



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0619712-4 A2**

(22) Data de Depósito: 10/11/2006
(43) Data da Publicação: 11/10/2011
(RPI 2127)



* B R P I 0 6 1 9 7 1 2 A 2 *

(51) *Int.Cl.:*
C12Q 1/68
G01N 33/48

(54) Título: DISPOSITIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM PACIENTE COMO UM CANDIDATO PARA TESTES RADIOGRÁFICOS PARA O CÂNCER DO PULMÃO, COMPOSIÇÃO PARA DETECTAR RADIOGRAFICAMENTE UM CÂNCER DO PULMÃO DE ESTÁGIO ADIANTADO, DISPOSITIVO PARA O ENSAIO DO CÂNCER DO PULMÃO, USO DE UM PAINEL, E, DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DO CÂNCER DO PULMÃO

(57) Resumo: DISPOSITIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM PACIENTE COMO UM CANDIDATO PARA TESTES RADIOGRÁFICOS PARA O CÂNCER DO PULMÃO, COMPOSIÇÃO PARA DETECTAR RADIOGRAFICAMENTE UM CÂNCER DO PULMÃO DE ESTÁGIO ADIANTADO, DISPOSITIVO PARA O ENSAIO DO CÂNCER DO PULMÃO, USO DE UM PAINEL, E, DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DO CÂNCER DO PULMÃO. Um ensaio de diagnóstico para determinar a presença de câncer de pulmão em um paciente depende, em parte, da verificação da presença de um anticorpo associado com o câncer de pulmão. O ensaio prevê o câncer de pulmão antes da evidência do tecido de câncer radiograficamente detectável.

(30) Prioridade Unionista: 10/11/2005 US 60/735,418, 10/11/2005 US 60/735,555, 08/07/2006 US 60/806,778, 08/07/2006 US 60/806,778, 08/07/2006 US 60/806,778, 10/11/2005 US 60/735,418, 10/11/2005 US 60/735,555

(73) Titular(es): University Of Kentucky

(72) Inventor(es): Arnold J. Stromberg, Edward A. Hirschowitz, Li Zhong, Nada H. Khatar

(74) Procurador(es): David do Nascimento Advogados Associados

(86) Pedido Internacional: PCT US2006060796 de 10/11/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/079284de 12/07/2007

DISPOSITIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM PACIENTE COMO UM CANDIDATO PARA TESTES RADIOGRÁFICOS PARA O CÂNCER DO PULMÃO, COMPOSIÇÃO PARA DETECTAR RADIOGRAFICAMENTE UM CÂNCER DO PULMÃO DE ESTÁGIO ADIANTADO, DISPOSITIVO PARA O ENSAIO DO CÂNCER DO PULMÃO, USO DE UM PAINEL, E, DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DO CÂNCER DO PULMÃO

FUNDAMENTOS

O câncer de pulmão é a causa principal de morte por câncer para homens e mulheres nos Estados Unidos e em muitas outras nações. O número de mortes desta doença tem aumentado anualmente durante os últimos cinco anos a quase 164.000 nos Estados Unidos sozinhos, sendo que a maioria sucumbe a cânceres de células não-pequenas (CCNP). Isto excede as taxas de mortalidade do câncer de mama, de próstata e colorretal combinados.

Muitos peritos acreditam que a detecção precoce do câncer de pulmão é uma chave para melhorar a sobrevivência. Os estudos indicam que quando a doença é detectada em um estágio precoce, localizada e pode ser removida cirurgicamente, a taxa de sobrevivência de cinco anos pode atingir 85%. Mas a taxa de sobrevivência declina drasticamente depois que o câncer se espalha a outros órgãos, especialmente a locais distantes, sendo que somente 2% dos pacientes sobrevivem cinco anos. Infelizmente, o câncer de pulmão é uma doença heterogênea e é geralmente assintomática até que atinja um estágio avançado. Desse modo, somente 15% dos cânceres de pulmão são verificados em um estágio precoce, localizado. Há, portanto, uma forte necessidade quanto a ferramentas que ajudem na triagem das pessoas assintomáticas que conduza à detecção do câncer de pulmão em seus estágios mais precoces e mais tratáveis.

O raio X do tórax e as imagens de tomografia computadorizada (TC) foram estudados como ferramentas de

triagem potenciais para detectar o câncer de pulmão no estágio precoce. Infelizmente, o custo elevado e a taxa elevada de falsos positivos tornam estas ferramentas radiográficas pouco práticas para uma utilização difundida. Por exemplo, um estudo recente do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos concluiu que a triagem para o câncer de pulmão com raios X do tórax pode detectar o câncer de pulmão precocemente, mas produz muitos resultados de teste falsos positivos, motivando testes de acompanhamento desnecessários, Oken et al., *Journal of the National Cancer Institute*, 97(24)1832-1839, 2005. Dos 67.000 pacientes que receberam um raio X de linha base ao iniciar a experimentação, quase 6.000 (9%) tiveram resultados anormais que exigiram acompanhamento. Destes, somente 126 (2% dos 6.000 participantes com raios X anormais) foram diagnosticados com câncer de pulmão em um intervalo de doze meses do raio X do tórax inicial.

Um problema similar com falsos positivos está sendo verificado nas experimentações atuais que envolvem imagens de TC. A especificidade de triagem de TC é calculada ao redor de 65% com base no número de descobertas radiográficas indeterminadas.

Os peritos levantam questões sérias sobre o custo da saúde por vida salva ao avaliar o número de cânceres detectados por número de imagens de varredura por TC executadas, uma vez que uma grande parcela dos custos incorridos com os cuidados com a saúde pode ser atribuída ao número de nódulos pulmonares indeterminados verificados na varredura de prevalência que requerem uma investigação adicional, muitos dos quais são finalmente verificados como sendo benignos.

As varreduras por tomografia de emissão positrônica são uma outra opção diagnóstica, mas a varredura por

tomografia de emissão positrônica é cara e geralmente não receptiva para a utilização em programas de triagem.

Atualmente, a idade e o histórico de tabagismo são os únicos dois fatores de risco que têm sido utilizados como critérios de triagem por grandes estudos de triagem.

Um exame de sangue que poderia detectar radiograficamente os cânceres evidentes (> 0,5 cm) bem como o câncer oculto e pré-maligno (abaixo do limite de detecção radiográfica) deve identificar os indivíduos para os quais a triagem radiológica é mais garantida e, de fato, deve reduzir o número de descobertas pulmonares benignas que requerem um exame minucioso adicional.

Está claro, portanto, que há uma necessidade urgente quanto a ferramentas de triagem e detecção do câncer de pulmão aperfeiçoadas que superem as limitações acima mencionadas de técnicas radiográficas.

DESCRIÇÃO RESUMIDA

A presente invenção refere-se aos ensaios, métodos e kits para a detecção precoce do câncer de pulmão utilizando amostras de fluidos corpóreos. Em particular, a invenção refere-se à detecção do câncer de pulmão pela avaliação da presença de um ou de um painel de marcadores, tais como biomarcadores de autoanticorpos.

A presente invenção pode ser empregada em uma estratégia de triagem detalhada do câncer de pulmão especialmente quando utilizada conjuntamente com as imagens radiográficas e outras modalidades de triagem. A presente invenção pode ser utilizada para enriquecer a população para que uma análise radiográfica adicional exclua a possível presença de câncer de pulmão.

Resumidamente, a invenção refere-se a um método de detecção da presença provável de câncer de pulmão em um paciente, em uma realização, mediante a provisão de uma

amostra de sangue do paciente e a análise da amostra de sangue do paciente quanto à presença de um anticorpo ou de um painel de autoanticorpos associados com o câncer de pulmão. O painel pode ser identificado, por exemplo, pela avaliação da probabilidade máxima de câncer associada com os elementos do painel. Qualquer ferramenta de uma variedade de ferramentas estatísticas pode ser utilizada para avaliar a contribuição simultânea de variáveis múltiplas para um resultado.

A presente invenção foi empregada para analisar as amostras obtidas durante uma experimentação de triagem por TC principal e para distinguir o câncer de pulmão em estágio precoce e avançado, bem como a doença oculta dos controles combinados a riscos. O presente ensaio previu com exatidão de quase 90% a presença de câncer de pulmão até cinco anos antes da detecção radiográfica. O presente ensaio pode ser utilizado como um teste de triagem para pacientes assintomáticos ou pacientes de um grupo de risco elevado que ainda não foram diagnosticados com câncer de pulmão, utilizando testes e protocolos aceitáveis, isto é, por exemplo, não apresentam o câncer de pulmão radiograficamente detectável.

A invenção apresenta uma alternativa ao custo elevado e à baixa especificidade dos métodos de triagem atuais de câncer de pulmão, tais como o raio X do tórax ou a TC de Baixa Dose. O presente ensaio maximiza as taxas de detecção do câncer enquanto limita a detecção de nódulos pulmonares benignos que poderiam requerer uma avaliação adicional e, portanto, é uma ferramenta poderosa e de baixo custo que pode ser facilmente incorporada em uma estratégia de detecção detalhada precoce.

Estas e outras características, aspectos e vantagens da presente invenção serão mais bem compreendidos no que diz respeito à seguinte descrição e às reivindicações

em anexo.

DESCRIÇÃO DETALHADA

O diagnóstico precoce de estados patológicos é benéfico. No entanto, nem todos os estados patológicos têm assinaturas facilmente detectáveis simples. Outros estados patológicos são heterogêneos na etiologia ou no fenótipo ou através de qualquer estágio de desenvolvimento dos mesmos. Em tais circunstâncias, uma assinatura ou marcador diagnóstico único sensível e específico não irá provavelmente existir.

Não obstante, é agora possível desenvolver um ensaio de diagnóstico apropriado utilizando uma pluralidade de marcadores que, sozinhos, podem não ter um poder de previsão suficiente, mas em determinada combinação, um painel tem especificidade e sensibilidade suficientes para a utilização prática.

Além disso, técnicas multiplex e a capacidade de manipulação de dados permitem a flexibilidade de desenvolvimento de ensaios diagnósticos particularizados e personalizados de fácil utilização e com maior poder de previsão para populações definidas ou para a população em geral.

A presente invenção apresenta um novo ensaio e método para a detecção de doenças, tal como o câncer de pulmão, com mais antecedência e precisão do que os dispositivos convencionais. Resumidamente, uma amostra do paciente ou indivíduo, tal como uma amostra de sangue, é obtida e analisada quanto à presença ou a ausência de um painel de biomarcadores de anticorpo. Para o câncer de pulmão, um marcador ou um painel de marcadores é utilizado, sendo que cada marcador é associado em algum grau com o câncer de pulmão e em que a maior parte, quando um painel é utilizado, resulta em uma medida previsível da probabilidade de ocorrência de câncer de pulmão em uma população

heterogênea.

