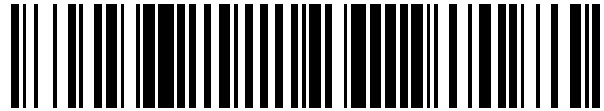


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 457**

21 Número de solicitud: 201101131

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.10.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.05.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE VIGO (50.0%)
CAMPUS UNIVERSITARIO S/N
36310 VIGO (Pontevedra) ES y
SERVICIO GALEGO DE SAÚDE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ BERROCAL, Francisco Javier;
SÁNCHEZ OTERO, Nuria;
BLANCO PRIETO, Sonia;
VÁZQUEZ IGLESIAS, Lorena;
PÁEZ DE LA CADENA TORTOSA, María;
FERNÁNDEZ VILLAR, Alberto;
BOTANA RIAL, María Isabel;
LEIRO FERNÁNDEZ, Virginia y
REPRESAS REPRESAS, Cristina**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA EL DIAGNÓSTICO DE DERRAME PLEURAL MALIGNO MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CALPROTECTINA EN LÍQUIDO PLEURAL.**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al desarrollo y puesta a punto de un procedimiento utilizable para el diagnóstico del derrame pleural maligno, que permita distinguir a aquellos pacientes que presentan derrame pleural derivado de patologías de origen oncológico, de aquellos que sufren derrame pleural cuyo origen no es maligno.

ES 2 402 457 A1

DESCRIPCIÓN

La elección de esta proteína se basa en resultados previos de nuestro grupo de investigación obtenidos en estudios de proteómica realizados en líquido pleural (21). En ese trabajo se comparó el proteoma (separado mediante electroforesis bidimensional) del derrame pleural de pacientes con tuberculosis y el de pacientes con
5 derrame pleural de origen maligno (adenocarcinoma de pulmón). Tras el análisis de la expresión de las proteínas en uno y otro caso se observó que la proteína calprotectina se expresaba en cantidades mucho más bajas en los pacientes con cáncer.

No existen en la literatura trabajos en los que se compare el nivel de expresión de calprotectina entre derrames benignos y malignos, por lo que el método de
10 diagnóstico que se propone, basado en la determinación de los niveles de calprotectina, es completamente novedoso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención pretende proteger la utilización de la medida de concentración en líquido pleural de la proteína calprotectina como método para
15 distinguir derrames pleurales de origen maligno de aquellos de origen benigno, empleando para ello una metodología específica. Que ayudará y orientará al clínico acerca del diagnóstico de los pacientes.

En este procedimiento se utiliza una técnica sencilla, rápida, fiable y económica que consiste en la determinación mediante el método ELISA de tipo
20 sándwich, de la concentración de la proteína calprotectina en el fluido pleural de pacientes que han sufrido un derrame pleural. Por otro lado, el reducido coste económico de este procedimiento y la facilidad de su adquisición, realización e implantación aseguran su utilización en la rutina clínica. Además, la realización de esta prueba tan solo implica la extracción de una pequeña muestra de líquido pleural
25 durante una revisión.

Hay que considerar que este procedimiento ayudaría a reducir el gasto sanitario al permitir preseleccionar a los potenciales pacientes oncológicos y evitar así la aplicación generalizada y masiva de pruebas más costosas y traumáticas. Además, la rapidez en el diagnóstico del DPM redundaría en una mayor supervivencia de los
30 pacientes.

Durante la valoración de los niveles de calprotectina de los pacientes analizados, los inventores del procedimiento objeto de esta patente, hemos demostrado que las concentraciones de calprotectina son diferentes en pacientes con derrame pleural derivado de patologías malignas que en aquellos que presentaban derrame pleural originado por patologías benignas. Los pacientes que presentaban derrame pleural derivado de patologías benignas presentaban concentraciones de calprotectina superiores a los detectados en patologías malignas (Benignas $2.627,1 \pm 2.182,1$ ng/mL vs Malignos $257,2 \pm 134,4$ ng/mL).

