



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 200**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98905576 .9**

86 Fecha de presentación : **12.02.1998**

87 Número de publicación de la solicitud: **0961780**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.1999**

54 Título: **Marcadores proteicos para cáncer de pulmón y uso de los mismos.**

30 Prioridad: **12.02.1997 US 38819 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **Electrophoretics Limited**
Coveham House Downside Bridge Road
Cobham, Surrey KT11 3EP, GB
The Regents of the University of Michigan

72 Inventor/es: **Hanash, Samir, M.**

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

Marcadores proteicos para cáncer de pulmón y uso de los mismos.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar el cáncer de pulmón.

10 Se han identificado un gran número de polipéptidos que se expresan de manera diferente entre los tres tipos de tumores de pulmón principales. Un pequeño número de estos polipéptidos coinciden con marcadores identificados previamente tal como marcadores para tumores de esófago. Sin embargo, la mayoría (unos treinta polipéptidos) son nuevos para el presente análisis.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

El cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en hombres de más de 35 años de edad y es una causa destacada de muerte en mujeres en este grupo de edad. Hay varios subtipos de cáncer de pulmón. El carcinoma de células escamosas, el adenocarcinoma y el carcinoma de células pequeñas representan los subtipos principales. En vista de la alta incidencia y mortalidad global del cáncer de pulmón, los enfoques para investigar y detectar este tipo de cáncer en un estadio temprano serían bastante beneficiosos. Sin embargo, los beneficios de las estrategias de detección disponibles actualmente son dudosos y se mantiene una gran necesidad de estrategias más eficaz. Para ese efecto, la identificación de marcadores bioquímicos con un alto grado de especificidad para tumores y subtipos específicos de tumores sería beneficiosa.

En la actualidad, el cáncer de pulmón se diagnostica principalmente mediante biopsia. Desafortunadamente, en el momento en el que se diagnostica el cáncer está a menudo muy avanzado. La supervivencia tras el diagnóstico es baja.

30 Por tanto, existe una necesidad para el diagnóstico del cáncer de pulmón en un estadio temprano. Los marcadores que se corresponden con el avance de la enfermedad pueden usarse para controlar los regímenes terapéuticos.

T. Hirano *et al*, British J. Cancer, vol. 72, 1995, páginas 840-848, se refiere a la detección de polipéptidos asociados con la diferenciación histopatológica del carcinoma de pulmón primario.

35 B. Franzen *et al*, Electrophoresis, vol. 12, 1991, páginas 509-515, se refiere a una electroforesis en gel de poliácridamida bidimensional del cáncer de pulmón humano.

40 El documento EP-A-0 585 201 se refiere a la medida de MRP8, MRP14 y el heterodímero de MRP 8/14 en el suero de pacientes con enfermedad inflamatoria.

Sumario de la invención

45 La presente invención proporciona un método para diagnosticar el cáncer de pulmón en un animal o ser humano, que comprende detectar al menos una de las proteínas MRP8 y MRP14 que se sobreexpresan en tumores de pulmón, en una muestra de suero o una sección de tejido del animal o ser humano, pero excluyendo un método de diagnóstico practicado sobre el cuerpo del ser humano o animal.

50 La estrategia de la presente invención implica analizar varios cientos de proteínas celulares expresadas en diferentes subtipos de cáncer de pulmón para identificar proteínas que son específica(s) de subtipo(s). Usando el procedimiento de electroforesis en gel bidimensional, se ha detectado un subconjunto de proteínas que parecen distinguir entre los subtipos principales de una manera estadísticamente significativa. Estas proteínas tienen utilidades en muchas áreas, incluyendo las siguientes:

- 55 1. Detectar individuos normales o individuos con un riesgo aumentado de padecer cáncer de pulmón.
2. Establecer el subtipo de cáncer de pulmón específico en el momento del diagnóstico.
3. Proporcionar una indicación del pronóstico para individuos diagnosticados con un subtipo de cáncer de pulmón específico.
- 60 4. Proporcionar enfoques novedosos para el tratamiento, basados en el entendimiento del papel de estas proteínas en diferentes subtipos de cáncer de pulmón.

65 Mediante la comparación de geles 2-D que muestran proteínas de pulmón normal y diferentes tipos de tumores de pulmón tales como escamoso, de células pequeñas, y adenocarcinoma, se han identificado un conjunto de proteínas en los diferentes tejidos fuente. Estas proteínas proporcionan información sobre la patogenia de tumores de pulmón, y tienen utilidad como marcadores para controlar regímenes terapéuticos. Las proteínas también pueden purificarse

y usarse como inmunógenos para generar anticuerpos que pueden usarse como reactivos de diagnóstico. Además, algunas de las proteínas o anticuerpos frente a ellas pueden tener aplicaciones terapéuticas.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un gel de isoelectroenfoque (IEF) de una muestra de un paciente con cáncer de pulmón de células escamosas.

La figura 2 muestra un gel de IEF de una muestra de un paciente con cáncer de pulmón de células pequeñas clásico.

La figura 3 muestra un gel de IEF de una muestra de un paciente con adenocarcinoma del pulmón.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la invención es un nuevo método de diagnóstico para tumores de pulmón. El método de diagnóstico se basa en la detección de al menos una proteína que se sobreexpresa en tumores de pulmón en relación con tejidos de pulmón no tumorales y que es específica para un subtipo de tumor de pulmón. Con el fin de identificar la(s) proteína(s) que se han de usar en el diagnóstico del tumor de pulmón, se analizaron las proteínas expresadas en 60 tumores de pulmón usando electroforesis en gel 2-D. Comparando los perfiles de electroforesis en gel de las proteínas de tumores de pulmón y tejidos de pulmón no tumorales, se localizaron las proteínas que se sobreexpresan en tumores de pulmón. Tal como se demuestra a continuación, algunas de las proteínas específicas sobreexpresadas también se correlacionan con el subtipo de tumor de pulmón. Por lo tanto, concentrando una pluralidad de marcadores proteicos que se sobreexpresan en diferentes subtipos de tumor de pulmón específicos, puede realizarse un diagnóstico del subtipo de tumor de pulmón. Por ejemplo, dependiendo de al menos tres marcadores proteicos específicos cada uno para uno de los tres subtipos de tumores de pulmón principales, es decir, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma o carcinoma de células pequeñas, puede realizarse un diagnóstico del subtipo de tumor de pulmón principal. Debe recalarse que los marcadores proteicos pueden determinarse usando electroforesis en gel en ausencia de anticuerpos, un inmunoensayo si están disponibles anticuerpos específicos para los marcadores proteicos o cualquier otro método de detección de marcadores proteicos. Los anticuerpos específicos para los marcadores proteicos permiten aplicaciones *in vitro* o *in vivo* del método de diagnóstico.

Otro aspecto de la invención es un método para controlar el progreso del tratamiento de tumores de pulmón controlando la aparición de al menos un marcador proteico específico para el subtipo de tumor de pulmón que se está tratando. Algunos de los marcadores proteicos identificados en la presente invención pueden controlarse durante el curso del tratamiento de un tumor de pulmón con un énfasis sobre los marcadores proteicos específicos para el subtipo de tumor de pulmón bajo tratamiento. A medida que el tratamiento progresa, puede seguirse la presencia de al menos uno de estos marcadores proteicos específicos como otra forma para juzgar la eficacia del tratamiento.

Geles 2-D basados en anfolito portador (CA) de cáncer de pulmón

Se obtuvieron tejidos de más de 60 tumores de pulmón para el análisis 2-D.

La mayoría de los tumores tienen un par de geles teñidos con plata duplicados disponibles, en los que la primera dimensión del gel era un gel de isoelectroenfoque. Además, la mayoría de los tumores se analizaron usando gradientes de pH inmovilizados. Los tipos de tumores comunes están bien representados: tumores de pulmón de células pequeñas clásico (SC), adenocarcinoma (Ad) y escamoso (Sq). Los tumores de pulmón menos comunes estaban representados por menos muestras.

