la introducción de cigarrillos con filtro de bajo contenido de alquitrán en la década de 1960, aunque dicha causalidad no está probada. El adenocarcinoma de pulmón es un tipo de cáncer de pulmón que se forma en las glándulas secretoras de moco de todo el cuerpo. El tratamiento aceptado para el adenocarcinoma de pulmón en estadios I y II es la resección quirúrgica, con resecciones lobulares completas o mayores preferibles a las resecciones sublobulares (véase también a continuación). La realización de la disección sistemática de los ganglios linfáticos mediastínicos mejora la precisión de la estadificación y puede tener beneficios terapéuticos. Al menos el 50% de estos pacientes desarrollarán recidiva local o metástasis a distancia. Por tanto, la detección temprana de la recidiva es de gran relevancia para el adenocarcinoma de pulmón.

Tal como se detalla en el presente documento, la presente invención se refiere a detectar una recidiva. Una recidiva es una recaída de un estado médico pasado, actualmente el adenocarcinoma de pulmón. Los signos y síntomas del estado regresan después de una remisión. La recaída del cáncer se define como el regreso del cáncer después del tratamiento y después de un periodo de tiempo durante el cual el cáncer no puede detectarse. El mismo cáncer vuelve a aparecer en el mismo sitio en el que se encontró o muy cerca del mismo.

La recidiva debe detectarse en un individuo. El individuo según la presente invención puede ser cualquier ser humano o animal no humano, especialmente un mamífero. Por tanto, los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden aplicarse a una enfermedad tanto humana como veterinaria. Evidentemente, los mamíferos no humanos de particular interés incluyen animales domésticos, mascotas y animales de valor comercial (por ejemplo, animales domésticos tales como caballos) o de valor personal (por ejemplo, mascotas tales como perros, gatos).

El método se prefiere especialmente con sujetos humanos, para los que se emplean comúnmente métodos de diagnóstico que incluyen monitorizar una recidiva. Por tanto, en una realización particularmente preferida, el individuo es un ser humano. De manera alternativa o adicional, el individuo se considera tratado con éxito con respecto al adenocarcinoma de pulmón, particularmente mediante resección y/o quimioterapia. "Tratado con éxito" con respecto al adenocarcinoma de pulmón significa que el paciente después del tratamiento ya no muestra ningún signo ni síntoma clínico de adenocarcinoma de pulmón. Sin embargo, pueden permanecer en el cuerpo células cancerosas sin detectar después del tratamiento, haciendo que luego regrese el cáncer (denominado recaída o recidiva).

"Resección" es la extirpación quirúrgica de parte o todo el órgano o estructura dañado, particularmente la extirpación de un tumor. La resección pulmonar es la extirpación quirúrgica de todo o parte del pulmón. El tipo de resección se basará en la ubicación, el tamaño y el tipo de tumor, así como la salud general y la función pulmonar antes del diagnóstico. En el lado derecho, el pulmón tiene tres lóbulos y en el lado izquierdo hay dos lóbulos. Habitualmente, una operación para el cáncer implica extirpar un lóbulo, lo que se denomina lobectomía. La resección en cuña o la segmentectomía se refieren a la extirpación de un área del pulmón más pequeña que un lóbulo, generalmente el tumor y una pequeña área de tejido pulmonar sano a su alrededor. Este es un tratamiento usado para el cáncer en estadio temprano y, a veces, para extirpar una parte de pulmón donde se sospecha pero no se ha demostrado el cáncer. En una lobectomía, el cirujano extirpa un lóbulo de los pulmones. Esta es la operación habitual que se

realiza para el cáncer de pulmón, ya que tiene la mejor posibilidad de extirpar todo el tejido canceroso y disminuir la posibilidad de que regrese el cáncer. La neumonectomía es la extirpación de un pulmón completo. Esta opción se considera si un tumor es especialmente grande, o está en una posición central o difícil de alcanzar en el pulmón. Aunque la neumonectomía puede dar como resultado una pérdida significativa de la función, muchas personas viven bastante bien con un solo pulmón.