De acuerdo con lo anterior, la información obtenida con la valoración de la calprotectina permite determinar el diagnóstico de cada paciente, disminuyéndose los gastos sanitarios. Además, el reducido coste económico de este procedimiento junto con su fácil realización avala su viabilidad.

DESCRIPCIÓN DE UN MODO DE REALIZACIÓN

El procedimiento consiste en la determinación de la concentración de la proteína calprotectina en pacientes con derrame pleural, atendidos y diagnosticados desde abril de 2007 hasta diciembre de 2010, en el Servicio de Bronconeumología del Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI). La determinación de la etiología del derrame pleural se basó en los criterios descritos por la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (7) y la British Thoracic Society, en su guía de 2010 (6).

El procedimiento que proponemos comienza con la obtención de 10 mL de fluido pleural de pacientes diagnosticados de derrame pleural. En función de ese diagnóstico los pacientes se dividieron en dos grupos:

- pacientes con derrame pleural de origen maligno (DPM). De los cuales teníamos un grupo heterogéneo de pacientes que padecían cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de mama, mesotelioma, cáncer microcítico, linfoma, adenocarcinoma gástrico, carcinoma ovárico, neoplasia epitelial de origen tímico, y colangiocarcinoma.

- pacientes con derrame pleural de origen benigno (DPB). De los cuales teníamos también un grupo heterogéneo compuesto por pacientes que presentaban derrame de tipo tuberculoso, derrame de tipo neumónico, derrame de tipo idiopático, derrame reactivo, y derrame de diversos orígenes.

5 Para medir la concentración de calprotectina, el fluido pleural obtenido mediante toracocentesis (extracción de una cantidad variable de líquido pleural) en cada paciente, fue centrifugado a 800g durante 15 min y congelado en alícuotas a -20°C hasta su utilización. La concentración de calprotectina se midió en muestras de fluido pleural convenientemente diluido y empleando un kit comercial de
10 inmunoensayo ELISA tipo sándwich de la casa HyCult Biotechnology (Uden, The Netherlands), que proporciona placas de 96 pocillos con un anticuerpo específico anti-calprotectina fijado a los pocillos y todos los reactivos necesarios.

 Siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial, las muestras de fluido pleural y los patrones se diluyen en *Assay diluent*. 100 µL de muestra diluida se
15 añaden a los pocillos y se incuban a temperatura ambiente durante 1h. Esto permite que la calprotectina presente en la muestra se una a su anticuerpo específico. A continuación, los pocillos se lavan aplicando 200 µL de *Wash buffer* en cada uno de ellos, repitiendo el proceso de lavado 3 veces. Posteriormente, se añaden 100 µL de otro anticuerpo que reconoce la proteína calprotectina y que está marcado con biotina,
20 dejando un tiempo de incubación de 1h para que se efectúe la unión. Al igual que en el paso anterior, después de la incubación se lavan los pocillos 3 veces con 200 µL de *Wash buffer*. Posteriormente, se añaden 100 µL de estreptavidina conjugada con peroxidasa y se incuban durante 1h, para permitir la formación del complejo biotina-estreptavidina, realizando seguidamente 4 lavados con 200 µL de *Wash buffer*.
25 Finalmente, se añaden 100 µL del sustrato de la enzima peroxidasa para producir la aparición de un producto coloreado. La reacción se incubó 25 minutos a temperatura ambiente y se para mediante la adición de *Stop solution*, midiendo la absorbancia a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

 Para calcular la concentración de calprotectina en cada muestra se elabora una
30 curva patrón con los datos de absorbancia obtenidos de los patrones de concentraciones conocidas de calprotectina.