El análisis de los tres tipos de tumor de pulmón principales empleó el análisis visual de 3 lotes grandes de geles que contenían los números más grandes de los tipos de tumores de interés (más de 10 de cada uno de los tres tipos). Se estudiaron también las imágenes en el ordenador, una sección en primer plano pequeña cada vez, apareando aquellos puntos entre imágenes que parecen seguir siendo las más prometedoras en un subconjunto de las mejores imágenes. Para el análisis computerizado, se aparearon los puntos con la imagen Ab6148, una muestra de SC, de la cual deriva el sistema de numeración de puntos de "pulmón" usado aquí. Esta imagen maestra también se apareó con la imagen maestra usada en los estudios tumorales que incluyen tumores de esófago, colon, páncreas, leucemia, cerebro y mama, de modo que cada punto de interés en el pulmón también tiene un número de punto en los otros sistemas. En el momento en que se identificaron los puntos de interés, se hicieron comentarios sobre cada punto, en gran parte acerca de qué muestras tenían los puntos más grandes o más pequeños.

Parece que ciertos conjuntos de puntos interesantes deben tratarse como grupos, es decir, probablemente son el producto de un único gen, difiriendo sólo en su modificación post-traducciona. Esta interpretación se basa en la proximidad de los puntos sobre el gel, la geometría de la constelación que forman (por ejemplo, una "cadena de carga"), su color idéntico con la tinción de plata, y el hecho de que las cantidades en las diferentes muestras están correlacionadas. En tales casos, sólo se ha seleccionado un único punto para la cuantificación, normalmente el más grande del grupo o el punto que muestra el menor solapamiento con otros puntos que se piensa que no están relacionados. Los grupos y los representativos elegidos para la cuantificación son:

ES 2 284 200 T3

Grupo Punto cuantificado

37-40	40
28-30	29
52-54	53
33-35	33
87-89	87,88 los puntos de la proteína P18.

Las figuras 1-3 muestran la localización de los puntos candidatos. Estos se marcan con números de punto específicos para el apareamiento del tumor de pulmón.

Se prepararon para todas las muestras geles 2-D basados en anfolito portador que cubrían el intervalo de pH de aproximadamente 3,5-10,0.

El tejido se solubilizó mediante la adición de tampón de lisis que consistía en (por litro) urea 8 M, 20 ml de tensioactivo Nonidet P-40, 20 ml de anfolitos (pH 3,5-10), 20 ml de 2-mercaptoetanol, y 0,2 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo en agua desionizada destilada. Se cargaron alícuotas de aproximadamente 30 µl que contenían 70 µg de proteína en los geles individuales.

Debido a que el isoelectroenfoque es sensible a la modificación de la carga, es importante minimizar las alteraciones de las proteínas (por ejemplo, proteólisis, desamidación de glutamina y asparagina, oxidación de cistina a ácido cístico, carbamilación) que pueden resultar de la preparación inapropiada de la muestra. Una vez solubilizadas, las muestras pueden almacenarse congeladas a -80°C durante periodos cortos (< 1 mes) sin modificación significativa de las proteínas.

Se realizó la PAGE 2-D tal como se describió previamente (Strahler *et al*, *Journal of Clinical Investigation*, 85:200-207, 1990). En la mayoría de los casos, se aplicaron las alícuotas inmediatamente sobre los geles de isoelectroenfoque. Los geles de la primera dimensión contenían 50 ml de anfolitos por litro (pH 3,5-10). El isoelectroenfoque se realizó a 1.200 V durante 16 h y 1.500 V durante las últimas 2 h. Se procesaron 20 geles simultáneamente. Para la separación en la segunda dimensión, se usó un gradiente de acrilamida de 11,4-14,0 g/dl. Se visualizaron los puntos de proteína en los geles mediante la técnica de tinción con plata de Merrill *et al*. (Merrill *et al*, *Science*, 211:1437-1438, 1981).

Geles 2-D con gradiente de pH inmovilizado (IPG) de cáncer de pulmón

Además de generar patrones 2-D que se basaban en anfolito portador, se generó un segundo conjunto de patrones usando gradientes de pH inmovilizados para muchos de los tumores.

Se prepararon las muestras como para los geles 2-D basados en CA de cáncer de pulmón discutidos anteriormente. Para la separación en la primera dimensión se usó un gradiente de pH inmovilizado que cubría el intervalo de separación de pH 4-10. La segunda dimensión es la misma que para los geles 2-D basados en CA.

Los geles IPG se preparan usando derivados de acrilamida que tienen grupos carboxilo o amino terciarios con valores de pK específicos. Se prepara un gradiente de pH lineal a partir de una solución ácida, densa y una solución básica, ligera usando un formador de microgradiente de dos cámaras. El gradiente de pH se estabiliza durante la polimerización de la matriz de inmovilina-acrilamida-bisacrilamida mediante un gradiente colineal de glicerol. Se han publicado formulaciones de mezclas de inmovilina tamponantes con inmovilina de titulación para las soluciones de límite de pH para gradientes de pH estrechos (1 unidad de pH) o para gradientes de pH amplios (> 1 unidad de pH, hasta 6 unidades de pH) (Gianazza *et al*, *Electrophoresis* 6:113 (1985) y solicitud LKB observación 324 (1984)).

La segunda dimensión separa las proteínas basándose en el peso molecular en un gel con SDS. Un gradiente de acrilamida del 11,5 al 14% T (2,6% de entrecruzamiento) proporciona una separación eficaz de proteínas de masa desde 15.000 hasta 100.000. Las proteínas fuera de este intervalo se resuelven peor. Las proteínas con peso molecular menor de 10.000 Da se mueven en la electroforesis cercanas al frente del colorante y no se resuelven.

Análisis asistido por ordenador de geles 2-D

Se escaneó cada gel en un formato de 1024 x 1024 píxeles, en el que cada pixel puede tener uno de 256 valores posibles que representan diferentes grados de intensidad. Las listas de puntos para imágenes de estudio se aparean con listas de puntos de imágenes maestras de manera que el resultado es una jerarquía de puntos de proteína apareados. El propósito del apareamiento es unir el mismo punto del polipéptido en toda la jerarquía para permitir la valoración de su presencia, variación cuantitativa y especificidad, tal como se describe en Strahler *et al*., 1990. Para la comparación de la cantidad de proteínas individuales entre los geles, se utiliza un proceso de ajuste. La intensidad integrada de polipéptidos detectados, medida en unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado, se ajusta en relación con la intensidad de polipéptidos de referencia que se expresan de manera ubicua. El ajuste se realiza para compensar cualquier variación entre geles debida a la carga o tinción de las proteínas.

ES 2 284 200 T3

Se cuantificaron la mayoría de los puntos de interés y se muestran en las tablas 1-5. Unos pocos puntos que aparecen en las figuras 1-3 como interesantes no aparecen en las tablas. Los factores para no introducir los puntos son:

- Son parte de una familia más grande de puntos tal como se explicó anteriormente.

- El interés en ellos disminuye después de que los resultados de la cuantificación se analizaran (por ejemplo, pulmón 32, 44, 46, 99).

- Se han estudiado previamente. Esto incluye los números de puntos de pulmón 23-26 (np65), 56 (B23), 87-89 (P18), 97 (CRBP-I), 60 (PCNA), 78 (Hsp27), así como NDPK-A. Se cuantificaron unos pocos de estos puntos famosos para ayudar a caracterizar cada muestra de tumor (P18, P18a, CRBP-I, Hsp27, Hsp27a).

Valoración de los puntos en otros tejidos

Se ha estudiado una diversidad de tejidos normales y tumores en un esfuerzo para lograr algo de percepción en los puntos encontrados como interesantes en tumores de pulmón. Los puntos incluidos en la lista a continuación representan ese subconjunto de puntos que se cuantificó y se consideran muy interesantes. Algunos puntos cuantificados se consideran menos interesantes en este momento porque las diferencias entre los tumores no eran estadísticamente muy significativas, las diferencias medias entre los tipos de tumor no eran muy grandes, o porque los puntos no aparecían mucho más grandes en tumores que en muestras de pulmón de control.