“Quimioterapia” es un tratamiento farmacológico para el cáncer. Habitualmente es sistémico, lo que significa que circula y afecta a todo el cuerpo. Los fármacos entran en el torrente sanguíneo y destruyen las células anómalas o impiden su división. Con mayor frecuencia se administran por infusión intravenosa (IV), en una vena a través de un catéter o por vía oral. El tipo, el estadio y la ubicación del cáncer determinarán el/los medicamento(s) específico(s), la concentración y la frecuencia de la quimioterapia. Puede combinarse con cirugía o radiación. La quimioterapia puede aplicarse antes de la cirugía (a veces junto con radioterapia) para tratar de reducir el tamaño de un tumor (terapia neoadyuvante), después de la cirugía (a veces junto con radioterapia) para tratar de destruir las células cancerosas que hayan quedado (terapia adyuvante) o como tratamiento principal (a veces junto con radioterapia) para cánceres más avanzados o para algunas personas que no están lo suficientemente sanas para la cirugía. Habitualmente, se administra en ciclos, con un periodo de tratamiento (generalmente de 1 a 3 días) seguido de un periodo de descanso para darle tiempo al cuerpo para que se recupere. Sin embargo, algunos agentes quimioterápicos se administran todos los días. Los ciclos duran generalmente de 3 a 4 semanas. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen cisplatino, carboplatino, paclitaxel (Taxol®), paclitaxel unido a albúmina (nab-paclitaxel, Abraxane®), docetaxel (Taxotere®), gemcitabina (Gemzar®), vinorelbina (Navelbine®), irinotecán (Camptosar®), etopósido (VP-16®), vinblastina o pemetrexed (Alimta®). Más a menudo, el tratamiento para NSCLC usa una combinación de 2 agentes quimioterapéuticos. Los estudios han demostrado que la adición de un tercer fármaco no suma mucho beneficio y es probable que provoque más efectos secundarios. La quimioterapia con un solo fármaco se usa a veces para personas que podrían no tolerar bien la quimioterapia combinada, tal como aquellas con mala salud general o personas mayores. Si se usa una combinación, a menudo incluye cisplatino o carboplatino más otro fármaco. A veces pueden usarse combinaciones que no incluyen estos fármacos, tales como gemcitabina con vinorelbina o paclitaxel. A los individuos con cánceres de pulmón avanzados que cumplen con determinados criterios también se les puede añadir al tratamiento un fármaco de terapia dirigida como bevacizumab (Avastin®) o cetuximab (Erbix®).

La radioterapia se administra a menudo junto con quimioterapia, y puede usarse con intención curativa en personas con NSCLC que no son elegibles para la cirugía. Esta forma de radioterapia de alta intensidad se denomina radioterapia radical. Un refinamiento de esta técnica es la radioterapia acelerada hiperfraccionada continua (CHART), en la que se administra una alta dosis de radioterapia en un corto periodo de tiempo. La radioterapia torácica posoperatoria no debe usarse generalmente después de una cirugía con intenciones curativas para NSCLC. Si el crecimiento del cáncer bloquea una sección corta del bronquio, puede administrarse braquiterapia (radioterapia localizada) directamente dentro de las vías respiratorias para abrir el paso. En comparación con la radioterapia de haz externo, la braquiterapia permite una reducción en el tiempo de tratamiento y una menor exposición a la radiación para el personal sanitario. Sin embargo, los indicios para la braquiterapia son menores que para la radioterapia de haz externo.

Con el fin de detectar la recidiva se obtiene una muestra del individuo. La muestra puede ser cualquier muestra adecuada para medir marcador(es) según la presente invención y se refiere a una muestra biológica obtenida con el fin de evaluación *in vitro*. Comprende material que puede relacionarse específicamente con el individuo y del cual puede determinarse, calcularse o inferirse información específica sobre el individuo. Una muestra puede componerse en parte o en su totalidad de material biológico del paciente (por ejemplo, una muestra de tejido sólido obtenida de una biopsia de pulmón). Una muestra también puede ser material que se haya puesto en contacto con el paciente de una manera que permita realizar pruebas en la muestra que proporcione información sobre el individuo (por ejemplo, líquido de broncolavado). La muestra puede comprender preferiblemente cualquier líquido corporal. Las muestras de prueba a modo de ejemplo incluyen sangre, suero, plasma, orina, saliva y líquido de los pulmones (tal como líquido de revestimiento epitelial), por ejemplo, obtenido mediante broncoscopia o broncolavado. La muestra puede extraerse del individuo y usarse inmediatamente o procesarse antes de la etapa de medición a). El procesamiento puede incluir purificación (por ejemplo, separación tal como centrifugación), concentración, dilución, lisis de componentes celulares, congelación, acidificación, conservación, etc. Las muestras preferidas son sangre completa, suero, plasma o líquido de revestimiento epitelial de los pulmones, representando plasma, suero o sangre completa el tipo de muestra más conveniente.

Normalmente, las muestras relacionadas con la sangre son muestras de prueba preferidas para su uso en el contexto de la presente invención. Para esto, puede extraerse sangre de una vena, habitualmente del interior del codo o del dorso de la mano. Particularmente, en bebés o niños pequeños, puede usarse una herramienta afilada denominada lanceta para perforar la piel y hacerla sangrar. La sangre puede recogerse, por ejemplo, en una pipeta, o en un portaobjetos o tira reactiva. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, la muestra obtenida del individuo es una muestra de sangre, particularmente seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa.

En la muestra, se mide la cantidad o concentración de las moléculas marcadoras. En la técnica se conocen una

variedad de métodos para medir una proteína marcadora (particularmente HE4 y Cyfra21-1) y puede usarse cualquiera de estos.