En nuestro estudio, la concentración en pacientes con DPM expresada como media \pm desviación estándar fue de $257,2 \pm 134,4$ ng/mL, mientras que en pacientes con DPB fue de $2.627,1 \pm 2.182,1$ ng/mL. Por lo tanto, se observa una disminución en los niveles de calprotectina en pacientes con DPM. La diferencia observada entre la concentración en DPM y DPB es estadísticamente significativa ($p=0,000$) aplicando a los datos el test de la U de Mann-Whitney.

Con los datos obtenidos se elaboró una curva ROC (Receiving Operating Curve) y se determinó la sensibilidad de la prueba, definida como la capacidad para identificar correctamente a aquellos pacientes que presentan la patología, y la especificidad, definida como la capacidad de la prueba para identificar correctamente a aquellos que no presentan la patología (22). En nuestro estudio, utilizando como punto de corte $736,4$ ng/mL de calprotectina, todos los pacientes con DPM tenían una concentración igual o inferior de calprotectina medida en derrame pleural (es decir, sensibilidad del 100%), siendo la especificidad del 83,15 %.

Como el interés de la prueba es diagnosticar a los pacientes con DPM y en estos se había observado una disminución de los niveles de calprotectina, consideramos que la prueba es positiva cuando los niveles de calprotectina sean iguales o inferiores al punto de corte elegido y la prueba será negativa cuando la concentración sea superior a dicho punto de corte.

Por lo tanto, si consideramos un grupo de pacientes con DP de origen desconocido y se determina la concentración de calprotectina en el fluido pleural, se puede decir:

- Que de los pacientes que den un resultado positivo en la prueba se diagnosticarían correctamente el 100 % de los pacientes con DP. No obstante, un 16,85 % de sujetos con DP no maligno se clasificarían también dentro de este grupo (falsos positivos).

- Cuando la prueba resulte negativa (es decir, cuando se obtenga una concentración de calprotectina superior al punto de corte), querrá decir que todos esos pacientes no padecen una enfermedad oncológica (verdaderos

negativos) y que el DP que sufren tiene origen en una enfermedad de tipo benigno, por lo que se pueden evitar pruebas agresivas para su confirmación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez Rodríguez E, Villena Garrido V, editores. *Enfermedades de la pleura*.
5 Monografías Neumomadrid. Madrid: Ergón; 2003.
2. Heffner JE. Diagnosis and Management of malignant pleural effusions. *Respirology*. 2008; 13(1):5-20.
3. Hooper C, Lee YC, Maskell N. Investigation of a unilateral pleural effusion in adults: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax*. 2010;
10 65(Suppl 2):ii4-eii17.
4. McGrath EE, MRCPI, Anderson PB. Diagnosis of Pleural effusion: A systematic approach. *American Journal of Clinical Care*, 2011;20(2):119-128.
5. Aleman C, Sánchez L, Alegre J, et al. Differentiating between malignant and idiopathic pleural effusions: the value of diagnostic procedures. *QJM*. 2007;
15 100(6):351-359.
6. Roberts ME, Neville E, Berrisford RG, Antunes G, Ali NJ. Management of a malignant pleural effusion: British Thoracic Society pleural disease guideline 2010. *Thorax*. 2010; 65(Suppl 2): 32-40.
7. Villena Garrido V, Ferrer Sancho J, Hernández Blasco L, et al. Áreas de Técnicas y
20 Trasplantes. SEPAR. Diagnóstico y tratamiento del derrame pleural. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica. *Arch Bronconeumol*. 2006; 42(7):349-72.
8. Menard O, Dousset B, Jacob C, Martinet Y. Improvement of the diagnosis of the cause of pleural effusion in patients with lung cancer by simultaneous quantification
25 of carcinoembryonic antigen (CEA) and neuron-specific enolase (NSE) pleural levels. *Eur J Cancer*. 1993;29A(13):1806–1809.
9. Toumbis M, Rasidakis A, Passalidou E, et al. Evaluation of CYFRA 21-1 in