Algunos puntos se incluyen todavía incluso aunque no dieron valores P muy pequeños. Normalmente, esto es porque se cree que hay potencialmente una diferencia interesante, pero las pruebas estadísticas bastante sencillas están ignorando los efectos de grupo (lote del gel) o están afectadas por unos pocos casos en los que las muestras no están de acuerdo todas perfectamente (medidas de varianza exageradas). Se estaba también a favor del punto si se había identificado como interesante en estudios previos, incluyendo estudios de tumores de esófago.

Geles

Cerebro: meduloblastoma, glioblastoma y muestras normales

Tumores de mama.

Leucemias: AML=ANLL, CALL y PBL normales.

Tumores de pulmón: Escamoso (Squ), de células pequeñas (SC), adenocarcinomas (Adn) y muestras de pulmón normal (NM).

Neuroblastomas: diversos estadios y números de copia de myc.

Esófago: Carcinomas escamosos del esófago (SC), esófago normal (NE), mucosa gástrica (GM), de Barret (BA), adenocarcinoma esofágico (EA) y tumor del cardias (TC).

Entradas

L = Grande, tan grande o más grande que en el adenocarcinoma esofágico o tumor del cardias.

M = Medio, pero no tan grande como en tumores de interés.

S = Pequeño.

A = Ausente.

S? o A? indica la incapacidad de identificar el punto en algún tejido, sencillamente porque no hay nada como lo que se vio en los tumores en el área. A la inversa, L? significa que hay un punto grande en la ubicación, pero no es seguro si es el punto de la muestra. A* indica que hay una observación a continuación.

Los primeros números de puntos son aquéllos usados en el apareamiento de tumores de pulmón (Ab6148). Los segundos números de puntos son de la imagen maestra del esófago (Bb9779). Un “@” por esófago indica que el punto se indicó como interesante en ese tejido esofágico. Algunas veces hay observaciones para estos puntos en muestras de esófago en otros informes. Una observación general es que lo más fácil es comparar SC de pulmón con neuroblastomas.

Se pensó inicialmente que el primer bloque de puntos era más grande en SQ o Ad de pulmón (normalmente Ad) mientras que se pensó que el segundo bloque de puntos era más grande en muestras de SC de pulmón. Los resultados cuantitativos deben usarse para juzgar el estado exacto con respecto al tamaño de los puntos en los diferentes tipos de

muestra, ya que algunas veces un punto es más grande en dos de los tipos, o tiene un patrón que es el más grande en un tipo, el más pequeño en otro, e intermedio en el tercer tipo de tumor.

Cuantificación de puntos para tumores de pulmón

Se cuantificaron los puntos en imágenes digitales de tumores escamosos de pulmón (Sq), tumores de adenocarcinoma (Ad), y cánceres de pulmón de células pequeñas (SC) a partir de 3 series de geles de IEF. Había 9 muestras de Sq, 8 de Ad y 9 de SC en total. Las fuentes de las muestras eran tumores primarios (PT) o metastásicos (MT). Se marcan los grupos de geles formados por series electroforéticas, A, B y C en la primera columna de la tabla. El “estadio” del tumor se marca como “stg”.

Los geles con imágenes apareadas con un patrón de pulmón maestro eran en gran parte los del grupo marcado como “A”. Se omitieron algunos puntos porque eran difíciles de cuantificar, porque parecían ser un miembro de una familia de puntos de la cual sólo aparece uno en la tabla a continuación, o porque son ya conocidos. Se cuantificaron también diez puntos de referencia que parecían ser más o menos invariables entre los tipos de muestra, para usar en el ajuste de los datos de intensidad integrada de los puntos. Los puntos se marcan en el orden de la otra tabla en la que se inspeccionaron otros tipos de tejido. Se incluyen también cuatro “puntos famosos” (L2 = Hsp27 fosforilado, L4 = Hsp27 no fosforilado, P18 y P18a = P18 fosforilado) para ayudar en la caracterización de las muestras.

El ajuste gel a gel usando los diez puntos de referencia fue mediante lo que se ha convertido en el método normal. Se formó un patrón calculando el tamaño medio de cada punto a través de los geles en este estudio. Para calcular el ajuste para un gel particular, se calcularon las razones de cada punto en el gel con respecto al patrón y se hicieron los promedios de las razones (tomando antilogaritmos de la razón log promedio). Las intensidades integradas de los puntos en bruto se dividen mediante este factor de ajuste para obtener las intensidades integradas ajustadas tabuladas a continuación. Para cada gel, se tabula el factor de ajuste bajo “oscuro”.

Para cada punto, se dan las medias y las varianzas con cada tipo de muestra así como el valor p para una prueba F de si las 3 medias son idénticas. Parece haber efectos en serie y efectos individuales para algunos puntos, que deben juzgarse probablemente visualmente, y este efecto en serie es por lo que los datos están tabulados en bloques según los grupos formados por las series electroforéticas. A menudo se puede ver que la significación para las pruebas que consideran los efectos de grupo sería mayor, o la que omite un individuo único con un valor enorme reduce las varianzas lo suficiente para cambiar el valor p considerablemente.

Producción de anticuerpos

Las proteínas eluidas de los geles, o fragmentos peptídicos de las mismas, pueden usarse como inmunógenos para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos policlonales o pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se producen mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos con afinidad y especificidad muy altas pueden usarse para pruebas inmunológicas para marcadores de cáncer.

Para la producción de anticuerpos policlonales, el inmunógeno, normalmente mezclado con un adyuvante, se inyecta en un animal huésped, tal como un ratón, cobaya, conejo, cabra o caballo. La inyección se repite en el mismo sitio o sitios diferentes a intervalos regulares o irregulares. El animal huésped se sangra periódicamente para valorar el título de anticuerpo hasta que se determina que se ha alcanzado el título óptimo. Los anticuerpos se obtienen o bien de antisero tomado del animal huésped con sangrado o bien mediante técnicas de hibridación de células somáticas conocidas en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante un método conocido en la técnica, por ejemplo Kohler y Milstein (*Nature*, vol. 256, pp. 495-497, 1975). Generalmente, se obtienen células del bazo de un animal huésped inyectado con el inmunógeno o un fragmento del mismo. Las células del bazo se immortalizan por fusión con una línea celular inmortal, preferiblemente una línea celular de mieloma, de la misma o diferente especie que el animal huésped inyectado. Las células fusionadas se clonan y los hibridomas resultantes se seleccionan para detectar la producción de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al inmunógeno.

En la presente solicitud, el término “un ensayo inmunológico” significa cualquier método conocido en la técnica de inmunología para la cuantificación de sustancias. Un ejemplo de un ensayo inmunológico es el radioinmunoanálisis.

Estudios de MRP8 y MRP14 y de su relevancia con la biología del tumor y como marcadores tumorales

En estudios que comparan patrones de geles 2-D de diversos tipos de tumores de pulmón (es decir, carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y carcinoma de células pequeñas), se identificó un punto de proteína en estos tipos de tumores que se descubrió que estaba ausente en el tejido de pulmón normal del paciente. Esta proteína dio la secuencia MLTELEKALN, que es homóloga en el 100% con la MRP-8 humana. Además, en los patrones de proteína 2-D para tumores de pulmón que tienen un punto de MRP-8 grande, se observó la presencia de un par de puntos de peso molecular bajo adicional consistente con las dos formas de MRP-14 (MRP14 tiene dos sitios de inicio de la traducción situados separados por 4 codones), tal como se determinó mediante la comparación con figuras publicadas. Entre las proteínas de punto sobreexpresadas en tumores de pulmón, las proteínas de punto preferidas son MRP8 y MRP14.