5 Preferiblemente, los marcadores se miden específicamente a partir de una muestra de líquido mediante el uso de un agente de unión específico.

10 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para el marcador o un anticuerpo para el marcador o un ácido nucleico complementario al ácido nucleico relacionado con la proteína marcadora (por ejemplo, un ácido nucleico complementario al ARNm de un marcador o una parte relevante del mismo). Preferiblemente, la(s) molécula(s) marcadora(s) se mide(n) al nivel de proteína.

15 La determinación de proteínas como parejas de unión de un polipéptido marcador puede realizarse usando cualquiera de varios métodos conocidos para identificar y obtener proteínas que interaccionan específicamente con proteínas o polipéptidos, por ejemplo, un sistema de cribado de dos híbridos de levadura tal como el descrito en la patente estadounidense n.º 5.283.173 y la patente estadounidense n.º 5.468.614, o el equivalente. Un agente de unión específico tiene preferiblemente al menos una afinidad de 10^7 l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específico tiene preferiblemente una afinidad de 10^8 l/mol o incluso más preferido de 10^9 l/mol para su molécula diana. Tal como apreciará el experto en la técnica, el término específico se usa para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para el 20 marcador. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana da como resultado una afinidad de unión que es de sólo el 10% o menos, más preferiblemente de sólo el 5% o menos de la afinidad con la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferido cumplirá los criterios mínimos anteriores de afinidad así como de especificidad.

25 Un agente de unión específico es preferiblemente un anticuerpo reactivo con marcador, particularmente HE4 o Cyfra21-1. El término anticuerpo se refiere a un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, fragmentos de unión a antígeno de tales anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, así como constructos genéticos que comprenden el dominio de unión de un anticuerpo.

30 El término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de los mismos tales como fragmentos F(ab')₂ y Fab, así como cualquier pareja de unión que se produce de manera natural o producida de manera recombinante, que son moléculas que se unen específicamente a un polipéptido de HE4. Puede usarse cualquier fragmento de anticuerpo que conserve los criterios anteriores de un agente de unión específico. Los anticuerpos se generan mediante procedimientos de última generación, por ejemplo, tal como se describe en Tijssen (Tijssen, P., Practice and theory of enzyme immunoassays, Elsevier Science Publishers B.V., Ámsterdam (1990), todo el libro, especialmente las páginas 43-78). Además, el experto en la técnica es consciente de métodos basados en inmunoabsorbentes que pueden usarse para el aislamiento específico de anticuerpos. Mediante estos medios, puede potenciarse la calidad de anticuerpos policlonales y, por tanto, su rendimiento en inmunoensayos (Tijssen, P., anteriormente, páginas 108-115).

40 Para los logros tal como se da a conocer en la presente invención, pueden usarse anticuerpos policlonales generados en, por ejemplo, cabras. Sin embargo, también pueden usarse evidentemente anticuerpos policlonales de diferentes especies, por ejemplo, ratas, conejos o cobayas, así como anticuerpos monoclonales. Dado que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para rutina clínica.

50 Para la medición, la muestra obtenida de un individuo se incubaba con el agente de unión específico para el marcador en cuestión en condiciones apropiadas para la formación de un complejo marcador-agente de unión. Tales condiciones no necesitan especificarse, ya que el experto en la técnica puede identificar fácilmente, sin ningún esfuerzo inventivo, tales condiciones de incubación apropiadas. Se mide la cantidad de complejo marcador-agente de unión y se usa en los métodos y usos de la invención. Tal como apreciará el experto en la técnica, existen numerosos métodos para medir la cantidad del complejo marcador-agente de unión, todos descritos en detalle en libros de texto relevantes (véase, por ejemplo, Tijssen P., anteriormente, o Diamandis, E.P. y Christopoulos, T.K. (eds.), Immunoassay, Academic Press, Boston (1996)).

55 Particularmente, los anticuerpos monoclonales para los marcadores (HE4 y Cyfra21-1) se usan en inmunoensayos cuantitativos (se determina la cantidad o concentración de los marcadores).

60 Preferiblemente, el marcador se detecta en un formato de ensayo de tipo sándwich. En tal ensayo, un primer agente de unión específico se usa para capturar el marcador en cuestión en un lado y un segundo agente de unión específico (por ejemplo, un segundo anticuerpo), que está marcado para detectarse directa o indirectamente, se usa en el otro lado. El segundo agente de unión específico puede contener un resto o marcador de notificador detectable tal como una enzima, un tinte, radionúclido, grupo luminiscente, grupo fluorescente o biotina, o similares. Cualquier resto o marcador de notificador podría usarse con los métodos dados a conocer en el presente documento siempre que la señal de los mismos esté directamente relacionada o sea proporcional a la cantidad de agente de unión que permanece sobre el soporte después del lavado. La cantidad del segundo agente de unión que permanece unido al 65