- malignant and benign pleural effusions. *Anticancer Res.* 1996; 16(4A): 2101–2104.
10. Ferrer F, Villarino MA, Encabo G, et al. Diagnostic utility of CYFRA 21–1, carcinoembryonic antigen, CA 125, neuron specific enolase, and squamous cell antigen level determinations in the serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Cancer.* 1999; 86(8):1488–1495.
11. Miédougé M, Rouzaud P, Salama G, et al. Evaluation of seven tumour markers in pleural fluid for the diagnosis of malignant effusions. *Br J Cancer.* 1999;81(6):1059–1065.
12. Riantawan P, Sangsayan P, Bangpattanasiri K, et al. Limited additive value of pleural fluid carcinoembryonic antigen level in malignant pleural effusion. *Respiration.* 2000; 67(1):24–29.
13. Dejsomritrutai W, Senawong S, Promkiamon B. Diagnostic utility of CYFRA 21–1 in malignant pleural effusion. *Respirology.* 2001; 6(3):213–216
14. Alatas F, Alatas O, Metintas M, Colak O, Harmanci E, Demir S. Diagnostic value of CEA, CA 15-3, CA 19-9, CYFRA 21-1, NSE and TSA assay in pleural effusions. *Lung Cancer.* 2001;31(1):9–16.
15. Dikmen G, Dikmen E, Kara M, Sahin E, Dogan P, Ozdemir N. Diagnostic implications of telomerase activity in pleural effusions. *Eur Respir J.* 2003;22(3):422–426.
16. Villena V, López Encuentra A, Echave-Sustaeta J, Martín Escribano P, Ortuño-de-Solo B, Esteñoz-Alfaro J. Diagnostic value of CA 549 in pleural fluid: comparison with CEA, CA 15.3 and CA 72.4. *Lung Cancer.* 2003;40(3):289–294.
17. Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP. Potential clinical utility of serum HER-2/neu oncoprotein concentrations in patients with breast cancer. *Clin Chem.* 2003;49(10):1579–98.
18. Porcel JM, Vives M, Esquerda A, Salud A, Pérez B, Rodríguez-Panadero F. Use a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125, carbohydrate

antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant Effusions. *CHEST*. 2004;126(6):1757–1763.

19. Shitrit D, Zingerman B, Shitrit AB, Shlomi D, Kramer MR. Diagnostic value of CYFRA 21-1, CEA, CA 19-9, CA 15-3, and CA 125 assays in pleural effusions:
5 analysis of 116 cases and review of the literature. *Oncologist*. 2005;10(7):501-507.

20. Liang QL, Shi HZ, Qin XJ, Liang XD, Jiang J, Yang HB. Diagnostic accuracy of tumour markers for malignant pleural effusion: a meta-analysis. *Thorax*. 2008;63(1):35-41.

21. Rodríguez-Piñeiro AM, Blanco-Prieto S, Sánchez-Otero N, Rodríguez-Berrocal
10 FJ, Páez de la Cadena M. On the identification of biomarkers for non-small cell lung cancer in serum and pleural effusion. *J Proteomics*. 2010; 73(8):1511-1522.

22. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Preventive Veterinary Medicine* 2000;45(1):23-41.

15

PC1
Unmarked definida por PC1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201101131

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)
C07K14/47 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ODEGAARD E. et al., "Assessment of endoglin and calportectinas potential biomarkers in ovarian carcinoma and bordeline tumors of the ovary". Am. J. Obstet. Gynecol. (2008), 199: 533.e1-533.e8, todo el documento.	1
A	WO 2004057341 A2 (AXIS-SHIELD ASA) 08.07.2004, todo el documento.	1
A	WO 2011100483 A1 (UNIV CALIFORNIA) 18.08.2011, todo el documento.	1
A	INDOVINA P. et al., "Lung Cancer Proteomics: Recent Advances in Biomarker Discovery" International Journal of Proteomics (2011) doi:10.1155/2011/726869, todo el documento.	1
A	RODRIGUEZ-PIÑEIRO A.M. et al., "On the identification of biomarkers for non-small lung cancer in serum and plaural effusions" , Journal of Proteomics, 73, pág. 1511-1522, todo el documento. Citado en la solicitud	1