Relación de MRP8 y MRP14 con la biología del tumor

MRP8 (10 kDa) y MRP 14 (14 kDa) son ambas proteínas de unión a calcio que pertenecen a la familia S100 de proteínas de mano EF, una familia que consiste en al menos 17 miembros. De interés, se han localizado genes para esta familia de proteínas en el cromosoma 1q21, una región del cromosoma que frecuentemente está reordenada en diferentes tipos de tumor. Se propone que estas proteínas desempeñan un papel durante la diferenciación, la regulación del ciclo celular y las interacciones citoesqueleto/membrana. Ambas proteínas están compuestas de dos manos EF distintas flanqueadas por regiones hidrófobas en cualquier extremo y separadas por una región de bisagra central. Se ha demostrado que MRP8 media la actividad quimiotáctica en macrófagos. De manera interesante, se ha mostrado que un péptido codificado por la región de bisagra (entre las dos manos EF) media específicamente este efecto. Como tales, estas proteínas pueden desempeñar un papel en enfermedades que provocan inflamación crónica, incluyendo el cáncer.

Tanto la mano EF N-terminal como la carboxilo-terminal se pueden unir a calcio, aunque la mano EF carboxilo-terminal tiene una afinidad superior. Se ha mostrado que tanto MRP8 como MRP14 se secretan desde granulocitos y monocitos. No está claro actualmente cómo se secretan estas proteínas ya que no poseen un péptido señal clásico. Una posibilidad es que la unión a calcio puede exponer un dominio hidrófobo que podría permitir una interacción con la membrana, dando como resultado de ese modo la secreción de las moléculas. Se ha demostrado que tanto MRP8 como MRP14 homodimerizan y heterodimerizan entre sí, formando por tanto complejos de diversos pesos moleculares. No está claro actualmente la función precisa de cada forma de homodímero y heterodímero.

Un anticuerpo frente el antígeno de la fibrosis quística (un epítipo formado por heterodimerización de MRP8 y MRP14) también reaccionará positivamente frente a un antígeno de 14 kDa, que se ha mostrado que es MRP14. El anticuerpo está disponible comercialmente. Se ha utilizado este anticuerpo para inmunohistoquímica sobre secciones de tejido tumoral y tejido normal correspondiente del mismo paciente. Estas secciones de tejido teñidas revelaron una tinción mínima en el tejido de pulmón normal. Había algo más de reactividad en el tejido tumoral, lo más probablemente debida a la presencia aumentada de células infiltradoras. De importancia, sin embargo, había una cantidad muy grande de inmunoreactividad en el área del tejido normal inmediatamente adyacente al tumor, sugiriendo por tanto que se estaban reclutando células infiltradoras (es decir, granulocitos, monocitos y/o macrófagos) en el tumor. Además, se investigó si el anticuerpo reconocería una proteína de 14 kDa específica en el suero de pacientes de tumor de pulmón, a niveles mayores que los que pueden estar presentes en el suero de individuos normales. Se separó el suero de 14 pacientes con tumor de pulmón y 14 individuos normales mediante electroforesis 1-D, se transfirieron las proteínas a membranas de PVDF y se sometieron a prueba con el anticuerpo comercial. El análisis de intensidad integrado de la reactividad en una banda visualizada a 14 kDa reveló la reactividad marcadamente aumentada en el suero de pacientes con tumor (n = 14, intensidad media de 0,46) comparada con la del suero de individuos normales (n = 14; intensidad media de 0,09).

Estos hallazgos indican un papel de los anticuerpos frente MRP en la detección de diferentes tipos de cáncer en los que se detectan MRP en el tejido tumoral.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

sp#	sp# pulmón	sp# esóf.	Med	Cerebro	Ma	Leucemia			Squ	Pulmón		NBL	Muestras de esóf.					PM	PH
						AML	CLL	PBL		SC	Adn		SC	NE	BA	EA	GM	TC	
109		@	A	A	A	A	A	A	M	A	S	A	L	S	A	A	A	51	5,1
101		145 @	A	S	A	A	A	A	M	S	M	S	L	S	S	S	S	35	4,2
102		146 @	A	S	A	A	A	A	M	S	M	S	L	S	S	S	S	36	4,2
107		168	A?	A?	A?	A?	A?	A?	L	S	L	S?	S?	L	M	M	M	10	6,7
21		169	S	S	L	L	L	L	L	S	L	S	L	S	M	L	M	68	5,5
62		170	S	S	L	L	L	L	L	S	L	S	M	S	S	S	M	27	5,4
79		120 @	S	L	L?	L?	L?	L?	L	M	L	M	M	M	L	M	M	25	5,9
80		171?	L	M?	L?	L?	L?	L?	L	L	L	M	M	M	L	M	M	25	7,1
90		124 @	L?	L?	L?	L?	L?	L?	L	M	L	A?	M	L	M	M	A	19	5,6
95		172	L?	A?	A?	A?	A?	A?	L	S	L	A	S	L	S	S?	M	10	6,4
43		173	S	S	A?	A?	A?	A?	L	M	L	A?	A	A	A	M	A	75	6,5
29		165 @	S	L	S	S	S	M	L	M	L	M	L	M	M	M	A	49	4,6
40		111 @	L	L	L	L	L	A	L	M	L	M	L	M	L	L	M	50	6,2
42		112 @	L	L	L	L	L	A	L	M	L	M	S	S	L	L	M	53	6,3
53		174	S	L?	S	A	A	A	M	S	L	M?	S	S	M	M	S	38	5,1
83		167 @	L?	L	L?	A?	A?	A?	L	S	L	M?	S	S	L	M	M	26	4,5
92		175	S	A	S	A	A	A?	M	S	M	A	A	A	A	A	A	20	6,4
94		176?	A	A	A	A	A	A?	L	M	L	A	A	A	A	A	A	20	7,1
84		153 @	A	A	A	A	A	A?	L	M	L	A	A	A	A	A	A	19	4,1
100		177	A	A	A	A?	A?	A?	M	M	L	S?	L	S	M	L	S	16	4,1
96		154 @	M	S	M	M	S	M	L	M	L	S	L	A	M	M	M	11	5,2

TABLA 1 (Contin.)

sp#	sp#	esóf.	Med	Cerebro		Ma	Leucemia			Pulmón			NBL	Muestras de esóf.							PM	PH
pulmón				Gli	Nrm	ma	AML	CLL	PBL	Squ	SC	Adn	NM		SC	NE	BA	EA	GM	TC	kD	
14	178		L	?	?	S	A	L?	A	S	L	S	A	M	S	S	S	S	S	S	63	4,0
15	74		L	S?	S?	L	S	L	M?	S	L	S	S	L	S	S	S	S	S	S	43	3,9
16	157 @		M	L	S?	S	A	A	A	S	M	S	S	L	S	M	A	A	A	A	52	4,2
17	179		M?	S?	S?	S	?	?	?	S	L	S	S	L?	S	A?	S	S	A	S	57	4,8
22	180		M	M	S	S	A	A	S	M	L	M	S	M	S	S	S	M	A	S	67	4,7
27	181		M	S?	A?	A	S	S	S	S	L	S	A	S	S	A	S	S	A	S	61	5,7
31	182		M	A	A	M	?	?	?	S	L	S	A	A	S	A	S	S	A	S	50	4,8
33	183		A?	A?	A?	A	?	?	?	A	M	A	A	?	S	A	A	A	A	A	52	5,5
50	162 @		L	L	L	A	S	M	A	S	L	S	S	L	L	L!	M	M	M	S	45	5,8
68	15		L	L	M	S	L?	M	?	M	L	M	S	M	S	M	M	M	L	M	41	5,8
47	186		S	S	S	M	S?	S?	S?	M	L	M	A	L	S	S	S	M	S	M	37	4,5
57	187		M	L	M	S	M	M	S	M	L	M	S	M	S	S	S	M	S	M	31	4,2
58	188		L	L	L?	M	M	S	S	M	L	M	M	M	S	S	S	M	S	S	30	4,4
59	189		L	L	L?	M	?	?	?	M	L	M	M	M	M	M	M	L	M	M	29	4,5
61	190		M	M	?	S	?	?	?	S	L	S	A	A	A	S	A	A	A	S	29	5,3
66	193		S	S	S	S	?	?	?	S	L	S	A	S	S	S	S*	S	S	S*	25	4,5
67	194		L*	L	L?	S	A?	A?	A?	S	L	S	A	A	A	A	A	A	A	A	26	5,8
73	195		M	M	M	S?	?	?	?	S	M	S	S?	A	A	S?	S	S	S	S	32	6,3
74	196		M	M	M	S?	?	?	?	S	M	S	A	?	A	A	M	S	S	M	32	6,7
81	197		A	A	A	?	A?	A?	A?	S	L	S	?	?	?	A	A	A	A	S	26	6,9
105	198		A	A	A	M	M	M	S	M	L	M	?	?	?	A	A	M	A	M	20	4,1
86	199		S	S	S	M	A?	M	A?	S	L	M	S	S	S	S	S	S	S	S	15	4,9
97	200		M	A	A	A	A	M	A?	S	L	S	S	S*	S*	A	A	A	A	A	13	5,2
98	201		S	?	S	S	A	A	A	M	L	M	A	A	A	A	A	A	A	A	12	5,5
106	202		M	M	?	?	M?	M?	S?	M	L	M	A	A	A	A	S	S	A	A	10	5,8