soporte sólido se determina luego usando un método apropiado para el resto o marcador de notificador detectable específico. Para los grupos radiactivos, el recuento de centelleo o métodos autorradiográficos son generalmente apropiados. Pueden prepararse conjugados anticuerpo-enzima usando una variedad de técnicas de acoplamiento (para una revisión véase, por ejemplo, Scouten, W. H., *Methods in Enzymology* 135:30-65, 1987). Pueden usarse métodos espectroscópicos para detectar tintes (incluyendo, por ejemplo, productos colorimétricos de reacciones enzimáticas), grupos luminiscentes y grupos fluorescentes. Puede detectarse biotina usando avidina o estreptavidina, acoplada a un grupo notificador diferente (comúnmente un grupo radiactivo o fluorescente o una enzima). Generalmente, pueden detectarse grupos notificadores enzimáticos mediante la adición de sustrato (generalmente durante un periodo de tiempo específico), seguido de análisis espectroscópico, espectrofotométrico u otro análisis de los productos de reacción. Pueden usarse patrones y adiciones de patrón para determinar el nivel de antígeno en una muestra usando técnicas conocidas.

Tal como se describió anteriormente, existen una variedad de métodos para medir HE4. Los productos disponibles comercialmente para medir HE4 incluyen un inmunoensayo enzimático de HE4 (EIA) (Fujirebio Diagnostics Inc., Gotemburgo, Suecia) y el ensayo ARCHITECT HE4 (Abbott, Wiesbaden, Alemania). Preferiblemente, se mide HE4 usando "Cobas Elecsys® HE4" (n.º de material: 05950929 190, Roche Diagnostics, Ltd, Rotkreuz, Suiza) que es un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) para la determinación cuantitativa de HE4.

Para la medición de los niveles de Cyfra21-1, también existen una variedad de ensayos. Un ensayo para "CYFRA21-1" mide específicamente un fragmento soluble de citoqueratina 19 tal como está presente en la circulación. La medición de CYFRA21-1 se basa normalmente en dos anticuerpos monoclonales (Bodenmueller *et al.*, 1994, *Int. J. Biol. Markers* 9: 75-81). Los productos disponibles comercialmente para medir Cyfra21-1 incluyen Enzymum-Test CYFRA 21-1 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), kit de ensayo inmunoradiométrico de fragmentos de citoqueratina 19 (CYFRA 21-1) (Cisbo Assays, Codolet, Francia), kit ELISA para antígeno 21-1 de fragmentos de citoqueratina (Wuhan USCN Business Co., Ltd., China) y el ensayo ARCHITECT Cyfra21-1 (Abbott, Wiesbaden, Alemania). En el ensayo CYFRA21-1 de Roche Diagnostics, Alemania, se usan los dos anticuerpos monoclonales específicos (KS 19.1 y BM 19.21) y se mide un fragmento soluble de citoqueratina 19 que tiene un peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons. Preferiblemente, se mide CYFRA21-1 en un analizador Elecsys® usando el número de producto de Roche 11820966160 según las instrucciones del fabricante.

Según la presente invención, la cantidad o concentración de un marcador se determina con el fin de detectar la recidiva. La cantidad de una sustancia es una cantidad definida por patrones que mide el tamaño de un conjunto de entidades elementales, tales como átomos, moléculas, electrones y otras partículas. A veces se denomina cantidad química. El Sistema Internacional de Unidades (SI) define la cantidad de sustancia para que sea proporcional al número de entidades elementales presentes. La unidad del SI para la cantidad de sustancia es el mol. Tiene el símbolo unitario mol. La concentración de una sustancia es la cantidad de un constituyente dividida por el volumen total de una mezcla. Pueden distinguirse varios tipos de descripción matemática: concentración másica, concentración molar, concentración en número y concentración en volumen. El término concentración puede aplicarse a cualquier tipo de mezcla química, pero lo más frecuentemente se refiere a solutos y disolventes en disoluciones.

La concentración molar (cantidad) tiene variantes tales como concentración normal y concentración osmótica.

La etapa de medir el nivel de un marcador puede llevarse a cabo de la siguiente manera: la muestra y opcionalmente el calibrador y/o el control pueden ponerse en contacto con el agente de unión (que podría inmovilizarse, por ejemplo, en una fase sólida) en condiciones que permitan la unión del agente al marcador. Los agentes de unión no unidos pueden eliminarse mediante una etapa de separación (por ejemplo, una o más etapas de lavado). Puede añadirse un segundo agente (por ejemplo, un agente marcador) para detectar el agente de unión unido para permitir la unión y cuantificación del mismo. El segundo agente no unido puede retirarse. La cantidad del segundo agente de unión que es proporcional a la cantidad del marcador puede cuantificarse, por ejemplo, basándose en el marcador. La cuantificación puede realizarse basándose en, por ejemplo, una curva de calibración construida para cada ensayo representando gráficamente el valor medido frente a la concentración para cada calibrador. La concentración o cantidad de marcador en la muestra puede leerse luego a partir de la curva de calibración.