Conforme determinado mais detalhadamente abaixo, o ensaio e o método de acordo com a presente invenção identificaram corretamente pacientes com câncer de pulmão em estágio precoce e avançado.

A identificação dos pacientes com câncer de pulmão em estágio precoce é particularmente valiosa porque os ensaios e as modalidades de triagem têm pouca capacidade de fazer isto de uma forma barata e eficaz. O presente ensaio de triagem propicia uma previsibilidade mais ampla e produz menos falsos positivos do que os ensaios utilizados atualmente, que também são freqüentemente caros. O presente ensaio também é versátil, por utilizar um formato de ensaio que permite testar um grande número de amostras simultaneamente, tal como pela utilização de microarranjo, amostras de controle relativas a qualquer população podem ser executadas em paralelo para obter dados discriminadores de alta confiança, sendo que a pluralidade de controles é combinada para tantos parâmetros quanto possível à população de teste. Isso permite a correção para diferenças populacionais, tais como raça, sexo, idade, polimorfismo e assim por diante, que podem surgir e confundir os resultados.

Definições

Tal como utilizados na presente invenção, os seguintes termos terão os seguintes significados.

"Câncer de pulmão" significa um processo, estado e tecido maligno no pulmão.

"Proteína" é um peptídeo, oligopeptídeo ou polipeptídeo, os termos são utilizados intercambiavelmente na presente invenção, o qual é um polímero de aminoácidos. No contexto de uma biblioteca, o polipeptídeo não precisa codificar uma molécula com atividade biológica. Um anticorpo de interesse liga um epítopo ou determinante. Os epítopos são

porções de uma molécula funcional intacta e, no contexto de uma proteína, podem compreender somente aproximadamente três a aproximadamente cinco aminoácidos contíguos.

"Normalizado" refere-se a um tratamento estatístico de uma métrica ou medida para corrigir ou ajustar fundamentos e contribuições aleatórias ao resultado observado para determinar se a métrica, a estatística ou a medida é uma reflexão, resposta ou resultado verdadeiro de uma reação ou se é não-significativa e aleatória.

"Câncer de Pulmão de Células Não-pequenas" (CPCNP) é um subtipo de câncer de pulmão que é responsável por aproximadamente 80% de todos os cânceres de pulmão, em comparação ao câncer de células pequenas, que é caracterizado por células pequenas e ovóides, também conhecidas como câncer de células de aveia. No subtipo de CPCNP são incluídos o carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma de células grandes.

"Fluido corpóreo" é qualquer amostra líquida obtida ou derivada de um corpo, tal como sangue, saliva, sêmen, lágrima, extratos de tecido, exsudatos, lavagem de cavidades do corpo, soro, plasma, fluido de tecido, e outros ainda, que podem ser utilizados como uma amostra do paciente para teste. Preferivelmente, o fluido pode ser utilizado tal como se apresenta; no entanto, o tratamento, tal como a clarificação, por exemplo, por meio de centrifugação, pode ser utilizado antes do teste. Uma amostra de um fluido corpóreo é uma amostra de fluido.

"Amostra de sangue" significa uma alíquota pequena, geralmente de sangue venoso obtido de um indivíduo. O sangue pode ser processado, por exemplo, os fatores de coagulação são inativados, tal como com a heparina ou o EDTA, e as células vermelhas do sangue são removidas para resultar em uma amostra de plasma. O sangue pode ser levado a coagular e

as fases sólida e líquida são separadas para resultar no soro. Todas as tais amostras de sangue "processadas" estão dentro do âmbito da definição de "amostra de sangue", tal como utilizado na presente invenção.

"Epítopo" significa que uma estrutura molecular particular é ligada por um anticorpo. Um sinônimo é "determinante". Um epítopo de polipeptídeo pode ser tão pequeno quanto três a cinco aminoácidos.

"Biomarcador" refere-se a um fator, indicador, contagem, manipulação métrica, matemática, e outros ainda, que é avaliado e verificado como sendo útil na predição de um resultado, tal como o status de saúde atual ou um status de saúde futuro em uma entidade biológica. Um biomarcador é sinônimo de um marcador.

"Painel" significa um conjunto compilado de marcadores que são medidos conjuntamente para um ensaio. Um painel pode compreender dois marcadores, três marcadores, quatro marcadores, cinco marcadores, seis marcadores, sete marcadores, oito marcadores, nove marcadores, dez marcadores, onze marcadores, doze marcadores, ou mais. O tratamento estatístico e os métodos de ensaio mostrados no presente pedido e que podem ser aplicados na prática da presente invenção provêm a utilização de qualquer um de uma série de marcadores informativos em um ensaio de interesse.

"Resultado" é aquilo que é predito ou detectado.

"Autoanticorpos" referem-se às imunoglobulinas ou aos anticorpos (os termos são utilizados intercambiavelmente na presente invenção) dirigidos às (auto)proteínas "autólogas" incluindo células patológicas, tais como as células infectadas e as células de tumor. Neste caso, os anticorpos contra o tumor são derivados do próprio tumor de um indivíduo, que é uma aberração genética de suas próprias células.

"Soma ponderada" significa uma compilação de contagens de marcadores individuais, cada uma com um valor de previsão. Os marcadores com valor de previsão maior contribuem mais para a soma. O valor relativo dos marcadores individuais é derivado estatisticamente para maximizar o valor de uma expressão multivariável, utilizando paradigmas estatísticos conhecidos, tal como a regressão logística. Uma série de pacotes estatísticos comercialmente disponíveis pode ser utilizada. Em uma fórmula, tal como uma equação de regressão de fatores aditivos, o "peso" de cada fator (marcador) é revelado como o coeficiente desse fator.

"Estatisticamente significativas" referem-se às diferenças que improvavelmente serão relacionadas somente ao acaso.

"Marcador" é um fator, indicador, métrica, contagem, manipulação matemática, e outros ainda, que é avaliado e útil em um diagnóstico. Um marcador pode ser, por exemplo, um polipeptídeo ou um antígeno, ou pode ser um anticorpo que se liga a um antígeno. Um marcador também pode ser qualquer de um par de ligação ou parceiros de ligação, sendo que um par de ligação ou parceiros de ligação são as entidades com especificidade uma em relação à outra, tais como um anticorpo e um antígeno, hormônio e receptor, um ligante e a molécula à qual o ligante se liga para formar um complexo, uma enzima e uma co-enzima, uma enzima e um substrato, e assim por diante.

"Marcador previsto" é um marcador que está presente antes da detecção do câncer de pulmão, utilizando técnicas conhecidas. Desse modo, o presente ensaio detecta os autoanticorpos específicos de câncer de pulmão antes de um câncer radiograficamente detectável ser verificado em um paciente, por exemplo, até cinco anos antes que um câncer radiograficamente detectável seja observado. Tais

autoanticorpos são marcadores previstos.

"População alvo" significa qualquer subconjunto de uma população tipificada por um marcador, estado, condição, doença particular, e assim por diante. Desse modo, a população alvo pode ser de pacientes particulares com uma forma ou um estágio particular de câncer de pulmão ou uma população de fumantes, por exemplo. Uma população alvo pode compreender pessoas com um ou mais fatores de risco. Uma população alvo pode compreender pessoas com um resultado de teste suspeito, tal como a presença de uma anomalia no pulmão, que carece de um monitoramento adicional e mais oportuno.

"Radiográfico" refere-se a qualquer método de geração de imagens, tal como CAT, PET, raio X, e assim por diante.

"Câncer radiograficamente detectável" refere-se ao diagnóstico ou à detecção do câncer por meio de um dispositivo radiográfico. A presença de câncer é confirmada geralmente pela histologia.

"Amostra de tecido" refere-se a uma amostra de um tecido particular. Para uma amostra de tecido que está na forma líquida, a amostra pode ser um fluido corpóreo ou pode provir de um tecido líquido, tal como do sangue ou de uma alíquota de sangue processado. O termo também se refere a um fluido obtido de um tecido sólido, tal como, por exemplo, de um exsudato, fluido de cultura de tecido gasto, os elementos lavados de um tecido sólido fragmentado, e assim por diante.

Seleção de Biomarcador

A seleção e a identificação de marcadores associados com o câncer de pulmão, tais como dos autoanticorpos e das proteínas que têm afinidade específica a estes ou são ligados a estes desse modo, podem ser feitas por meio de qualquer dispositivo que utilize os métodos

disponíveis a um técnico no assunto. No caso de biomarcadores de anticorpo, qualquer um de uma variedade de métodos baseados em imunologia pode ser praticado. Conforme conhecido no estado da técnica, os aptâmeros, 'spiegelmers' e outros ainda que também têm uma especificidade de ligação podem ser utilizados no lugar do anticorpo. Muitos métodos conhecidos de rendimento elevado que se baseiam em uma reação de anticorpo-antígeno podem ser praticados na presente invenção.

As moléculas de indivíduos na população alvo podem ser comparadas àquelas de uma população de controle para identificar qualquer uma que seja específica para o câncer de pulmão, utilizando, por exemplo, a seleção de subtração, e assim por diante. Alternativamente, as amostras da população alvo e da população normal (do controle) podem ser utilizadas para identificar as moléculas que são específicas para a população alvo a partir de uma biblioteca de moléculas.

Uma forma de seleção por afinidade pode ser praticada com bibliotecas, utilizando um anticorpo como sonda para selecionar uma biblioteca de moléculas candidatas. A utilização de um anticorpo para selecionar os candidatos é conhecida como "biopeneiração". Então ainda resta validar as moléculas específicas da população alvo e a utilização destas e então determinar o poder dos marcadores individuais como preditores dos elementos da população alvo.

Um dispositivo apropriado é a obtenção de bibliotecas de moléculas, específicas para o câncer de pulmão ou não, e a seleção dessas bibliotecas para as moléculas que se ligam a anticorpos nos elementos da população alvo. Uma vez que os epítomos da proteína ou do polipeptídeo podem ser tão pequenos quanto três aminoácidos, mas podem ter menos de dez aminoácidos de comprimento, menos de vinte aminoácidos de comprimento, e assim por diante, o tamanho médio dos elementos individuais da biblioteca é uma escolha do projeto.

Desse modo, os elementos menores da biblioteca podem ter aproximadamente três a cinco aminoácidos para imitar um único determinante, ao passo que os elementos de vinte ou mais aminoácidos podem imitar ou conter dois ou mais determinantes. A biblioteca também não precisa ficar restrita a polipeptídeos como outras moléculas, tais como carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e as combinações destes, podem ser epítomos e desse modo ser utilizados como ou para identificar marcadores do câncer de pulmão.