66: Probablemente, es el mismo que en pulmón. Existe la posibilidad de que se esté confundiendo aquí un polimorfismo. Si es así, tiene el otro alelo a la derecha de 66 y cae casi en la misma posición que un punto común.

67: Muy grande en el cerebro, neuroblastoma, y SC.

97: Es CRBP-I. Los neuroblastomas lo tienen grande, pero no tan grande como SC

TABLA 2

grupo				paci		stg		di		puntos famosos				Pensados inicialmente como grandes en escamoso y/o adenocarcinoma									
gel	ente	ag	so	Oscuro	L2	L4	P18	P18a	s109	s101	s102	s107	s21	s62	s79	s80	s90	s95					
A 155	Duc	1 Sq	PT	0,571	1,57	1,02	2,18	0,39	0,65	0,59	0,71	3,07	0,17	0,13	1,12	2,02	1,68	6,29					
A 143	Mor	3 Sq	PT	0,485	0,57	0,46	0,48	0,04	0,08	1,14	1,14	0,48	0,32	0,17	2,43	1,87	1,77	2,68					
A 156	Chi	3 Sq	MT	0,796	0,24	0,23	0,49	0,08	0,51	0,32	0,34	3,61	0,08	0,26	1,78	1,47	0,40	7,52					
B 180	Cav	1 Sq	UN	1,681	2,07	0,90	0,46	0,47	0,59	0,14	0,12	1,57	0,20	0,90	3,44	1,26	0,42	3,06					
B 171	Wae	3 Sq	UN	1,034	2,56	2,98	0,75	0,04	3,77	0,42	0,48	1,71	0,16	0,52	1,04	1,57	0,87	4,33					
B 179	Dur	3 Sq	PT	1,326	2,29	2,29	0,48	0,05	0,35	0,28	0,48	0,80	0,17	0,37	1,72	1,68	0,23	4,45					
C 225	Arc	2 Sq	UN	1,933	1,26	0,71	0,41	0,10	0,00	0,94	0,81	1,30	0,23	0,48	4,57	2,97	1,22	2,03					
C 235	Por	2 Sq	UN	1,552	0,78	0,50	0,60	0,04	0,26	0,47	0,50	0,38	0,05	0,69	2,47	0,49	0,00	1,85					
C 237	Guy	3 Sq	PT	0,947	2,98	2,93	0,35	0,06	1,99	0,33	0,47	3,66	0,15	0,14	2,91	1,55	0,43	3,19					
A 141	Del	1 Ad	PT	0,837	0,98	1,98	1,41	0,13	0,00	0,13	0,37	0,27	0,24	2,09	3,55	2,00	1,81	5,65					
A 150	Bog	2 Ad	PT	0,555	0,63	0,60	0,58	0,03	0,36	0,72	1,07	2,23	--	0,24	4,72	4,03	1,28	3,94					
A 144	Des	3 Ad	PT	0,567	0,88	2,10	2,46	0,27	0,00	0,20	0,13	1,00	0,11	0,40	2,66	1,20	0,53	3,21					
A 158	Suc	3 Ad	UN	0,599	0,87	0,81	0,47	0,03	0,00	0,53	0,18	1,20	--	0,31	4,28	2,93	1,71	1,89					
B 167	Coul	3 Ad	PT	0,731	1,40	2,04	0,46	0,04	0,00	0,18	0,14	0,37	--	0,21	1,49	1,57	0,69	0,74					
B 172	Bon	3 Ad	PT	0,859	0,31	0,44	0,34	0,01	0,41	0,24	0,30	1,01	0,28	0,38	0,97	1,74	0,52	2,15					
C 241	Ber	1 Ad	UN	0,797	1,35	0,83	2,12	0,22	0,00	2,13	2,07	0,72	0,08	0,51	4,56	1,94	0,00	7,52					
C 234	Dam	3 Ad	PT	1,610	1,18	0,67	0,73	0,23	1,78	1,18	1,18	3,72	0,27	0,90	2,43	1,71	0,55	2,87					

TABLA 2 (Conti.)

grupo			paci	stg di		puntos famosos				Pensados inicialmente como grandes en escamoso y/o adenocarcinoma										
gel	ente	ag	so	Oscuro	L2	L4	P18	P18a	s109	s101	s102	s107	s21	s62	s79	s80	s90	s95		
A	145	Bai	3 SC	MT	0,756	0,13	0,07	4,65	0,83	0,00	0,00	0,31	0,02	0,08	0,41	0,50	0,28	0,42		
A	146	Cha	4 SC	MT	0,734	0,42	0,67	6,02	1,14	0,23	0,13	0,16	0,04	0,00	0,16	0,76	0,00	0,84		
A	148	Bri	4 SC	MT	0,791	0,50	0,56	8,33	2,66	0,00	0,19	0,28	0,08	0,00	0,55	0,85	0,13	0,45		
A	151	Moy	4 SC	MT	0,599	0,21	0,21	7,41	2,44	0,00	0,48	0,00	0,04	0,00	1,03	0,74	0,00	0,59		
A	152	Boua	4 SC	MT	0,783	0,03	0,18	4,42	0,57	0,00	0,00	1,20	0,03	0,03	0,84	0,67	0,00	0,16		
A	157	Couc	2 SC	UN	0,410	0,16	0,82	4,71	1,07	0,00	0,28	0,15	0,26	0,05	1,31	0,53	0,26	0,98		
B	164	Boul	3 SC	UN	0,652	0,54	1,26	4,94	1,30	0,00	0,35	0,71	0,43	0,12	0,05	1,38	0,51	0,00	1,17	
C	224	Ney	3 SC	PT	2,068	0,12	0,69	4,27	0,37	0,00	0,23	0,32	0,12	0,19	0,20	2,01	0,72	1,57	0,09	
C	242	Pil	4 SC	MT	1,722	1,03	0,55	0,62	0,21	0,00	0,20	0,22	0,30	0,00	0,11	2,30	1,33	0,00	0,38	
-	-	-	Medias de	Sq	-	1,59	1,33	0,686	0,140	0,910	0,515	0,559	1,84	0,170	0,405	2,38	1,65	0,779	3,93	
-	-	-	Medias de	Ad	-	0,948	1,18	1,07	0,119	0,319	0,664	0,679	1,31	0,196	0,630	3,08	2,13	0,886	3,49	
-	-	-	Medias de	SC	-	0,349	0,556	5,04	1,17	0,025	0,205	0,238	0,339	0,064	0,057	1,10	0,735	0,248	0,563	
-	-	-	Varianza de	Sq	-	0,904	1,19	0,326	0,027	1,48	0,108	0,084	1,68	0,006	0,070	1,29	0,435	0,411	3,71	
-	-	-	Varianza de	Ad	-	0,134	0,516	0,680	0,011	0,380	0,475	0,489	1,30	0,008	0,395	2,01	0,828	0,412	4,78	
-	-	-	Varianza de	SC	-	0,097	0,137	4,77	0,736	0,005	0,023	0,052	0,118	0,003	0,004	0,514	0,064	0,260	0,133	
-	-	-	p - valores	-	-	0,001	0,108	0,000	0,000	0,077	0,106	0,123	0,014	0,005	0,017	0,004	0,000	0,079	0,000	