Después de que se determine la cantidad o concentración del marcador, se compara el valor obtenido con la cantidad o concentración del marcador respectivo tal como se establece en un control (por ejemplo, una muestra de control o cohorte de control o población de control o un grupo de control). La expresión "comparar la cantidad o concentración... con la cantidad o concentración tal como se establece en una muestra de control" se usa simplemente para ilustrar adicionalmente lo que es obvio de todas formas para el experto en la técnica. La muestra de control puede ser un control interno o externo. En una realización, se usa un control interno, es decir, se evalúa(n) el/los nivel(es) del marcador en la muestra de prueba así como en una o más de otra(s) muestra(s) tomada(s) del mismo sujeto para determinar si hay cualquier cambio en el/los nivel(es) de dicho(s) marcador(es). En otra realización, se usa un control externo. Para un control externo, se compara la presencia o cantidad de un marcador en una muestra derivada del individuo con su cantidad o concentración en un individuo o una población de individuos que se sabe que está libre de cualquier estado (por ejemplo, cáncer de pulmón o recidiva de cáncer de

- pulmón), es decir, "individuo normal". Habitualmente, el nivel de marcador de la muestra está correlacionado directa o indirectamente con un diagnóstico y el nivel de marcador se usa, por ejemplo, para determinar si un individuo tiene o está a punto de tener una recidiva. Está dentro de la destreza del médico elegir una muestra/población/cohorte/grupo de control apropiado y un valor de referencia o control para el marcador
- 5 establecido en el mismo. El experto en la técnica apreciará que tal control, en una realización, se obtiene de una población de referencia cuya edad coincide y está libre de enfermedades de confusión. Tal como también es evidente para el experto en la técnica, los valores de marcador absolutos establecidos en un control dependerán del ensayo usado. Preferiblemente, se usan muestras de 100 o más individuos bien caracterizados de la población de referencia apropiada para establecer un valor de control (referencia). También se prefiere que la población de
- 10 referencia pueda elegirse para que consista en al menos 20, 30, 50, 200, 500 ó 1000 individuos. Los individuos sanos representan una población de referencia preferida para establecer una referencia. Alternativamente, pueden usarse poblaciones de referencia en los métodos de la invención, por ejemplo, una población de individuos sanos y una población de individuos que se sabe que tienen una recidiva.
- 15 Según la presente invención, un valor aumentado para la cantidad o concentración del/de los marcador(es) con respecto al control es indicativo de la recidiva. Si el valor aumenta, la recidiva se ha producido o está a punto de producirse. El individuo identificado de este modo puede someterse a otros métodos de diagnóstico o terapéuticos, que incluyen análisis de sangre, métodos de obtención imágenes, quimioterapia o cirugía adicionales. El profesional cualificado podrá seleccionar los medios adecuados según la práctica médica del país prevaleciente.
- 20 En una realización, el valor aumenta si el valor asciende a al menos el 110%, más preferiblemente al menos el 120%, más preferiblemente al menos el 130%, más preferiblemente al menos el 140%, más preferiblemente al menos el 150%, más preferiblemente al menos el 160%, más preferiblemente al menos el 170%, más preferiblemente al menos el 180%, incluso más preferiblemente al menos el 190% con respecto al valor de referencia o control.
- 25 Alternativamente, los valores para HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 tal como se miden en un grupo de control o una población de control se usan, por ejemplo, para establecer un valor de punto de corte o un intervalo de referencia. Un valor por encima de tal valor de punto de corte o fuera del intervalo de referencia y su extremo superior se considera aumentado. En una realización, se establece un valor de punto de corte fijo. Tal valor de punto de corte se elige para que coincida con la cuestión diagnóstica de interés. En una realización, los valores para HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 tal como se miden en un grupo de control o una población de control se usan para establecer un intervalo de referencia. En una realización preferida, una concentración de HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 se considera aumentada si el valor medido está por encima del percentil 90% del intervalo de referencia.
- 30 En realizaciones preferidas adicionales, un valor para HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 se considera aumentado si el valor medido está por encima del percentil 95%, el percentil 96%, el percentil 97% o el percentil 97,5% del intervalo de referencia. En el presente caso, el valor de punto de corte representa un valor apropiado para distinguir a un individuo con recidiva de un individuo sin recidiva.
- 35 Puede elegirse un valor de punto de corte adecuado dependiendo de la sensibilidad y especificidad deseadas. La sensibilidad y la especificidad son medidas estadísticas del rendimiento de una prueba de clasificación binaria, también conocida en estadística como función de clasificación:
- 40 La sensibilidad (también denominada tasa positiva verdadera) mide la proporción de positivos que se identifican correctamente como tales (por ejemplo, el porcentaje de personas con recidiva que se identifican correctamente como que tienen el estado).
- 45 La especificidad (también denominada tasa negativa verdadera) mide la proporción de negativos que se identifican correctamente como tales (por ejemplo, el porcentaje de personas con recidiva que se identifican correctamente como que no tienen el estado).
- 50 Para cualquier prueba, hay habitualmente una compensación entre las medidas. Por ejemplo, en un entorno de seguridad aeroportuaria en el que uno está realizando pruebas para determinar posibles amenazas a la seguridad, los escáneres pueden configurarse para activar elementos de bajo riesgo como hebillas de cinturón y llaves (baja especificidad), con el fin de reducir el riesgo de objetos perdidos que representan una amenaza para el avión y los que están a bordo (alta sensibilidad). Esta compensación puede representarse gráficamente como una curva característica operativa del receptor (véase a continuación). Un factor pronóstico perfecto se describiría como el 100% sensible (por ejemplo, todos los enfermos se identifican como enfermos) y el 100% específico (por ejemplo, todos los sanos no se identifican como enfermos); sin embargo, en teoría, cualquier factor pronóstico tendrá un límite de error mínimo conocido como la tasa de error de Bayes. El punto de corte puede configurarse con el fin de
- 55 aumentar la sensibilidad o la especificidad.
- 60 En estadística, una característica operativa del receptor (ROC), o curva ROC, es una representación gráfica que ilustra el rendimiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. La curva se crea trazando la tasa positiva verdadera (TPR) frente a la tasa positiva falsa (FPR) en diversos ajustes de umbral. Tal como se detalló anteriormente, la tasa de verdaderos positivos también se conoce como sensibilidad o índice de
- 65