Uma vez que o processo de identificação do biomarcador procura identificar epítomos em vez de proteínas intactas ou outras moléculas, as bibliotecas submetidas a varredura ou selecionadas não precisam ser específicas para o câncer de pulmão, mas podem ser obtidas a partir de moléculas de indivíduos normais ou podem ser obtidas a partir de populações de moléculas aleatórias, embora a utilização de amostras de pacientes com câncer de pulmão possa intensificar a probabilidade de identificar biomarcadores do câncer de pulmão apropriados. Os epítomos ou as moléculas que reagem de modo cruzado, não obstante, estão presentes e são imunogênicos nos pacientes com câncer de pulmão, independentemente da função das moléculas que contêm os epítomos.

Exemplificações desses métodos são descritas nos Exemplos, utilizando bibliotecas de fagos de cDNA específicas para o câncer de pulmão T7 e uma biblioteca de peptídeo aleatória M13. Ambas foram executadas em bibliotecas de exibição de fago, tal como conhecido no estado da técnica. Uma das bibliotecas de cDNA de CPCNP de fago T7 utilizadas estava comercialmente disponível (Novagen, Madison, WI, EUA) e a outra biblioteca T7 foi construída a partir da linhagem de células de adenocarcinoma, NCI-1650 (presente de H. Oie, NCI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Desse modo, uma biblioteca de fagos pode ser construída tal como conhecido no estado da técnica. O RNA total do tecido ou das células alvo é extraído e selecionado. A síntese do cDNA do primeiro cordão é realizada, assegurando a representação de seqüências de aminoácido de N-terminal e de C-terminal. O produto do cDNA é ligado em um vetor de fago compatível para gerar a biblioteca. A biblioteca é amplificada em um hospedeiro bacteriano apropriado e para aquele de fago lítico, tal como T7, as células são lisadas para obter um preparado de fago. Os lisatos são titulados sob condições padrão e armazenados após a purificação. Para outro fago, o vírus pode ser despejado no meio, tal como com M13, em cujo caso o vírus é coletado do sobrenadante e é titulado.

A biblioteca de fagos é biopeneirada ou selecionada com uma amostra de tecido, preferivelmente com uma amostra de fluido, tal como plasma ou soro, de pacientes com câncer de pulmão e com uma amostra de tecido análoga, tal como plasma ou soro de doadores saudáveis normais, para identificar moléculas exibidas potenciais reconhecidas por ligantes, tais como anticorpos circulantes, em pacientes com câncer de pulmão.

Em uma realização, a amostra de tecido é uma amostra de sangue, tal como plasma ou soro, e o objetivo é identificar os marcadores reconhecidos pelos anticorpos verificados no plasma ou no soro da população alvo, tais como pacientes com câncer de pulmão de células não-pequenas. Para remover os fagos que são reconhecidos por anticorpos da população não-alvo da biblioteca, a biblioteca de exibição de fago é, por exemplo, exposta a soro normal ou a soros agrupados. Os fagos que não reagiram são separados daqueles que reagiram com as amostras da população não-alvo. Os fagos que não reagiram são então expostos ao soro de CPCNP aos fagos isolados reconhecidos por anticorpos nos soros de

pacientes com CPCNP. O fago reativo é coletado, amplificado em um hospedeiro de bactérias apropriado, os lisatos são coletados, armazenados e identificados como a "amostra 1" ou como o "biocrivo 1". Os processos de biocrivo e de amplificação podem ser repetidos múltiplas vezes, geralmente utilizando as mesmas amostras alvo e de controle para intensificar o processo de purificação.

Os fagos dos biocrivos representam uma população enriquecida que contém mais provavelmente as moléculas expressas reconhecidas especificamente por anticorpos nas amostras de pacientes com CPCNP. Uma vez que muitas bibliotecas de fago expressam polipeptídeos, pode-se afirmar que os fagos selecionados expressam e representam os "peptídeos de captação" para anticorpos associados ao CPCNP.

Para selecionar adicionalmente os clones de fagos que expressam moléculas que são ligadas por anticorpos específicos ao CPCNP, os lisatos de fagos individuais selecionados nos biocrivos podem ser roboticamente identificados, por exemplo, em lâminas (Schleicher e Schuell, Keene, NH) utilizando um Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA) para produzir um microarranjo com uma pluralidade de moléculas expressas por fagos candidatas que foram ligadas por anticorpos nos soros de pacientes com CPCNP.

Para identificar quais moléculas de exibição de fago são provavelmente moléculas de captação específicas ao CPCNP (com capacidade de se ligar aos anticorpos específicos ao CPCNP), a lâmina de triagem é incubada, por exemplo, com amostras de soro de pacientes com CPCNP individuais, idealmente não aquelas utilizadas nos biocrivos, e selecionadas adicionalmente utilizando a metodologia de imunensaio padrão. Os anticorpos ligados aos fagos podem ser identificados, por exemplo, pela etiquetagem de cor dupla com os imunoreagentes apropriados, tal como conhecido no estado

da técnica, em que o produto da expressão do vetor de fago é etiquetado com uma primeira molécula relatora colorida ou detectável, para contar pela quantidade de produto da expressão em cada sítio, e o anticorpo ligado ao polipeptídeo expresso pelo fago é etiquetado com uma segunda molécula relatora colorida ou detectável, distinta da primeira molécula relatora.

Uma maneira conveniente de interpretar os dados para identificar as moléculas de captação associadas ou específicas ao CPCNP ligadas por anticorpos em amostras de CPCNP consiste na análise de regressão auxiliada por computador de variáveis múltiplas que indica o sinal médio e o desvio padrão de todos os polipeptídeos na lâmina. O tratamento estatístico é dirigido a um fago individual para determinar a especificidade e é também dirigido a uma pluralidade de fagos para determinar se um subconjunto de fagos pode conferir um poder de previsão maior de determinação se uma amostra é de um paciente com ou que provavelmente tem CPCNP. O tratamento estatístico de monitoração de amostras plurais permite a determinação do nível de variabilidade dentro de um ensaio. À medida que as amostras populacionais aumentam, a variabilidade pode ser utilizada para avaliar entre a variabilidade de ensaios e para fornecer parâmetros populacionais confiáveis.

Desse modo, os fagos que se ligam a anticorpos em amostras de pacientes a um grau maior do que outro fago na lâmina, microplaqueta e assim por diante, são considerados candidatos, quando, por exemplo, o sinal é > 1 , > 2 , > 3 ou mais desvios padrão da norma (o sinal médio na microplaqueta). Em algumas das experiências descritas na presente invenção, os candidatos representaram aproximadamente 1/100 dos polipeptídeos de exibição de fago na microplaqueta de triagem construída com uma biblioteca T7

biopeneirada quatro vezes.

Os clones de fagos candidatos são compilados em uma "microplaqueta diagnóstica" e são adicionalmente avaliados quanto ao valor de previsão independente em amostras discriminadoras de pacientes com CPCNP das amostras de uma população de não-CPCNP.

Os marcadores diagnósticos são selecionados pela capacidade de sinalizar/detectar/identificar a presença ou a presença futura de câncer de pulmão radiologicamente detectável em um indivíduo. Uma vez que algumas condições têm etiologias múltiplas, origens celulares múltiplas, e assim por diante, e com qualquer doença, é apresentado um plano de fundo heterogêneo, e um painel ou uma pluralidade de marcadores podem ser mais de previsão ou diagnósticos dessa condição particular. O câncer de pulmão é tal condição.

Conforme conhecido nas técnicas bioestatísticas, há uma série de esquemas estatísticos diferentes que podem ser executados para verificar o poder de previsão coletivo de variáveis múltiplas relacionadas, tais como um painel de marcadores ou a reatividade com um painel de marcadores. Desse modo, por exemplo, uma modelagem estatística dinâmica pode ser utilizada para interpretar os dados de uma pluralidade de fatores para desenvolver um teste prognóstico que seja baseado na utilização de dois ou mais fatores. Outros métodos incluem a modelagem Bayesiana que utiliza probabilidades condicionais, análise de quadrados mínimos, análise de quadrados mínimos parciais, regressão múltipla logística, redes neurais, análise discriminatória, análise com base na distribuição de livre classificação, combinações destas, variações destas, e assim por diante, para selecionar um painel de marcadores apropriados para a inclusão em um ensaio de diagnóstico. O objetivo é a manipulação de múltiplas variáveis e então o processamento dos dados para

maximizar uma métrica desejada, vide, por exemplo, Pepe & Thompson, *Biostatistics* 1, 123-140, 2000; McIntosh & Pepe, *Biometrics* 58, 657-664, 2002; Baker, *Biometrics* 56, 1082-1087, 2000; DeLong et al., *Biometrics* 44, 837-845, 1988; e Kendzioriski et al., *Biometrics* 62, 19-27, 2006, por exemplo.

Desse modo, em determinadas circunstâncias, o tratamento estatístico procura maximizar uma métrica de previsão, tal como a área sob a curva (ASC) das curvas características operantes receptoras (COR). Os tratamentos resultam em uma abordagem de formulação ou um algoritmo para maximizar os resultados com base em um conjunto selecionado de variáveis, revelando a influência relativa de qualquer uma ou de todas as variáveis para o resultado maximizado. A influência relativa de um marcador pode ser vista em uma fórmula derivada que descreve a relação como um coeficiente de uma variável. Desse modo, por exemplo, os dois painéis de cinco marcadores identificados nos estudos exemplificados descritos abaixo foram selecionados de tal análise e a ASC máxima, uma contagem, é descrita por uma fórmula que inclui os cinco marcadores, com o peso relativo de qualquer marcador na fórmula para obter o poder de previsão máximo representado como um coeficiente dessa variável qualquer. O coeficiente representa uma ponderação e a fórmula derivada pode ser vista como uma soma das variáveis ponderadas que resulta em uma soma ponderada.

O objetivo é encontrar um equilíbrio na maximização, por exemplo, a especificidade e a sensibilidade ou o valor de previsão positivo, em relação a uma pluralidade de variáveis (os marcadores) selecionada e de preferência mínima para permitir um ensaio de diagnóstico eficaz à luz desses parâmetros. A ponderação ou a influência de uma variável para o resultado maximizado é derivada dos dados até agora verificados e analisados, e é recalculada à medida que

o número de pacientes analisados aumenta. À medida que o número de pacientes aumenta, o mesmo ocorre com a confiança com que uma métrica representa um valor médio da população com uma faixa limite de confiança de valores em relação à média.