TABLA 3

Pensados inicialmente como más grandes en adenocarcinoma

grupo	pací	stg di	so	s43	s29	s36	s40	s42	s76	s53	s83	s92	s94	s84	s100	s96
	gel	ente	ag													
A 155	Duc	1 Sq	PT	0,08	0,26	0,08	0,91	0,08	0,50	0,09	0,41	0,02	0,92	0,74	0,21	1,15
A 143	Mor	3 Sq	PT	0,00	1,48	0,15	2,57	0,04	0,75	0,43	0,55	0,24	2,00	1,04	0,46	1,30
A 156	Chi	3 Sq	MT	0,07	0,36	0,12	1,81	0,04	0,95	1,50	0,44	0,57	1,38	1,36	0,44	0,90
B 180	Cav	1 Sq	UN	0,11	1,33	0,54	4,16	0,28	1,26	0,24	1,42	0,18	2,23	0,54	0,17	1,53
B 171	Wae	3 Sq	UN	0,03	2,09	0,19	0,83	0,05	0,95	0,14	0,27	0,00	0,53	0,79	0,10	2,13
B 179	Dur	3 Sq	PT	0,11	0,96	0,24	1,51	0,08	0,61	0,13	0,52	0,05	0,64	0,45	0,12	1,82
C 225	Arc	2 Sq	UN	0,12	2,04	0,51	3,70	0,21	0,52	0,63	1,87	0,54	6,11	0,65	0,12	3,42
C 235	Por	2 Sq	UN	0,04	1,48	0,24	2,32	0,09	0,49	0,65	1,06	0,98	3,67	0,56	0,02	2,33
C 237	Guy	3 Sq	PT	0,08	0,96	0,35	2,50	0,13	0,59	0,36	0,99	0,61	3,59	0,37	0,00	1,10
A 141	Del	1 Ad	PT	0,11	0,65	0,20	2,93	0,07	5,85	1,61	0,93	0,73	3,67	2,02	0,87	1,80
A 150	Bog	2 Ad	PT	0,06	0,76	0,34	4,72	0,16	1,43	2,70	1,16	0,81	4,46	1,40	0,37	2,67
A 144	Des	3 Ad	PT	0,15	6,85	0,26	2,96	0,08	3,72	2,08	0,64	0,41	3,24	2,09	0,60	4,41
A 158	Suc	3 Ad	UN	0,03	1,20	0,32	4,56	0,19	0,69	0,63	1,07	0,41	2,43	0,78	0,13	0,30
B 167	Coul	3 Ad	PT	0,06	1,52	0,19	1,26	0,15	0,39	0,17	0,26	0,00	0,51	0,14	0,00	1,40
B 172	Bon	3 Ad	PT	0,07	0,76	0,30	1,02	0,07	1,12	0,26	0,36	0,08	0,32	0,17	0,03	3,30
C 241	Ber	1 Ad	UN	0,12	2,01	0,37	3,94	0,13	0,42	0,52	1,33	0,59	7,94	0,93	0,14	3,30
C 234	Dam	3 Ad	PT	0,09	1,04	0,19	1,85	0,05	0,91	0,13	0,53	0,07	2,59	0,58	0,17	1,75

TABLA 3 (Conti.)

grupo				paci	stg di	Pensados inicialmente como más grandes en adenocarcinoma											
	gel	ente	ag	so	s43	s29	s36	s40	s42	s76	s53	s83	s92	s94	s84	s100	s96
A	145	Bai	3 SC	MT	0,00	0,22	0,18	0,26	0,03	4,00	0,00	0,13	0,00	0,20	0,33	0,01	0,16
A	146	Cha	4 SC	MT	0,00	0,28	0,09	0,18	0,00	0,71	0,00	0,07	0,00	0,06	0,43	0,13	0,49
A	148	Bri	4 SC	MT	0,00	0,30	0,04	0,41	0,02	0,16	0,13	0,15	0,00	0,45	0,75	0,17	0,50
A	151	Moy	4 SC	MT	0,00	0,41	0,17	0,99	0,01	0,25	0,09	0,26	0,00	0,59	0,85	0,05	0,88
A	152	Boua	4 SC	MT	0,00	0,21	0,16	0,58	0,03	0,24	0,32	0,20	0,19	0,63	0,66	0,00	0,35
A	157	Couc	2 SC	UN	0,00	0,59	0,14	0,87	0,00	0,16	0,07	0,25	0,00	0,94	0,64	0,00	1,11
B	164	Boul	3 SC	UN	0,00	1,07	0,17	1,00	0,09	0,39	0,22	0,29	0,00	0,62	0,74	0,14	2,34
C	224	Ney	3 SC	PT	0,14	1,45	0,31	1,91	0,06	0,22	0,11	0,40	0,00	1,54	0,13	0,02	1,76
C	242	Pil	4 SC	MT	0,00	1,02	0,26	1,61	0,07	0,24	0,20	0,94	0,20	2,12	0,10	0,00	0,49
-	-	-	Medias de	Sq	0,070	1,21	0,270	2,25	0,111	0,736	0,463	0,837	0,354	2,34	0,721	0,182	1,74
-	-	-	Medias de	Ad	0,085	1,84	0,271	2,90	0,112	1,81	1,01	0,784	0,385	3,14	1,01	0,287	2,36
-	-	-	Medias de	SC	0,016	0,617	0,168	0,870	0,033	0,706	0,125	0,297	0,043	0,793	0,513	0,058	0,898
-	-	-	Varianza de	Sq	0,001	0,423	0,027	1,30	0,006	0,070	0,195	0,292	0,113	3,34	0,096	0,027	0,628
-	-	-	Varianza de	Ad	0,001	4,28	0,005	2,06	0,002	3,79	0,968	0,155	0,096	5,81	0,579	0,092	1,69
-	-	-	Varianza de	SC	0,002	0,205	0,006	0,350	0,000	1,55	0,011	0,067	0,007	0,430	0,076	0,004	0,526
-	-	-	p - valores		0,006	0,144	0,120	0,002	0,013	0,166	0,020	0,021	0,024	0,032	0,127	0,078	0,015

TABLA 4

Pensados inicialmente como más grandes en célula pequeña excepto que 103 también es grande en adenocarcinoma