sensibilidad d' , conocido como “d prima” en detección de señales e informática biomédica, o recuperación en aprendizaje automático. La tasa de falsos positivos también se conoce como caída y puede calcularse como $(1 - \text{especificidad})$. La curva ROC compara la sensibilidad frente a la especificidad en un intervalo de valores para la capacidad de predecir un resultado dicotómico. El área bajo la curva (AUC presenta la precisión general para

5 comparar el rendimiento de la prueba (Florkowski CM, 2008, Clin Biochem Rev 29 (supl. 1): S83-S87)). La sensibilidad es la capacidad de una prueba para clasificar correctamente a un individuo como enfermo. La capacidad de una prueba para clasificar correctamente a un individuo como libre de enfermedad se denomina especificidad. La fórmula se muestra en el ejemplo 1 (Fawcett T, 2006, Pattern Recognition Letters 27: 861-874).

10 El análisis de ROC proporciona herramientas para seleccionar modelos posiblemente óptimos y descartar los subóptimos independientemente de (y antes de especificar) el contexto de coste o la distribución de clases. El análisis de ROC está relacionado de manera directa y natural con el análisis de coste/beneficio de la toma de decisiones de diagnóstico.

15 Como se usan dos marcadores, concretamente HE4 y Cyfra21-1, en los métodos de la invención, puede calcularse un valor combinado usando la cantidad/concentración de HE4 así como la cantidad/concentración de Cyfra21-1. El valor combinado se compara con el valor combinado de la muestra de control, que se ha obtenido usando el mismo procedimiento matemático. En una realización preferida, el valor combinado se obtiene mediante el cálculo ponderado de la cantidad o concentración de las moléculas marcadoras en las muestras. Esto significa que uno de

20 los marcadores recibe una mayor ponderación que el otro. El valor combinado C calculado basándose en el nivel (cantidad o concentración) de HE4 ([HE4]) y el nivel (cantidad o concentración) de Cyfra21.1 ([Cyfra21.1]) puede obtenerse, por ejemplo, mediante la siguiente ecuación:

$$\text{ecuación: } C = a * [\text{HE4}] + b * [\text{Cyfra21.1}],$$

25 en la que a y b representan los factores de ponderación. Preferiblemente, los factores de ponderación se han obtenido analizando una población de referencia.

30 Por ejemplo, puede realizarse un análisis de regresión logística con una recidiva y sin recidiva de resultado binario como variable dependiente y la combinación de Cyfra21-1 y HE4 como variables independientes. La precisión de la clasificación puede evaluarse mediante el área bajo la curva ROC (característica operativa del receptor) (AUC) y pueden calcularse la sensibilidad y la especificidad.

35 También se describe el uso de HE4 como proteína marcadora en la evaluación *in vitro* de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón, en el que la detección de una cantidad o concentración aumentada de HE4 en una muestra obtenida de un individuo en comparación con un control es indicativa de la recidiva.

40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere al uso de HE4 y CYFRA 21-1 como combinación de marcadores en la evaluación *in vitro* de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón, en el que detección de un valor combinado aumentado de la combinación de marcadores en una muestra obtenida de un individuo en comparación con el de un control es indicativo de la recidiva.