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
09.10.2012

Examinador
M. Hernández Cuéllar

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C07K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 09.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	ODEGAARD E. et al., "Assessment of endoglin and calprotectinas potential biomarkers in ovarian carcinoma and borderline tumors of the ovary". Am. J. Obstet. Gynecol. (2008), 199: 533.e1-533.e8, todo el documento.	
D02	WO 2004057341 A2 (AXIS-SHIELD ASA)	08.07.2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere al desarrollo y puesta a punto de un procedimiento utilizable para el diagnóstico del derrame pleural maligno mediante la determinación de la concentración de calprotectina en líquido pleural que permita distinguir a aquellos pacientes que presentan derrame pleural derivado de patologías de origen oncológico, de aquellos que sufren derrame pleural cuyo origen no es maligno. El procedimiento comprende los siguientes pasos: a) Obtención de muestras de 10 mL de fluido pleural de pacientes diagnosticados de derrame pleural, centrifugación de la muestra a 800g durante 15 mm y posterior congelación en alícuotas a -20°C hasta su utilización. b) Determinación de la concentración de calprotectina empleando el ensayo ELISA tipo sándwich de la casa HyCult Biotechnology y 100 µL de muestra diluida, siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial. c) Comparación de la concentración de calprotectina obtenida para cada una de las muestras para así poder realizar el diagnóstico de los pacientes en función de los parámetros descritos en esta patente (punto de corte para pacientes malignos ≤ 736,4 ng/mL).

El documento D01 se refiere a un estudio para evaluar el papel de la calprotectina como potencial biomarcador del carcinoma de ovario.

El documento D02 describe un método de diagnóstico de enfermedades cardiovasculares basado en la determinación de la concentración de calprotectina en una muestra de fluido corporal.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados en el estado de la técnica describe un procedimiento idéntico al reivindicado en la solicitud. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, la reivindicación 1 cumple el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos D01 y D02 se consideran los documentos más cercanos del estado de la técnica relativo a la invención.

El documento D01 se refiere a un estudio para evaluar el papel de la calprotectina como potencial biomarcador del carcinoma de ovario. Como parte del estudio se determinan las concentraciones de calprotectina en derrame pleural, peritoneal y se obtienen datos similares a los obtenidos en las concentraciones en plasma. El estudio concluye que las concentraciones de calprotectina en los distintos derrames no se correlacionan con el grado histológico o la supervivencia en un cáncer de ovario avanzado.

Según D02 la calprotectina probablemente se encuentra presente en los fluidos corporales y es conocido que la concentración de la misma cambia, por ejemplo, incrementándose en un número de trastornos. De esta forma, la midiendo la concentración de la calprotectina en el fluido corporal de pacientes que sufren de tales trastornos y comparando la concentración de calprotectina determinada con la existente en el fluido corporal de, por ejemplo, un sujeto sano, puede ser utilizada como un medio de diagnóstico de tales enfermedades.

Entre otras, las enfermedades en las que la calprotectina puede ser usada como un test diagnóstico incluyen: las enfermedades reumáticas (cg., la artritis reumatoide, la artritis reumatoide juvenil, el lupus eritematoso sistémico), el síndrome de Sjögren, los trastornos inflamatorios intraoculares, la fibrosis quística, la enfermedad pulmonar aguda y crónica, el carcinoma pulmonar (de células escamosas), los cánceres pulmonares, etc.

En opinión de esta Oficina, ninguno de los documentos D01 y D02 tomados solos o en combinación proporcionan evidencias suficientes al experto en la materia sobre el papel de la calprotectina como biomarcador de derrames pleurales de origen maligno. En consecuencia, el procedimiento de la reivindicación 1 cumple con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.