grupo	gel	paci	stg di	so	s103	s14	s15	s16	s17	s22	s27	s31	s33	s41	s48	s49	s50	s68	s75
A 155	Duc	1 Sq	PT	0,18	0,30	0,38	0,59	0,23	0,15	0,00	0,10	0,15	0,06	0,06	0,39	0,09	0,06	0,02	0,30
A 143	Mor	3 Sq	PT	0,23	0,18	0,26	0,53	0,16	0,21	0,00	0,16	0,00	0,09	0,09	0,52	0,17	0,00	0,05	0,50
A 156	Chi	3 Sq	MT	0,00	0,24	0,11	0,30	0,04	0,07	0,00	0,00	0,00	0,06	0,06	0,14	0,12	0,01	0,09	0,28
B 180	Cav	1 Sq	UN	0,50	0,22	0,22	0,16	0,49	0,11	0,05	0,11	0,00	0,45	0,59	0,12	0,14	0,06	0,06	0,48
B 171	Wae	3 Sq	UN	0,20	0,14	0,16	0,14	0,12	0,09	0,08	---	0,00	0,33	0,59	0,21	0,12	0,03	0,03	0,35
B 179	Dur	3 Sq	PT	0,39	0,25	0,31	0,16	0,80	0,15	0,07	0,10	0,06	0,17	0,63	0,11	0,06	0,03	0,03	0,41
C 225	Arc	2 Sq	UN	0,30	0,21	0,37	0,49	0,35	0,13	0,06	0,05	0,00	0,11	0,51	0,35	0,06	0,06	0,09	0,52
C 235	Por	2 Sq	UN	0,48	0,11	0,28	0,37	0,28	0,05	0,06	0,10	0,00	0,06	0,38	0,18	0,10	0,01	0,01	0,42
C 237	Guy	3 Sq	PT	0,12	0,06	0,05	0,54	0,22	0,10	0,03	0,00	0,00	0,10	0,56	0,00	0,00	0,00	0,03	0,35
A 141	Del	1 Ad	PT	0,79	0,26	0,48	0,33	0,09	0,19	0,03	0,10	0,00	0,07	0,22	0,18	0,12	0,12	0,06	0,51
A 150	Bog	2 Ad	PT	0,49	0,31	0,40	1,01	0,08	0,06	0,00	0,17	0,00	0,25	0,26	0,21	0,06	0,06	0,07	0,49
A 144	Des	3 Ad	PT	0,59	0,35	0,26	0,78	0,00	0,21	0,00	0,15	0,00	0,34	0,27	0,25	0,06	0,06	0,10	0,39
A 158	Suc	3 Ad	UN	0,34	0,12	0,12	0,19	0,14	0,14	0,04	0,07	0,00	0,11	0,36	0,13	0,03	0,03	0,18	0,38
B 167	Coul	3 Ad	PT	0,32	0,00	0,11	0,03	0,57	0,18	0,00	0,12	0,00	0,16	0,46	0,28	0,28	0,50	0,07	0,40
B 172	Bon	3 Ad	PT	0,39	0,22	0,08	0,20	0,35	0,07	0,00	0,13	0,00	0,36	0,42	0,57	0,02	0,02	0,05	0,47
C 241	Ber	1 Ad	UN	0,43	0,37	0,10	1,16	0,05	0,11	0,18	0,39	0,00	0,12	0,32	0,31	0,05	0,05	0,17	0,60
C 234	Dam	3 Ad	PT	0,25	0,13	0,18	0,35	0,34	0,08	0,03	0,23	0,00	0,09	---	0,00	0,07	0,07	0,08	0,42

TABLA 4 (Conti.)

			Pensados inicialmente como más grandes en célula pequeña excepto que 103 es también grande en adenocarcinoma																		
grupo	paci	stg di	gel	ente	ag	so	s103	s14	s15	s16	s17	s22	s27	s31	s33	s41	s48	s49	s50	s68	s75
A	145	Bai	3 SC	MT			0,10	0,47	0,64	1,06	0,53	0,13	0,12	0,50	0,16	0,33	0,22	0,04	0,35	0,14	0,30
	146	Cha	4 SC	MT			1,02	0,83	1,10	1,84	0,96	0,42	0,21	0,32	0,21	0,44	0,61	0,11	1,59	0,20	0,56
	148	Bri	4 SC	MT			0,24	2,35	2,67	1,95	0,83	0,44	0,29	0,50	0,27	0,35	0,54	0,27	0,87	0,28	0,84
	151	Moy	4 SC	MT			0,45	0,86	1,28	0,60	0,68	0,39	0,22	0,49	0,18	0,13	0,49	0,35	0,56	0,16	0,41
	152	Boua	4 SC	MT			0,79	0,70	3,31	1,15	0,75	0,25	0,23	1,00	0,11	0,23	0,23	0,23	0,36	0,14	0,32
	157	Couc	2 SC	UN			0,32	0,21	0,48	1,22	0,63	0,27	0,10	0,39	0,05	0,08	0,57	0,52	0,44	0,27	0,60
B	164	Boul	3 SC	UN			0,53	0,67	0,46	0,29	1,23	0,12	0,44	0,45	0,00	0,32	0,64	0,36	0,44	0,15	0,49
C	224	Ney	3 SC	PT			0,22	1,94	1,82	0,44	1,59	0,37	0,25	0,33	0,07	0,21	0,49	0,05	0,56	0,13	0,92
	242	Pil	4 SC	MT			1,02	0,20	0,48	0,83	0,67	0,04	0,09	0,12	0,00	0,16	0,55	0,29	0,75	0,27	0,86
-	-	-	Medias de	Sq			0,266	0,188	0,239	0,364	0,299	0,118	0,039	0,077	0,023	0,157	0,477	0,150	0,061	0,045	0,400
-	-	-	Medias de	Ad			0,449	0,220	0,216	0,504	0,202	0,130	0,034	0,169	0,000	0,187	0,328	0,242	0,114	0,097	0,455
-	-	-	Medias de	SC			0,521	0,915	1,35	1,04	0,874	0,271	0,215	0,456	0,117	0,249	0,483	0,245	0,658	0,191	0,588
-	-	-	Varianza de	Sq			0,027	0,005	0,012	0,032	0,052	0,002	0,001	0,003	0,002	0,018	0,023	0,009	0,002	0,000	0,007
-	-	-	Varianza de	Ad			0,030	0,016	0,022	0,177	0,039	0,003	0,003	0,010	0,000	0,013	0,007	0,027	0,024	0,002	0,005
-	-	-	Varianza de	SC			0,120	0,556	1,08	0,335	0,114	0,021	0,011	0,056	0,009	0,013	0,023	0,024	0,153	0,003	0,055
-	-	-	p - valores				0,099	0,003	0,000	0,006	0,000	0,004	0,000	0,000	0,002	0,297	0,067	0,299	0,000	0,000	0,046

TABLA 5

Pensados inicialmente como más grandes en célula pequeña

grupo			Pensados inicialmente como más grandes en célula pequeña																	
gel	paci	stg di	ag	so	s47	s57	s58	s59	s61	s66	s67	s73	s74	s81	s105	s85	s86	s97	s98	s106
A 155	Duc	1 Sq	PT		0,29	0,60	0,71	1,35	0,32	0,00	0,08	0,09	0,11	0,10	0,46	0,31	0,97	0,22	0,58	0,52
			PT		0,17	0,31	0,33	0,84	0,00	0,00	0,41	0,05	0,27	0,11	0,30	0,34	0,46	0,34	0,42	0,46
			MT		0,00	0,14	0,18	0,34	0,00	0,31	0,04	0,00	0,15	0,00	0,43	0,22	0,00	0,00	0,43	0,41
B 180	Cav	1 Sq	UN		0,20	0,51	0,78	2,03	0,23	0,28	0,10	0,09	0,09	0,10	0,34	0,73	0,32	0,55	0,16	0,30
			UN		0,15	0,46	0,68	0,93	0,14	0,27	0,07	0,00	0,00	0,27	0,20	0,15	0,35	0,71	0,30	0,55
			PT		0,15	0,73	1,64	2,35	0,29	0,64	1,36	0,04	0,13	0,41	0,37	0,22	0,48	0,40	0,35	0,34
C 225	Arc	2 Sq	UN		0,11	0,40	0,46	0,85	0,07	0,23	0,27	0,08	0,15	0,00	0,28	1,53	0,23	0,57	0,36	0,44
			UN		0,14	0,49	0,32	1,58	0,07	0,34	0,04	0,00	0,30	0,10	0,20	0,19	0,19	1,18	0,41	0,24
			PT		0,16	0,27	0,44	1,04	0,06	0,21	0,05	0,07	0,19	0,00	0,15	0,21	0,38	0,27	0,30	0,15
A 141	Del	1 Ad	PT		0,16	0,40	0,34	0,94	0,00	0,00	0,43	0,15	0,36	0,00	0,52	0,64	0,50	0,43	0,45	0,24
			PT		0,07	0,54	0,47	0,55	0,00	0,19	0,19	0,13	0,00	0,00	0,44	0,43	0,15	0,43	0,33	0,25
			PT		0,10	0,34	0,17	0,35	0,00	0,38	0,66	0,00	0,24	0,00	0,75	0,26	0,16	0,52	0,64	0,64
			UN		0,12	0,40	0,65	0,91	0,00	0,48	0,09	0,25	0,19	0,00	0,30	2,92	---	0,43	0,11	0,19
B 167	Coul	3 Ad	PT		0,12	0,41	0,77	1,82	0,15	0,58	0,11	0,08	0,00	0,17	0,35	0,59	0,24	0,17	0,13	0,29
			PT		0,25	0,34	0,46	1,19	0,40	0,31	0,02	0,00	0,00	0,76	0,25	0,19	0,11	0,07	0,19	0,29
C 241	Ber	1 Ad	UN		0,42	0,36	0,48	1,19	0,16	0,05	0,07	0,11	0,20	0,12	0,17	0,32	0,44	0,50	0,62	0,55
			PT		0,15	0,27	0,39	1,57	0,10	0,03	0,05	0,04	0,08	0,00	0,23	0,32	0,24	0,45	0,49	0,31

TABLA 5 (Conti.)