Conforme observado nos exemplos abaixo, os cinco painéis de marcadores exemplificados contêm os marcadores que têm uma especificidade individual que excede a especificidade observada na varredura por TC. Desse modo, qualquer um dos marcadores que tem uma especificidade maior do que 65% pode ser utilizado com vantagem como um ensaio de diagnóstico para o câncer de pulmão, uma vez que o presente ensaio deve ser tão eficiente no diagnóstico do câncer de pulmão quanto o padrão atual, e aplicado a um custo mais baixo e de uma maneira menos invasiva.

Além disso, pode ser observado que os cinco marcadores fornecem juntos um poder de previsão maior do que qualquer marcador, independentemente da métrica. Os marcadores podem ser de previsão em subpopulações diferentes, ou a expressão de dois ou mais dos marcadores pode ser coordenada, por exemplo, eles podem compartilhar de uma presença ou de uma função biológica comum. O valor de previsão agregado não é necessariamente aditivo, e combinações diferentes de marcadores podem fornecer graus diferentes de exatidão de previsão. O tratamento estatístico utilizou o poder de previsão maximizado, e a combinação de cinco marcadores foi o resultado, com base nas populações de referência estudadas. Desse modo, uma amostra do paciente é testada com os cinco marcadores e o diagnóstico, em princípio, é calculado com base nos cinco marcadores, por causa da presença coordenada de dois ou mais dos marcadores e na métrica diagnóstica com base na pluralidade de marcadores, tal como um dos cinco painéis de marcadores mostrados abaixo.

Conforme discutido na presente invenção, por causa do tratamento estatístico, tal como a regressão logística, qualquer uma das variáveis que contribuem à métrica multivariável pode ter uma contribuição maior ou menor para o total maximizado. Se um paciente tiver uma contagem, uma soma e outros ainda que sejam de pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, ou mais, da métrica agregada dos cinco marcadores, até mesmo nas circunstâncias em que um paciente pode ser negativo para um ou mais dos marcadores, por causa do fato de ser positivo, alguns ou mais dos marcadores mais pesados, que o paciente é considerado mais provavelmente como sendo positivo para o câncer de pulmão. A contagem de limite, a soma e outros ainda, que podem ser uma referência ou um valor padrão, que podem ser um valor médio da população e o nível aceitável de similaridade da amostra do paciente/experiência para essa contagem, soma e outros ainda para resultar em um resultado de teste positivo, indicativo da possibilidade da presença de câncer de pulmão, é uma escolha do projeto e pode ser determinada por uma análise estatística que fornece um limite de confiança ou nível de detecção de uma amostra positiva, ou pode ser desenvolvida empiricamente, sob o risco de um falso positivo. Conforme mostrado acima, esse nível pode ser de pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, ou mais, da métrica agregada dos cinco marcadores ou da soma da população, do valor de referência, e assim por diante. O limite ou a "tolerância", isto é, o grau de similaridade aceitável da contagem do paciente, da soma e outros ainda, a partir da contagem da população, da soma e outros, ainda pode ser aumentada, isto é, a contagem do paciente deve estar muito perto da contagem da população, para aumentar a sensibilidade.

O poder de previsão de um marcador ou de um painel

pode ser medido utilizando qualquer uma de uma variedade de estatísticas, tais como especificidade, sensibilidade, valor de previsão positivo, valor de previsão negativo, precisão de diagnóstico, ASC, por exemplo, das curvas de COR que são uma relação entre a especificidade e a sensibilidade, embora se saiba que o formato da curva de COR é uma consideração relevante do valor de previsão, e assim por diante, tal como conhecido no estado da técnica.

A utilização de marcadores múltiplos permite que um teste de diagnóstico seja mais eficaz e tenha mais probabilidade de servir como diagnóstico em uma população maior por causa do poder de previsão agregado maior da pluralidade de marcadores considerados conjuntamente, em comparação à utilização de qualquer marcador sozinho.

Conforme discutido em maiores detalhes abaixo, a presente invenção contempla a utilização de formatos de ensaio diferentes. Microarranjos permitem o teste simultâneo de amostras múltiplas. Desse modo, uma série de amostras de controle, positivo e negativo, pode ser incluída no microarranjo. O ensaio pode ser então executado com o tratamento simultâneo de amostras plurais, tais como uma amostra de uma ou mais amostras de pacientes afetados conhecidas e uma ou mais amostras de pacientes normais, juntamente com uma ou mais amostras a serem testadas e comparadas, as experimentais, a amostra do paciente, a amostra a ser testada e assim por diante. A inclusão de controles internos no ensaio permite a normalização, a calibração e a padronização da força do sinal dentro do ensaio. Por exemplo, cada um dos controles positivos, dos controles negativos e dos experimentais pode ser executado de uma forma plural, e as amostras plurais podem ser uma diluição em série. Os locais de controle e experimentais também podem ser aleatoriamente arranjados no dispositivo de

microarranjo para minimizar a variação devido à localização do local da amostra no dispositivo de teste.

Desse modo, tal microarranjo ou microplaqueta com controles internos permite o diagnóstico dos elementos experimentais (pacientes) testados simultaneamente no microarranjo ou na microplaqueta. Tal método de teste e de aquisição de dados múltiplo de uma maneira controlada permite o diagnóstico dos pacientes dentro de um dispositivo de ensaio enquanto os controles apropriados são esclarecidos e se o painel de marcadores for aquele que tem individualmente um poder de previsão razoavelmente elevado, tal como, por exemplo, uma ASC para uma curva de COR de $> 0,85$ e uma ASC total através dos cinco marcadores de $> 0,95$, então um ponto de resultado diagnóstico de cuidados pode ser obtido.

O ensaio pode ser operado de uma maneira qualitativa quando se verifica que cada um dos marcadores de um painel tem características relativamente comparáveis, tais como aquelas dos exemplos abaixo. Desse modo, uma amostra do paciente com câncer de pulmão provavelmente será positiva para todos os cinco marcadores e tal amostra será muito provavelmente positiva para o câncer de pulmão. Isso seria validado ao determinar as probabilidades com base nos cinco marcadores ao todo, conforme discutido na presente invenção, obtendo a soma ou a contagem de uma métrica dos cinco marcadores para o paciente e então comparando esses dados ao poder de previsão dos marcadores, derivado da utilização de uma ferramenta estatística tal como discutido acima. Um paciente positivo para quatro dos marcadores, uma vez que o poder dos quatro marcadores permanece provavelmente substancial, que também deve ser considerado em risco, pode ser diagnosticado com câncer de pulmão e/ou deve ser examinado em maiores detalhes. Um paciente positivo somente para três marcadores pode provocar a necessidade de um novo

teste, um teste que utilize outros marcadores, um teste radiográfico ou um outro teste, ou pode ser chamado para outro teste com o presente ensaio dentro de um outro determinado intervalo de tempo.

Desse modo, para um painel de n marcadores, há uma fórmula derivada do poder de previsão, tal como uma fórmula de regressão, que define o gráfico de probabilidade máxima que define a relação dos cinco marcadores com o resultado. O paciente pode ser positivo para menos do que n marcadores em cujo caso o paciente pode ser considerado positivo ou provavelmente positivo para uma consideração adicional quando uma maioria dos marcadores, digamos 50% ou mais do que a metade, está presente nesse paciente. Além disso, se o paciente apresentar sinais patentes potencialmente sintomáticos de um distúrbio do pulmão, uma vez que alguns painéis podem ser específicos para uma doença particular, tal como o CPCNP, pode ser que o paciente precise ser analisado adicionalmente para descartar outros distúrbios do pulmão.

Desse modo, em qualquer ensaio que utilize n marcadores, um resultado preliminar e qualitativo pode ser obtido com base no número bruto de sinais positivos do número total de marcadores testados. Um limite razoável pode ser positivo para 50% ou mais dos marcadores. Desse modo, se quatro marcadores forem testados, um positivo da amostra para 2, 3 ou 4 dos marcadores pode ser presumivelmente considerado como possivelmente portador de câncer de pulmão. Se cinco marcadores forem testados, um positivo da amostra para 3, 4 ou 5 marcadores pode ser considerado presumivelmente positivo. O limite pode ser variado como uma escolha do projeto.

Com base na aquisição e tratamento estatístico dos dados, do ponto de vista de uma população, um painel de marcadores otimizado pode ser dinâmico e pode variar com o

tempo, pode variar com o desenvolvimento de marcadores novos, pode variar à medida que a população muda, aumenta, e assim por diante.

Além disso, à medida que a população testada aumenta de tamanho, a confiança no subconjunto do marcador, os coeficientes ponderados e a possibilidade da probabilidade exata do diagnóstico podem se tornar mais certos se os marcadores forem biológicos ou mecanisticamente relacionados e desse modo os desvios, os limites de confiança ou os limites de erro irão diminuir. Portanto, a invenção também contempla a utilização de um subconjunto de marcadores que são úteis na população geral. Alternativamente, um dispositivo de ensaio de interesse pode conter somente um subconjunto de marcadores, tal como o painel com cinco marcadores que foram utilizados nos exemplos mostrados abaixo, os quais foram otimizados para uma determinada população.

As inserções de clones de fagos que codificam polipeptídeos podem ser analisadas para determinar a seqüência de aminoácido do polipeptídeo expresso. Por exemplo, as inserções de fagos podem ser amplificadas por PCR utilizando primers de vetor de fago comercialmente disponíveis. Clones originais são identificados com base nas diferenças de tamanho e no padrão de digestão de enzimas dos produtos de PCR e os produtos originais de PCR são então purificados e arranjados em seqüência. Os polipeptídeos codificados são identificados por comparação a seqüências conhecidas, tal como o banco de dados GenBank utilizando o programa de busca BLAST.

Desse modo, por exemplo, as Tabelas 1 e 2 resumem abaixo os clones de fagos T7 do cDNA de câncer de pulmão que se ligam ao autoanticorpo em pacientes com câncer de pulmão.