45 El uso según el segundo aspecto puede definirse adicionalmente tal como se especifica para el método del primer aspecto de la presente invención. Particularmente, con respecto a los términos usados en el segundo aspecto de la presente divulgación, se hace referencia a los términos, ejemplos y realizaciones específicas usados en el primer aspecto de la presente divulgación, que también pueden aplicarse al segundo aspecto de la presente divulgación.

50 Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De manera similar, las palabras “comprender”, “contener” y “abarcarse” han de interpretarse de manera inclusiva en lugar de exclusiva.

55 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos y cualquier acrónimo usados en el presente documento tienen los mismos significados que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica en el campo de la divulgación.

Figuras

60 La figura 1 ilustra la detección de recidiva en pacientes con adeno NSCLC (recidiva: 42; sin recidiva: 639). Muestra un resumen del análisis del área bajo la curva (AUC) de los datos de la curva ROC (característica operativa del receptor) obtenidos en los experimentos descritos en el presente documento en el ejemplo para Cyfra21-1, HE4 y la combinación de estos marcadores.

Ejemplos

65 Ejemplo 1: Establecimiento de valores de control y opcionalmente factores de ponderación en una población de referencia

El ejemplo 1 describe cómo pueden obtenerse los valores de control y opcionalmente factores de ponderación en una cohorte de referencia adecuada.

5 Una cohorte de referencia adecuada y a modo de ejemplo incluiría preferiblemente pacientes con NSCLC de adenocarcinoma en estadio temprano después de la resección pero también podría incluir sujetos sanos. Los sujetos sanos se tratarían como pacientes sin una recidiva.

10 De manera óptima, para una parte de los pacientes con NSCLC se observó una recidiva y los niveles de concentración de HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 se conocen en el momento de la detección de recidiva.

A) HE4 como marcador único: determinación de un valor de punto de corte

15 Los niveles del marcador HE4 se determinarían en muestras tomadas de la cohorte de referencia. El nivel de HE4 se determinaría para un grupo de pacientes que tienen una recidiva y, opcionalmente, para pacientes sin recidiva. Un valor de punto de corte adecuado, que luego puede usarse para la evaluación de un nuevo paciente, puede determinarse tal como conoce el médico experto. El punto de corte puede elegirse teniendo en cuenta la sensibilidad y la especificidad adecuadas de la prueba.

20 B) HE4 y Cyfra21-1 como combinación de marcadores: determinación de factores de ponderación

25 Los niveles de los marcadores HE4 y Cyfra21-1 se determinarían en muestras tomadas de la cohorte de referencia. Puede usarse un modelo de regresión logística para obtener los factores de ponderación. La variable dependiente sería el indicador binario de la presencia de una recidiva en el momento de la recogida de muestras. Las variables independientes serían los niveles de Cyfra21-1 y HE4 medidos en muestras tomadas en los puntos de tiempo correspondientes.

30 Los coeficientes de regresión pueden usarse entonces como factores de ponderación para calcular el valor combinado C para cada paciente en la cohorte de referencia.

35 Basándose en este valor combinado C, ahora puede establecerse un valor de referencia que luego puede usarse para la evaluación de un nuevo paciente. Dependiendo de la proporción deseada que un valor de referencia de este tipo debe tener, se establecería el valor de referencia en pacientes con una recidiva detectada o en pacientes sin una recidiva.

Si quisiera tenerse una alta certeza para detectar una recidiva en un paciente nuevo, se elegiría un valor de referencia de manera que los valores combinados C de la mayoría de los pacientes con una recidiva detectada estuvieran por encima de este valor de referencia (por ejemplo, el 90% de los pacientes).

40 Sin embargo, si quisiera tenerse una alta certeza de que un paciente nuevo para el cual el valor combinado está por encima del valor de referencia realmente tiene una recidiva y no es un falso positivo, se elegiría el valor de referencia de tal manera que la mayoría (por ejemplo, el 90%) de los pacientes sin recidiva tengan un valor combinado C más pequeño como valor de referencia.

45 Ejemplo 2: Análisis multivariante de biomarcadores en una cohorte de pacientes con NSCLC

El análisis tuvo como objetivo identificar a los pacientes con recidiva basándose en los niveles de biomarcadores séricos de Cyfra21-1 y HE4.

50 La población de análisis incluyó 130 pacientes con NSCLC de adenocarcinoma en estadio temprano, todos los cuales se sometieron a resección del tumor. Los pacientes se examinaron periódicamente y en cada visita se registró si se produjo una recidiva y se tomaron muestras de sangre y se midieron las concentraciones de Cyfra y HE4. En total se registraron 681 visitas. En 42 de estas 681 visitas se detectó una recidiva.