		Pensados inicialmente como más grandes en célula pequeña																			
grupo	paci	stg di																			
	gel	ente	ag	so	s47	s57	s58	s59	s61	s66	s67	s73	s74	s81	s105	s85	s86	s97	s98	s106	
A	145	Bai	3 SC	MT	0,33	0,38	0,74	1,35	0,68	0,60	1,32	0,16	0,32	0,21	0,45	0,35	0,76	0,17	1,50	0,88	
A	146	Cha	4 SC	MT	0,51	1,54	1,34	3,75	1,43	1,17	0,07	0,28	0,82	0,74	0,83	1,27	1,01	1,74	0,59	0,88	
A	148	Bri	4 SC	MT	0,51	0,95	1,10	2,84	1,38	2,14	1,50	0,44	0,43	0,55	1,15	1,31	1,98	1,65	1,09	1,56	
A	151	Moy	4 SC	MT	0,47	1,53	1,36	2,40	1,03	0,74	1,95	0,21	0,48	1,03	0,88	0,66	1,92	1,33	1,16	0,92	
A	152	Boua	4 SC	MT	0,34	0,74	1,39	3,39	0,27	1,07	1,46	0,25	0,43	0,74	1,08	0,49	0,45	0,16	0,86	0,95	
A	157	Couc	2 SC	UN	0,39	0,87	0,69	2,46	0,63	0,50	1,30	0,19	0,00	0,20	0,47	0,67	1,25	0,69	1,09	0,38	
B	164	Boul	3 SC	UN	0,40	0,66	1,42	2,47	0,45	0,77	1,23	0,08	0,24	0,21	0,39	0,29	1,35	0,86	0,43	0,96	
C	224	Ney	3 SC	PT	0,32	0,74	1,11	1,36	0,07	0,25	0,81	0,12	0,15	0,30	0,34	0,37	0,47	0,63	0,21	0,59	
C	242	Pil	4 SC	MT	0,21	0,94	0,66	1,91	0,10	0,51	0,14	0,15	0,12	0,21	0,33	0,07	0,36	0,63	0,34	0,27	
-	-	-	Medias de	Sq	0,151	0,435	0,616	1,25	0,132	0,253	0,268	0,046	0,154	0,121	0,302	0,434	0,375	0,470	0,367	0,380	
-	-	-	Medias de	Ad	0,175	0,382	0,466	1,06	0,100	0,252	0,203	0,095	0,134	0,130	0,376	0,710	0,263	0,374	0,369	0,345	
-	-	-	Medias de	SC	0,385	0,929	1,09	2,43	0,672	0,860	1,08	0,209	0,332	0,465	0,657	0,610	1,06	0,872	0,808	0,819	
-	-	-	Varianza de	Sq	0,005	0,032	0,189	0,405	0,014	0,036	0,183	0,001	0,008	0,018	0,011	0,200	0,070	0,116	0,012	0,017	
-	-	-	Varianza de	Ad	0,012	0,006	0,033	0,238	0,019	0,047	0,050	0,007	0,018	0,069	0,035	0,825	0,023	0,026	0,045	0,025	
-	-	-	Varianza de	SC	0,009	0,148	0,100	0,677	0,265	0,312	0,397	0,011	0,060	0,096	0,106	0,183	0,374	0,341	0,190	0,145	
-	-	-	p - valores		0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,002	0,000	0,001	0,046	0,010	0,007	0,652	0,001	0,042	0,005	0,001	

REIVINDICACIONES

5 1. Método para diagnosticar el cáncer de pulmón en un animal o ser humano, que comprende detectar al menos una de las proteínas MRP8 y MRP14 que se sobreexpresa en tumores de pulmón, en una muestra de suero o una sección de tejido del animal o ser humano, pero excluyendo un método de diagnóstico practicado sobre el cuerpo del ser humano o animal.

10 2. Método según la reivindicación 1, en el que se usa un anticuerpo específico para un epítipo formado por heterodimerización de las proteínas MRP8 y MRP14.

3. Método según la reivindicación 1, que comprende:

15 (a) tratar una sección de tejido con un anticuerpo específico para un epítipo formado por heterodimerización de las proteínas MRP8 y MRP14;

(b) lavar cualquier anticuerpo no unido; y

20 (c) determinar la cantidad de anticuerpo unido en la sección de tejido como una indicación de la presencia del tejido tumoral.

4. Método según la reivindicación 1, que comprende:

25 a) separar proteínas en una muestra de suero de dicho animal o ser humano;

(b) transferir dichas proteínas a una membrana;

30 (c) someter a prueba dichas proteínas con un anticuerpo específico para un epítipo formado por heterodimerización de las proteínas MRP8 y MRP14;

(d) determinar la cantidad de anticuerpo unido;

(e) integrar la intensidad de la reactividad en una banda; y

35 (f) determinar a partir de la intensidad integrada, la presencia o estadio del tumor.

5. Método según la reivindicación 4, en el que la banda es de un material de proteína de 14 kDa.

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

Muestra "Duc" de cáncer de pulmón de célula escamosa b6155



FIG. 2

Ab6148, cáncer "Bri" de pulmón de célula pequeña clásico.

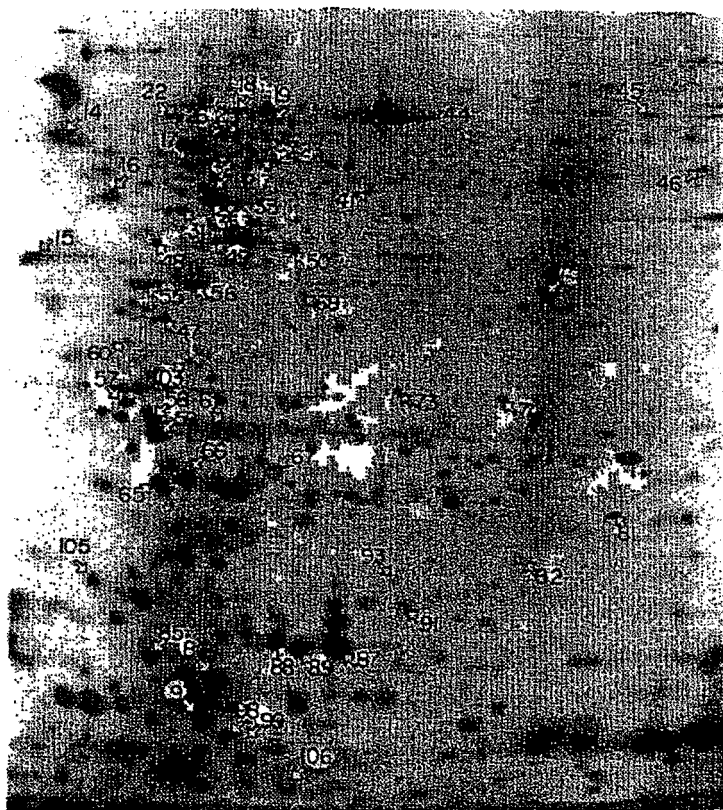


FIG. 3

Muestra "Del" de adenocarcinoma b6141