TABELA 1

Clone de Fago #	ID - Símbolo de Gene	Seqüência de Peptídeo
PC84*	ZBF440	TLERNHVNNSVNVNPLVILLPIEYIK ELTLEKSLMNIRNVGKHFIVDPDIVD MKGFTWEKRLINVRNVEKHSRVPV MFVYMKGPTLGKISMNVSSVGKHY PLLQVFKHT (SEQ ID N°.:1)
PC87	STK2	GKVDVTSTQKEAENQRRVVTGSV SSSRSSSEMSSSKDRPLSARERRR QACGRTRVTS (SEQ ID N°.:2)
PC125	SOC5	SRRNQNCAEIPQIVEISIEKDND CVTPGTRLARRDSYS RHAPW GG K KKHSCSTKTQSSLDADKKF (SEQ ID N°.:3)
PC123	RPL4	RNTILRQARNHKLVRVDKAAAAAA LQAKSDEKAAVAGKKPVVGGKKG ACGRTRVTS (SEQ ID N°.:4)
PC88 PC114 PC126**	RPL15	YWVGEDSTYKFFEVILIDPFHKAIR RNPDTQWITKPVHKHREMRLTS AGRKSRLGKGHKFHHTIGGSRR AAWRRRNTLQLHRYR (SEQ ID N°.:5)
PC40	NPM1	KLLSISGKRSAPGGGSKVPQKKVK LAAEDDDDDDEEDDDDDDDDD FDDEEAEEKAPVKKSIRDTPAKN (SEQ ID N°.:6)
PC20 PC22 G1802	p130	NKPAVTTKSPAVKPAAPKQPVGG GQKLLTRKADSSSSSEESSSEEE KTKKMVATTKPKATAKAALSLPAK QAPQGSRDSSSDSSSSSEEE KTSKSAVKKKPKQVAGGAAPXKPA SAKKGKAESSNSSSSDSSSEEE (SEQ ID N°.:7)
PC57	NFI-B	ASFPQHHPGIPGVAHSVISTRTPP PPSPLPFPTQAILPPAPSSYFSHTI RYPPHLNPQDTLKNYVPSYDSSP QTSQSWYLG (SEQ ID N°.:8)
PC94	HMG14	PKRRSARLSAKPPAKVEAKPKKAA AKDKSSDKKVQTKGKRGAKGQA EVANQETKEDLPAENGETKTEESP ASDEAGEKEAKSD (SEQ ID N°.:9)
PC16	COX4	AMFFIGFTALVIMWQKHVYVGPLP QSFDKWVAKQTKRMLDMKVNPI QGLASKWDYKNEWKK (SEQ ID N°.:10)
PC112	SFRS11	ATKKKSKDKEKDRERKSESDKDVK VTRDYDEEEQGYDSEKEKKEEK PI ETGSPKTKECSVEKGTGDS (SEQ ID N°.:11)
PC91	AKAP12	ESFKRLVTPRKS KSKLEEKSEDSI AGSGVEHSTPDTEPGKEESWVSIK KFIPGRRKRPDGGKQEQAPVEDA GPTGANEDSDVPAVPLSEYDAV EREKLAALAE (SEQ ID N°.:12)
L1864 L1873 L1852 L1804	GAGE 7	5'3' Quadro 1 MLGDPNSSRPSSVMKWNQOHLK KGNQQLNVRILQLLRRERMREHLQ VKGRSLKLVNRVTHRLGVSVKM

		VLMGRRWTRQIQRR (SEQ ID N°.:13) 5'3' Quadro 3 ARGSEFKSPEQFSDEVEPATPEEG EPATQRQDPAAAQEGEDEGASAG QGPKPEAHSQEQGHPQTGCECED GPDGQEMDPPNPPEEVKTPEEGEK QSQC (SEQ ID N°.:14)
G922	Placofilin	Quadro 3 ARGSEFKHGTVELQGSQTALYRT GSVGIGNLQRTSSQRSTLTYQRNN YALNTTATYAEPYRPIQYRVQECN YNRLQHAVPADDGTTRSPSI DSIQ D HARQT PW G PS EACG RT RVTS (SEQ ID N°.:15)
L747	EEFIA	5'3' Quadro 3 LAFVPIISGWNNGDNMLEPSANMPW FKGW KVTRKDG NASGTTLLEALDC ILPPTRPDKPLRLPLQDVYKIGGIG TVPVGRVETGVLPKGMVVTFAPVN VTTEVKSVMHHEA (SEQ ID N°.:16)
L1761	PMS2L15	5'3' Quadro 1 MLGDPNSSISLKFQAMDVG (SEQ ID N°.:17) 5'3' Quadro 3 ARGSEFKHLIEVSGNGCGVEEENF EGLISFSSETSHI (SEQ ID N°.:18)
G2004 G313 G1896 G1750 L1857 L1839 G1792 G1923	Paxilin (PXN)	LGDRTLGPKVHTLHSLVKTRRPGN KKNPSTAVYKTVLVSYEVKEGES QSCSQFTCLC (SEQ ID N°.:19)
PC6 PC8	RAB7	5'3' Quadro 3 ARGSEFKLLKVIILGDSGVGKTSL MNQYVNNKFSNOYKATIGADFLTK EXMVDDRLVTMQIWDTAGQERFQ SLGVAFYRGADCCVLVFDVTPANT FKTLDSW RDEFLIQASPRDPEN FP LVCFRGQSCFPTQQACGRTRVTS (SEQ ID N°.:20)
L1318 L1847 L968	UROD	CSGTXITISDIAGQPGPLMPCMLLR PFXGQLVKQMLDDFXXHRYIANLG HGLYPDMDPEHVGAFVDAVHKHS RLLRQN (SEQ ID N°.:21)
L1864 L1873 L1862 L1804	GAGE7	5'3' Quadro 1 MLGDPNSSRPPSSVMKWNQQHLK KGNQQLNVRILQLLRERMREHLQ VKGRSLKLIVRNRVTHRLGVSVKM VLMGRRWTRQIQRR (SEQ ID N°.:22) 5'3' Quadro 3 ARGSEFKSPEQFSDEVEPATPEEG EPATQRQDPAAAQEGEDEGASAG QGPKPEAHSQEQGHPQTGCECED GPDGQEMDPPNPPEEVKTPEEGEK QSQC (SEQ ID N°.:23)

* A porção do alfabeto do nome do clone de fago nesta e nas tabelas posteriores é fixada como uma designação de laboratório. Conforme utilizado na presente invenção, a porção numérica do nome do clone de fago é a identificação não-ambígua de um clone.

** Clones redundantes.

A Tabela 2 fornece outros clones identificados como associados com o CPCNP que parecem não codificar um polipeptídeo conhecido.

TABELA 2

Clone de Fago #	ID - Símbolo de Gene	Seqüência de Nucleotídeo
L1896	BAC clone RP11-499F19	TCCGGGGACGAATTCCTGGTAGC CTCATTAGCCGATGGAAGGTAG AAGGGACTCAGAACTTCAGGCCT NATTCCTGCGTTTTTGTATGCCCA AGAATGAAAGGGCTCTTTGTGAA TTGTCATGTAGATTTATTTAACAT TCAACCGGCAGAAAACGGAAGGT AGTGCATGACACTGGGGGGAAC CAGGCCCCCGCCACCTCACATC GTCATGGCATTAGCTGTTTACTG GCTCCCGTGGAAACATTGGAAGG GGATTTGTTTTGTGGTTGGGTTTC CTTTTTTTTTTTTTTTTAAACCAG (SEQ ID N°.:24)
L1919	SEC15L2	GATTCTTCCTACCTTTGTCAGCTA CTGAGTTGCTTCTGGGGAGGGAA GTAATTCCTTGCCCCTCCCCAAC CCCCCTACCTCACCATATCCTAT CATATCTTGATAGTCATGGGGAA GAGGATGTGCACACAGACATACA AATTTCCCTCAAAGCTGGAGAGAC CAGGCTACATGTGAGCTCATAGA TGCTGCTGAGGCTCATCTGAGG GCTGGATGGTTGGCCAGGGTTTC AGAATGAGGGTAAGGGATGAGCA CTGCCACCCAAGCTTGCGGCCG CACTCGAGTAACTAGTTAACCCC TTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTG AGGGGTTAANTAGTGACTCGAGT GCGGCCGCA (SEQ ID N°.:25)
L1761	PMS2L15	ATGCTCGGGGATCCGAATTCAG CATCTCATTGAAGTTTCAGGCAAT GGATGTGGGGTAGAAGAAGAAAA CTTCGAAGGCTTAATCTCTTTTCAG CTCTGAAACATCACACATCTAAGA TTCGAGAGTTTGCCGACCTAACT CGGGTTGAAACTTTTGGCTTTCA GGGGAAGCTCTGAGCTCACTTT GTGCACTGAGTGATGTCACCATT

		<p>TCTACCTGCCACGTATCGGCGAA GGTTGGGACTCGACTGGTGTGTTG ATCACGATGGGAAAATCATCCAG AAAACCCCTACCCCAACCCAG AGGGACCACAGTCAGCGTGAAG CAGTTATTTTCTACGCTACCTGTG CGCCATAAGGAATTTCAAAGGAA TATTAAGAAGTACAGAACCTGCTA AGGCCATCAAACCTATTGATCGG AAGTCAGTCCATCANATTTGCTCT GGGCCGGTGGTACTGAGTCTAA GCACTGCGGTGAAGAAGATAGTA GGAAACAGTCTGGATGCTGGTGC CACTAATATTGATCTAAAGCTTG (SEQ ID N°.:26)</p>
L1747	EEFIA	<p>GGGACGATTAGCTAGCATTGTG CCAATTTCTGGTTGGAATGGTGA CAACATGCTGGAGCCAAGTGCTA ACATGCCTTGGTTCAAGGGATGG AAAGTACCCGTAAGGATGGCAA TGCCAGTGGAACCACGCTGCTTG AGGCTCTGGACTGCATCCTACCA CCAACTCGTCCAAGTACAAGCC CTTGCGCCTGCCTCTCCAGGATG TCTACAAAATGGTGGTATTGGTA CTGTTCTGTGGCCGAGTGGAG ACTGGTGTCTCAAACCCGGTAT GGTGGTCACCTTTGCTCCAGTCA ACGTTACAACGGAAGTAAAATCT GTCGAAATGCACCATGAAGCTTG CGGCCGCACTCGAGTAACTAGTT AACCCCTGGGGCCTCTAAACGG GTCTTGAGGGGTTAACNAGTTG CTCGAGTGGGGCGGCNGGCTNC TTGGTGGTTTATTTTCAGA (SEQ ID N°.:27)</p>
G1954	MALAT1	<p>CTCGGGGATCCGAATTTCAAGCG GCAAGAAGTTTCAGAATAAGAAA ATGAAAAACAAGCTAAGACAAGT ATTGGAGAAGTATAGAAGATAGA AAAATATAAAGCCAAAATTGGAT AAAATAGCACTGAAAAAATGAGG AAATTATTGGTAACCAATTTATTTT AAAAGCCCATCAATTTAATTTCTG GTGGTGCAGAAGTTAGAAGGTAA AGCTTGAGAAGATGAGGGTGTGTT ACGTAGACCAGAACCAATTTAGA AGAATACTTGAAGCTAGAAGGGG AAGCTTGCGGCCGCACTCGAGTA ACTAGTTAACCCCTGGGGCCTC TAAACGGGTCTTGAGGGGTTAAC TCGAGTTACTCGTGGGCGCAGCT CTTGCTTAGTATTTTTAATGGTT GGTTGTAACCTTTCTGTTTCTCATC GCCGAATTATGATGGTTTTAAATA ATGATCATAATTCTTTCTTTTACT TGGTTTTTTTTTTTCACTTTTACTT</p>