55 Se estableció un análisis de regresión logística con recidiva y sin recidiva de resultado binario en cada visita como variable dependiente y la combinación de los niveles de Cyfra21-1 y HE4 en las visitas correspondientes como variables independientes tal como se describió en el ejemplo 1.

60 Basándose en los coeficientes derivados del modelo de regresión logística, se calculó un valor combinado C para cada paciente. La fórmula de C en este ejemplo fue:

$$C = -10,472 + \ln(\text{Cyfra21-1}) * 1,424 + \ln(\text{HE4}) * 1,525$$

en la que ln() es el logaritmo neperiano.

65 Posteriormente, se evaluó qué tan bien este valor combinado C puede discriminar entre visitas con o sin una

recidiva. La precisión de la clasificación se evaluó mediante el área bajo la curva ROC (característica operativa del receptor) (AUC), así como se informó la sensibilidad y la especificidad.

5 La curva ROC (característica operativa del receptor) es un método gráfico que ilustra el rendimiento de un sistema clasificador binario a medida que varía su umbral de discriminación. Compara la sensibilidad frente a la especificidad a lo largo de un intervalo de valores para la capacidad de predecir un resultado dicotómico. AUC presenta la precisión general para comparar el rendimiento de la prueba (Christopher M F 2008 Clin Biochem Rev). La sensibilidad es la capacidad de una prueba para clasificar correctamente a un individuo como enfermo. La capacidad de una prueba para clasificar correctamente a un individuo como libre de enfermedad se denomina especificidad. La fórmula se muestra a continuación (Fawcett Tom 2006 Pattern Recognition Letters).

	Enfermedad presente	Enfermedad ausente	Total
Prueba positiva	Verdadero positivo (TP)	Falso positivo (FP)	TP+FP
Prueba negativa	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (TN)	FN+TN
Total	TP+FN	TN+FP	
Sensibilidad = TP/(TP+FN) Especificidad = TN/(TN+FP)			

Cyfra21-1:

15 AUC: 77,9%

Sensibilidad (al 90,0% de espec.): 45,2%

20 Especificidad (al 88,1% de sens.): 33,3%

HE4:

AUC: 79,6%

25 Sensibilidad (al 90,0% de espec.): 52,4%, punto de corte: 113,1 pmol/ml

Especificidad (al 88,1% de sens.): 28,3%, punto de corte: 58,8 pmol/ml

Cyfra + HE4:

30 AUC: 83,6%

Sensibilidad (al 90,1% de espec.): 57,1%, valor de punto de corte en escala de C: -2,279

35 Especificidad (al 88,1% de sens.): 64,2%, valor de punto de corte en escala de C: - 3,203

Ejemplo 3: Monitorización de un nuevo paciente

40 Si quisiera usarse HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 para monitorizar a un nuevo paciente después de la resección, se recogerían muestras de sangre periódicamente en puntos de tiempo adecuados y se mediría la concentración de HE4 y opcionalmente Cyfra21-1 en cada muestra. Para cada muestra/visita, se calcularía el valor combinado C con el uso de los factores de ponderación que podrían establecerse tal como se describió en el ejemplo 1 o podrían usarse estos del ejemplo 2. Si este valor combinado C en una muestra de sangre recién tomada es más alto que el valor de referencia, entonces se supondría que este paciente tiene una recidiva. El valor de referencia podría

45 establecerse tal como se describió en el ejemplo 1 o tomarse del ejemplo 2.

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón en un individuo, comprendiendo el método
- 5 a) medir en una muestra obtenida del individuo la cantidad o concentración de las moléculas marcadoras HE4 y CYFRA 21-1, y
- 10 b) detectar recidiva comparando el valor combinado para los marcadores determinados en la etapa (a) con el valor combinado tal como se establece en un control, en el que un valor combinado aumentado en relación con el control es indicativo de la recidiva.
2. Método según la reivindicación 1, en el que el valor combinado se obtiene mediante el cálculo ponderado de la cantidad o concentración de las moléculas marcadoras en las muestras.
- 15 3. Método según la reivindicación 2, en el que los factores de ponderación se han obtenido analizando una población de referencia.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra es una muestra de sangre, particularmente seleccionada del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa.
- 20 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la(s) molécula(s) marcadora(s) se mide(n) al nivel de proteína.
- 25 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el individuo es un ser humano.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el individuo se considera tratado con éxito con respecto al adenocarcinoma de pulmón, particularmente mediante resección y/o quimioterapia.
- 30 8. Uso de HE4 y CYFRA 21-1 como combinación de marcadores en la evaluación *in vitro* de una recidiva de un adenocarcinoma de pulmón, en el que la detección de un valor combinado aumentado de la combinación de marcadores en una muestra obtenida de un individuo en comparación con el de un control es indicativo de la recidiva.
- 35 9. Uso según la reivindicación 8, en el que el uso se define adicionalmente según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

Fig. 1