		TCTGTTTATGAAGCACGCCCGCC CCACAA (SEQ ID N°.:28)
G1689	XRCC5	ATGCTCGGGGATCCGAATTCAGC TTGGGAACGCGGCCATTTCAAAG GGGAAGCCAAAATCTCAAGAAAT TCCCAGCAGGTTACCTGGAGGC GGATCATCTAATTCCTGTGGAAT GAATACACACATATATATTACAAG GGATAAGCTTGCGGCCGCACTC GAGTAACTAGTTAACCCCTTGGG GCCTCTAAACGGGACTTGAGGG GTAAGCTAGTTACTCGAGGGCGA GCTTATGGGAAATATATATTGCG GTATTTAAGGAATTAGTTACCCGC TCGCTGGCCTTTGAACTGTTGTTT GAGGCCTTAAATTGATGATCGTG GTGGGAAACAAGAGGTGGGGTG GGAGATTTGTTTTTTGTTCTGAAG CGGGGAGGGGACTAGACCCTAA AAGCATTTAAATATAAGACAACCC AAT (SEQ ID N°.:29)
G740	transcrito de CD44 Variante 5	GGGACGATCAGCATTGAATGAAT GTTGGCTACAAAATCAATTCCTGG TGTTGTATCAGAGGAGTAGGAGA GAGGAAACATTTGACTTATCTGG AAAAGCAAAATGTAATAAGAATA AGAATAACATGGTCCATTACCTT TATGTTATAGATATGTCTTTGTGT AAATCATTGTTTTGAGTTTTCAA AGAATAGCCCATTGTTTATTCTTG TGCTGTACAATGACCACTGNTTAT TGTTACTTTGACTTTTCAGAGCAC ACCCTTCCTCTGGTTTTTGTATAT TTATTGATGGATCAATAATAATGA GGAAAGCATGATATGTATATTGCT GAGTTGTTAGCCTTTTAAGCTTGC GGCCGCACTCGAGTAACTAGTTA ACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGG TCTTGAGGGGTTA (SEQ ID N°.:30)
L1829 L1841 L1676 L1916	BMI-1	GGTACGAATTAGCCAGANATCGG GGCGAGTACAATGGGGATGTGG GCGCGGGAGCCCCGCTCCCCTT TTTTAGCAGCACCTCCCAGCCCC GCAGAATAAAACCGATCGCANNCC CCTCCGCGCGGCCCTCCCCCG AGATGCGGAGCGGGAGGAGGCG GCGGCGGCCGAGGAGGAGGAG GAGGAGGCCCCGAGGAGGAGG CGTTGGAGGTCGAGGCGGAGGC GGAGGAGGAGGAGGCCGAGGC GCCGGANGAGGCCNAGGCGCCG GAGCAGGAGGAGGCCGCGCGA GGCGGCATGAGACGAGCGTGGC GGCCGCGGCTGCTCGGGCCGC GCTGGTTGCCCATGACAGCGGC GTCTGCAGCTCGCTCAAGATGG

		CCGCTTGGCTCGCATTTCATTTTCT GCTGAACGACTTTTAACTTTCNTT GTCTTTTCCGCCGCTTCNATCG CCTCNCGCCGGCTGCTCTTTCCG GGATTTTTTATCAAGCAGAAATGC ATCG (SEQ ID N°.:31)
--	--	--

As bibliotecas de peptídeos aleatórias também podem ser utilizadas para identificar os polipeptídeos candidatos que se ligam a anticorpos circulantes em pacientes com CPCNP, mas não nos normais. Desse modo, por exemplo, uma biblioteca de peptídeos de exibição de fago que compreende 10^9 peptídeos aleatórios fundidos a uma proteína de revestimento de vírus menor pode ser selecionada para as proteínas de captação que se ligam ao anticorpo do paciente com câncer de pulmão utilizando técnicas similares àquela descrita acima, tal como a utilização de microarranjos e como conhecido no estado da técnica. Uma biblioteca M13 que foi utilizada (New England Biolabs) expressa uma inserção de polipeptídeo do aminoácido 7 como uma estrutura de laço na superfície do fago.

Conforme descrito na presente invenção, a biblioteca é biopeneirada para enriquecer as proteínas expressas por fagos que são reconhecidas especificamente pelos anticorpos circulantes no soro do paciente com CPCNP. Os lisatos de fagos de clones selecionados são manchados roboticamente (Affymetrix, Santa Clara, CA) em duplicata nas lâminas (Schleicher e Schuell, Keene, NH). O fago arranjado é incubado com uma amostra de soro de um paciente com CPCNP para identificar as proteínas expressas por fagos ligadas aos anticorpos circulantes associados com o câncer de pulmão.

Utilizando um imunoenensaio conhecido, com as moléculas relatoras apropriadas, as linhas de regressão geradas pelo computador que indicam o sinal médio e o desvio padrão de todos os polipeptídeos na lâmina são utilizadas para identificar os peptídeos que foram ligados ao anticorpo no plasma do paciente com CPCNP. O fago que se liga a

quantidades significativas de anticorpo a partir de uma amostra de plasma de CPCNP (por exemplo, > 3 desvios padrão da norma) é considerado candidato para uma avaliação adicional.

TABELA 3

ID de Fago	Seqüência de Nucleotídeo	Seqüência de Aminoácido (3 letras)
MC0457	ATTGTGAATAAGCATAAGGTT (SEQ ID N°.:32)	Ile Val Asn Lys His Lys Val
MC0908	GAGCGGTCTCTGAGTCCGATT (SEQ ID N°.:33)	Glu Arg Ser Leu Ser Pro Ile
MC0919	TTGAGTCAGAATCCGCATAAG (SEQ ID N°.:34)	Leu Ser Gln Asn Pro His Lys
MC1484	AATGCGAGTCATAAGTGTCT (SEQ ID N°.:35)	Asn Ala Ser His Lys Cys Ser
MC1509	AATGCGCTGGCTAATCCTTCG (SEQ ID N°.:36)	Asn Ala Leu Ala Asn Pro Ser
MC1521	GCGAAGCCGCCGAAGCTGTCT (SEQ ID N°.:37)	Ala Lys Pro Pro Lys Leu Ser
MC1524	AGGGCTCTGGATCCGGATTTCG (SEQ ID N°.:38)	Arg Ala Leu Asp Pro Asp Ser
MC1760	ATACTACTGGGTCCGCTCTGT (SEQ ID N°.:39)	Ile Leu Leu Gly Arg Leu Cys
MC1786	AAGGTTAATACTCATCATACT (SEQ ID N°.:40)	Lys Val Asn Thr His His Thr
MC2541	CTGTTTCTGACGGCGCAGGCG (SEQ ID N°.:41)	Leu Phe Leu Thr Ala Gln Ala
MC2720	TTTAATTGGTATAAATTCGTCG (SEQ ID N°.:42)	Phe Asn Trp Tyr Asn Ser Ser
MC2729	CTTCCGCATCAGCTGCGGTGG (SEQ ID N°.:43)	Leu Pro His Gln Leu Ala Trp
MC2853	CTTGCGTGGTATGCGAAGAGT (SEQ ID N°.:44)	Leu Ala Trp Tyr Ala Lys Ser
MC2900	AAGATTGGGACGGCGTGGCTT (SEQ ID N°.:45)	Lys Ile Gly Thr Ala Trp Leu
MC2986	ACGCCTACTCATGGTGGGAAG (SEQ ID N°.:46)	Thr Pro Thr His Gly Gly Lys
MC2996	ACTCCTACTTATGCGGGGTAT (SEQ ID N°.:47)	Thr Pro Thr Tyr Ala Gly Tyr
MC2998	ATGCCGGCTACTACGCCTCAG (SEQ ID N°.:48)	Met Pro Ala Thr Thr Pro Gln
MC3000	AAGGCGTGGTTTGGGCAGATT (SEQ ID N°.:49)	Lys Ala Trp Phe Gly Gln Ile
MC3018	AAGAATTGGTTTGGTCATACG (SEQ ID N°.:50)	Lys Asn Trp Phe Gly His Thr
MC3023	CATACTCATCATGATAAGCAT (SEQ ID N°.:51)	His Thr His His Asp Lys His
MC3046	ATTACGAATAAGTGGGGGTAT (SEQ ID N°.:52)	Ile Thr Asn Lys Trp Gly Tyr
MC3050	CTGAATACGCATTTCGTCTCAG (SEQ ID N°.:53)	Leu Asn Thr His Ser Ser Gln
MC3143	GGGCCTGCGTGGGAGGATCCG (SEQ ID N°.:54)	Gly Pro Ala Trp Glu Asp Pro

MC3146	AGTCAGTCTTATCATAAGCGTAC TAGC (SEQ ID N°.55)	Ser Gln Ser Tyr His Lys Arg Thr Ser
--------	--	--

Os clones específicos para o câncer de pulmão adicionais ainda não arranjados em seqüência são fornecidos na Tabela 4 abaixo.

TABELA 4
Clones M13

ID de Fago		
MC1011	MC1805	MC2987
MC2106	MC2238	MC3019
MC2628	MC2645	MC3045
MC2829	MC3047	MC3048
MC3052	MC3156	MC3135
MC3096	MC3090	

O objetivo de triagem de bibliotecas com efluência elevada não é a identificação e todas as proteínas específicas para o câncer, mas em vez disso a identificação de uma família de marcadores de previsão que, como um painel, podem ser utilizados para prever a inclusão de um indivíduo em uma família de câncer de pulmão ou não com um grau de especificidade e sensibilidade máximo. Como tal, a abordagem não visa a geração de um perfil proteômico detalhado ou para identificar em si as proteínas da doença, tais como as proteínas do câncer de pulmão, mas para identificar um número de marcadores que são de previsão da doença e que, quando agregados como um painel, permitem um ensaio de previsão eficaz para uma doença heterogênea em uma população heterogênea. Qualquer marcador pode ou não ter um papel direto na oncogênese do pulmão ou como um peptídeo, e o papel real da molécula a partir da qual o peptídeo se origina pode ser desconhecido no momento.

Medição da ligação do anticorpo a proteínas de captação individuais

As proteínas de captação compiladas em uma microplaqueta diagnóstica podem ser utilizadas para medir a quantidade relativa de anticorpos específicos para o câncer de pulmão em uma amostra de sangue. Isto pode ser realizado utilizando uma variedade de plataformas, diferentes formulações de polipeptídeos (por exemplo, fago expresso, cDNA derivado, biblioteca de peptídeo ou proteína purificada) e permutações estatísticas diferentes que permitem a comparação entre amostras. A comparação irá requerer que as medidas sejam padronizadas, por meio de calibração externa ou normalização interna. Desse modo, no arranjo de lâmina de vidro exemplificado que compreende proteínas de captação expressas por fagos múltiplos (por exemplo, fago M13 e T7) e proteínas de controle externo negativas múltiplas (fagos não ligados a anticorpos em plasmas de pacientes e fagos M13 ou T7 que não têm nenhuma inserção - chamados de fagos "vazios") utilizando um imunoenensaio como dispositivo de triagem, os dados foram normalizados pela etiquetagem fluorescente de duas cores de cápsides de fago e da ligação do anticorpo da amostra de plasma utilizando duas abordagens estatísticas não-limitadoras:

1) Relação de sinal entre cápsides de anticorpo/fago

As proteínas de captação identificadas na triagem, os fagos não-reativos múltiplos mais os fagos "vazios" em microplaquetas de diagnóstico simples são incubados com a(s) amostra(s) utilizando técnicas imunológicas padrão e tingimento de cor dupla. O sinal mediano (ou médio) do anticorpo que se liga à proteína de captação é dividido pelo sinal mediano (ou médio) de um anticorpo comercial contra a proteína de cápside de fago para contar pela quantidade de proteína total na mancha. Desse modo, a relação de sinal entre a cápside de plasma/fago (por exemplo, relação de sinal

Cy5/Cy3) fornece uma medição normalizada do anticorpo humano contra uma proteína expressa por fago original.

As medições podem ser então adicionalmente normalizadas ao subtrair a reatividade do fundo contra o fago vazio e ao dividir pelo número mediano (ou médio) do sinal de fago, $[(\text{Cy5/Cy3 de fago}) - (\text{Cy5/Cy3 de fago})] / (\text{Cy5/Cy3 de fago vazio})$. Esta metodologia é quantitativa, reprodutível e compensa a variabilidade de microplaqueta-a-microplaqueta, permitindo a comparação das amostras.

2) Residual padronizado

As proteínas de captação identificadas na triagem, os fagos não-reativos múltiplos mais os fagos "vazios" em microplaquetas de diagnóstico únicas são incubados com a(s) amostra(s) utilizando técnicas imunológicas padrão e tingimento de cor dupla. A distância de uma linha de regressão estatisticamente determinada é medida, e a seguir padronizada ao dividir essa medida pelo desvio padrão residual. Esta abordagem também fornece uma medida de confiança da quantidade de anticorpo que se liga a cada proteína expressa por fago original em relação à quantidade de proteína em cada ponto, é quantitativa, reprodutível e compensa a variabilidade de microplaqueta-a-microplaqueta, permitindo a comparação das amostras.

Tal normalização de sinal pode ser utilizada com os desconhecidos sendo testados em um ensaio de diagnóstico para determinar se um paciente é positivo ou não para um marcador. O ensaio pode ser baseado em uma determinação qualitativa da presença do anticorpo, por exemplo, qualquer valor normalizado acima da base é considerado como a evidência desse anticorpo. Alternativamente, o ensaio pode ser quantificado pela determinação da força do sinal para um marcador, como uma reflexão do vigor da resposta do anticorpo. Desse modo, o valor normalizado numérico real de

uma reação a um marcador pode ser utilizado na determinação de formulação de diagnóstico do câncer tal como descrito na presente invenção.

Identificação de marcadores de previsão

As medições normalizadas de todas as proteínas expressas por fago candidatas podem ser independentemente analisadas quanto às diferenças estatisticamente significativas entre um grupo de pacientes e um grupo normal, por exemplo, pelo teste T utilizando o software estatístico JMP (SAS, Inc., Cary, NC). Várias combinações de marcadores com níveis diferentes de discriminação independente para as amostras testadas podem ser estatisticamente combinadas em uma variedade de maneiras. O tratamento estatístico compara, de uma forma analítica multivariável, todos os marcadores em várias combinações para obter um painel de marcadores com probabilidade máxima de ser associado com a presença da doença. Tal como em qualquer estatística populacional, a seleção de marcadores é ditada pelo número e tipo de amostras utilizadas.

Como tal, uma "combinação mais favorável de marcadores" pode variar de população à população ou ser com base no estágio da anomalia, por exemplo. Uma combinação mais favorável de marcadores pode ser alterada quando testada em um grande conjunto de amostras (> 1.000) com base na variabilidade que pode não ser aparente em tamanhos de amostra menores (< 100) ou pode não demonstrar o desvio reduzido por causa da validação da prevalência da população do marcador. A regressão logística ponderada é uma abordagem lógica para combinar marcadores com valor de previsão independente maior e menor. Uma combinação mais favorável de marcadores para discriminar as amostras testadas pode ser definida pela organização e análise de dados utilizando as curvas de COR, por exemplo.

Predição de classe

As respostas padronizadas para todas as proteínas expressas por fago candidatas são analisadas independentemente quanto às diferenças estatisticamente significativas entre um grupo de pacientes e um grupo normal, por exemplo, pelo teste T. O tratamento estatístico compara, em uma forma analítica multivariável, todos os marcadores em várias combinações para obter um painel de marcadores com probabilidade máxima de ser associado com a presença de câncer.

Os painéis (medidas combinadas de dois ou mais marcadores) exemplificados na presente invenção para o câncer de pulmão têm um valor de previsão combinado elevado e demonstram discriminação excelente (sim para câncer contra não para câncer). Embora a presente invenção inclua os painéis de peptídeos particulares que foram escolhidos para a capacidade de discriminação entre o câncer disponível e as amostras normais, deve ser apreciado que a invenção tenha sido desenvolvida utilizando alguns, mas não todos os marcadores identificados e não todos os marcadores potencialmente identificáveis ou combinações destes. Desse modo, um painel pode compreender pelo menos dois marcadores; pelo menos três marcadores; pelo menos quatro marcadores; pelo menos cinco marcadores; pelo menos seis marcadores; pelo menos sete marcadores; pelo menos oito marcadores; pelo menos nove marcadores; pelo menos dez marcadores e assim por diante, sendo que o número de marcadores é ditado pela análise estatística para obter a previsibilidade máxima dos resultados. Desse modo, por exemplo, os exemplos e os painéis descritos na presente invenção são apenas exemplos.

De um ponto de vista estatístico, a inclusão de marcadores adicionais irá finalmente conduzir a um teste que identifique todos os indivíduos afetados em uma amostra. No

entanto, uma realização comercial pode não requerer ou necessitar ou precisar de um grande número de marcadores por causa das considerações de custo, os tratamentos estatísticos que podem ser requeridos porque um número maior de variáveis está sendo considerado, talvez a necessidade de um número maior de controles que reduzem desse modo o número de experimentais que podem ser testados de uma vez, e assim por diante. A capacidade de comercialização tem pontos de extremidade diferentes da certeza científica.

No entanto, a observação de que um número maior de marcadores ou um painel diferente de marcadores pode intensificar a sensibilidade e/ou a especificidade conduz a uma realização em que os estudos de acompanhamento subseqüentes a um ensaio positivo com um pequeno número de marcadores terão a amostra do paciente testada com um número menor ou maior de marcadores ou com um painel diferente de marcadores para excluir a possibilidade de um falso positivo. Tais estudos de acompanhamento que utilizam um ensaio de interesse com um painel reconfigurado de biomarcadores são uma alternativa atraente a técnicas mais caras e potencialmente mais invasivas, tal como a TC que expõe o paciente a níveis elevados de radiação ou uma biópsia. Desse modo, por exemplo, um paciente que for positivo para três ou menos de um painel com cinco marcadores pode ser testado com um painel maior de marcadores como um teste confirmatório.

O presente ensaio também pode servir como confirmação de um outro formato de ensaio, tal como um raio X ou uma varredura por TC, particularmente se o raio X ou a varredura por TC não fornece um diagnóstico definitivo, que conduz à necessidade de novo exame, para um acompanhamento rápido, um período prolongado ou encurtado até o teste seguinte, e assim por diante. Desse modo, o presente ensaio pode ser utilizado como um acompanhamento em tais pacientes.

Um teste positivo deve confirmar a probabilidade de câncer de pulmão e um teste negativo deve indicar um câncer benigno ou absolutamente nenhum câncer e o raio X ou a varredura por TC não-diagnóstico deve revelar uma variação de tecido normal.

Uma vez que a predição da classe exata em um ensaio "comercial pronto" será baseada em medições de um grande número de amostras de uma área demográfica ampla, todos os testes de amostras retrospectivas durante o desenvolvimento podem ser finalmente incorporados como classificadores e o poder do ensaio, tal como o valor de previsão, será continuamente aperfeiçoado. Além deste aspecto dinâmico do desenvolvimento do ensaio, a natureza de um ensaio múltiplo (com multimarcadores) permite que os marcadores de previsão sejam adicionados em qualquer ponto no desenvolvimento ou na execução.

No contexto, a validação de marcadores para a utilização no diagnóstico irá servir para a finalidade secundária de gerar um conjunto altamente estável de classificadores que intensificam a exatidão de previsão ao definir uma "faixa normal". O desvio dessa faixa normal irá fornecer uma probabilidade estatística da doença (por exemplo, > 2 desvios padrão da norma) embora os valores de corte que são os mais apropriados para o diagnóstico clínico tenham que ser determinados pela variabilidade em uma determinada população alvo.

Ensaio de marcadores múltiplos e aplicação

Conforme aqui discutido em maiores detalhes, a presente invenção contempla a utilização de formatos de ensaio diferentes. Os microarranjos permitem o teste simultâneo de amostras múltiplas. Desse modo, uma série de amostras de controle, positivo e negativo, pode ser incluída no microarranjo. Desse modo, o ensaio pode ser executado com tratamento simultâneo de amostras plurais, tais como uma

amostra de um paciente e uma amostra com um normal, junto com uma amostra a ser testada. A execução de controles internos permite a normalização, a calibração e a standardização da força do sinal dentro do ensaio.

Desse modo, tal microarranjo, dispositivo de MEMS, dispositivo ou microplaqueta de NEMS com controles internos permite o ponto do diagnóstico de cuidados dos experimentais (pacientes) testados simultaneamente no dispositivo. Os dispositivos de MEMS e de NEMS podem ser utilizados para os ensaios de microarranjo ou podem estar em um formato de "laboratório ou de microplaqueta", tal como a incorporação de elementos microfluídicos, e assim por diante que devem permitir formatos de ensaio adicionais e relatores.

Para intensificar o poder e o valor de previsão, e a aplicabilidade através de populações gerais e para reduzir custos, o presente formato do ensaio pode variar de imunoenaios padrão, tais como imunoenaios de vareta e de fluxo lateral, que detectam geralmente um alvo ou um número pequeno de alvos simultaneamente a um baixo custo de manufatura, a formatos do tipo ELISA que são freqüentemente configurados para operar em um prato de cultura com cavidades múltiplas que pode processar, por exemplo, 96, 384 ou mais amostras simultaneamente e são comuns em ambientes de laboratórios clínicos e são receptivos à automatização, para formatos de arranjo e de microarranjo em que muito mais amostras são testadas simultaneamente de uma maneira com efluência elevada. O ensaio também pode ser configurado para resultar em uma discriminação simples, qualitativa (sim para câncer contra não para câncer).

Mas aplicações diferentes múltiplas no controle de doenças são possíveis, e os marcadores originais para qualquer aplicação podem ser feitos conforme mostrado na presente invenção. Conjuntos diferentes de marcadores são

obtidos para distinguir o câncer de pulmão de outros tipos de câncer, para distinguir o câncer em estágio precoce do câncer em estágio avançado, para distinguir subtipos específicos de câncer e para seguir a progressão da doença após a intervenção terapêutica. Desse modo, um regime de tratamento pode ser avaliado e manipulado conforme necessário por meio de testes em série repetidos com o presente ensaio para monitorar o progresso ou a remissão do tratamento. Uma versão quantitativa do ensaio, por exemplo, contendo uma diluição em série de moléculas de captação, pode discriminar a diminuição do tamanho do câncer com o tratamento.

Uma vez que os epítomos particulares, tais como os peptídeos, são identificados para a detecção do autoanticorpo circulante, os epítomos particulares podem ser utilizados em ensaios diagnósticos, nos formatos conhecidos no estado da técnica. Uma vez que a interação é uma imunoreação, um diagnóstico apropriado pode ser apresentado em qualquer uma de uma variedade de formatos de imunoenaios conhecidos. Desse modo, um epítomo pode ser afixado a uma fase sólida, por exemplo, utilizando químicas conhecidas.

Além disso, os epítomos podem ser conjugados a uma outra molécula, frequentemente maior do que o epítomo para formar uma molécula conjugada sintética, ou podem ser feitos como uma molécula composta utilizando métodos recombinantes, conforme conhecido no estado da técnica. Muitos polipeptídeos se ligam naturalmente às superfícies de plástico, tais como as superfícies de polietileno, que podem ser encontradas em dispositivos de cultura de tecido, tais como placas de cavidades múltiplas. Frequentemente, tais superfícies de plástico são tratadas para intensificar a ligação de moléculas biologicamente compatíveis a estas. Desse modo, os polipeptídeos formam um elemento de captação, um líquido suspeito de conter um autoanticorpo que se liga

especificamente àquele epítopo que é exposto ao elemento de captação, o anticorpo se torna afixado e imobilizado ao elemento de captação e então, depois de uma lavagem, o anticorpo ligado é detectado utilizando uma molécula relatora detectavelmente etiquetada apropriada, tal como um anticorpo anti-humano etiquetado com um metal coloidal, tal como o ouro coloidal, um fluorocromo, tal como a fluoresceína, e assim por diante. Esse mecanismo é representado, por exemplo, por ELISA, RIA, transferência Western, e assim por diante. O formato particular do imunoensaio para detectar o autoanticorpo é uma escolha do projeto.

Alternativamente, uma vez que o fago particular expressa um epítopo ligado especificamente pelos autoanticorpos verificados nos pacientes com câncer de pulmão (cujos clones são especificamente nomeados e armazenados como estoques e se tornarão disponíveis a pedido quando uma patente emergir do presente pedido de patente), o elemento de captação de um ensaio pode ser o fago individual, tal como obtido a partir de um lisato de célula, cada um em um sítio de captação em uma fase sólida. Além disso, um carreador reativamente inerte, tal como uma proteína, tal como a albumina e hemocianina de lapa, ou um portador sintético, tal como um polímero sintético, ao qual o epítopo expresso é unido, similar a um hapteno em um portador, ou qualquer outro dispositivo para apresentar um epítopo de interesse na fase sólida para um imunoensaio pode ser utilizado.

Alternativamente, um formato pode assumir a configuração em que um elemento de captação afixado a uma fase sólida é aquele que se liga às porções de ligação ao não-antígeno da imunoglobulina, tais como a porção F_c do anticorpo. Conseqüentemente, um elemento de captação apropriado pode ser a Proteína A, a Proteína G e/ou um anticorpo α - F_c . O plasma do paciente é exposto ao reagente de

captação e a então a presença do anticorpo específico para o câncer de pulmão é detectada utilizando, por exemplo, o marcador etiquetado em um formato direto ou de competição, conforme conhecido no estado da técnica.

Similarmente, o elemento de captação pode ser um anticorpo que se liga ao fago que exhibe o epítipo para formar um outro dispositivo para produzir um reagente de captação específico, tal como discutido acima.

Conforme conhecido na técnica de imunoensaio, o elemento de captação é um determinante ao qual um anticorpo se liga. Conforme mostrado na presente invenção, o determinante pode ser qualquer molécula, tal como uma molécula biológica ou porção desta, tal como um polipeptídeo, um polinucleotídeo, um lipídeo, um polissacarídeo, e assim por diante, e as combinações destes, tais como uma glicoproteína ou lipoproteína, cuja presença se correlaciona com a presença de um anticorpo encontrado em pacientes com câncer de pulmão. O determinante pode ser natural e purificado, por exemplo. Alternativamente, o determinante pode ser produzido por meio de um dispositivo recombinante ou pode ser produzido sinteticamente, o que pode minimizar a reatividade cruzada. O determinante pode não ter nenhuma função biológica aparente ou pode não estar necessariamente associado com um estado particular; no entanto, isto não diminui a utilização deste em um ensaio de diagnóstico de interesse.

A fase sólida de um imunoensaio pode ser qualquer uma daquelas conhecidas no estado da técnica, e nas formas conhecidas no estado da técnica. Desse modo, a fase sólida pode ser um plástico, tal como o poliestireno ou o polipropileno, um vidro, uma estrutura baseada em sílica, tal como uma microplaqueta de silicone, uma membrana, tal como o náilon, um papel, e assim por diante. A fase sólida pode ser

apresentada em uma série de formatos diferentes e conhecidos, tal como o formato de papel, em grânulos, como parte de um dispositivo de vareta ou de fluxo lateral, os quais empregam geralmente membranas, uma placa de microtitulação, uma lâmina, uma microplaqueta, e assim por diante. A fase sólida pode se apresentar como uma superfície planar rígida, tal como encontrado em uma lâmina de vidro ou em uma microplaqueta. Alguns dispositivos detectores automatizados têm materiais descartáveis dedicados associados com um dispositivo para a leitura do sinal detectável, por exemplo, um espectrofotômetro, contador de cintilação líquida, colorímetro, fluorômetro, e outros ainda, para detectar e ler um sinal com base em fótons.

Outros imunoreagentes para detectar o anticorpo ligado são conhecidos no estado da técnica. Por exemplo, um anticorpo de Ig anti-humano deve ser apropriado para formar um sanduíche que compreende o determinante de captação, o autoanticorpo e o anticorpo de Ig anti-humano. O anticorpo de Ig anti-humano, o elemento detector, pode ser diretamente etiquetado com uma molécula relatora, tal como uma enzima, um metal coloidal, radionuclídeo, uma tintura e assim por diante ou pode ele próprio ser ligado por uma molécula secundária que serve à função relatora. Essencialmente, qualquer dispositivo para detectar o anticorpo ligado pode ser utilizado e tal dispositivo pode conter qualquer dispositivo para que uma função de relatório resulte em um sinal discernível pelo operador. A etiquetagem das moléculas para formar uma relatora é conhecida no estado da técnica.

No contexto de um dispositivo que permite a análise simultânea de uma gama de amostras, de uma série de elementos de controle, controles positivos e negativos podem ser incluídos no dispositivo de ensaio para permitir o controle para o desempenho do ensaio, o desempenho do reagente, a

especificidade e a sensibilidade. Freqüentemente, tal como mencionado, muitas, se não todas as etapas de elaboração do dispositivo de interesse e muitas das etapas do ensaio podem ser executadas por um dispositivo mecânico, tal como um robô, para minimizar erros técnicos. Além disso, os dados de tais dispositivos podem ser digitalizados por um dispositivo de escaneamento, as informações digitais são comunicadas a um dispositivo de armazenamento de dados e os dados também são comunicados a um dispositivo de processamento de dados, onde o tipo de análise estatística discutida na presente invenção, ou tal como conhecido no estado da técnica, pode ser efetuado nos dados para produzir uma medida do resultado, que pode ser então comparado a uma referência padrão ou pode ser internamente comparado ao presente com um resultado de ensaio por meio de um dispositivo de apresentação de dados, tal como uma tela ou leitura de informações, para fornecer as informações sobre o diagnóstico.

Para os dispositivos que analisam um número menor de amostras ou onde dados suficientes de uma população estão disponíveis, uma métrica derivada para o que constitui um resultado positivo e um resultado negativo, com medições de erro apropriadas, pode ser provida. Nesses casos, um controle positivo único e um controle negativo único podem ser tudo o que é necessário para a validação interna, tal como conhecido no estado da técnica. O dispositivo de ensaio pode ser configurado para resultar em um resultado mais qualitativo, incluído ou não em um grupo de câncer de pulmão, por exemplo.

Outros formatos de imunensaio automatizados e/ou com efluência elevada podem ser utilizados, tal como conhecido e disponível no estado da técnica. Desse modo, por exemplo, um ensaio com base em grânulos, baseado, por exemplo, em sinais colorimétricos, fluorescentes ou luminescentes, pode ser utilizado, tal como a tecnologia

Luminex (Austin, TX) que se baseia em microesferas preenchidas com tinta, e o sistema Cytometric Bead Array BD (Franklin Lakes, NJ). Em um caso ou em outro, os epítomos de interesse são afixados a um grânulo.

Um outro ensaio multiplex é o método de arranjos em camadas de Gannot et al., *J. Mol. Diagnostics* 7, 427-436, 2005. O método se baseia na utilização de membranas múltiplas, sendo que cada uma delas carrega um par diferente de um par de ligação, tal como uma molécula alvo, tal como um antígeno ou um marcador, as membranas configuradas no registro para aceitar uma amostra que é suspeita de carregar o outro do par de ligação, para transferência cromatográfica no registro. A amostra é levada a penetrar ou é transportada através de uma série de membranas alinhadas para formar uma matriz tridimensional. Desse modo, por exemplo, um número de membranas pode ser empilhado sobre um gel de separação e o conteúdo do gel é levado a sair do gel de separação e passar através das membranas empilhadas. Qualquer associação de moléculas entre aquela afixada a qualquer membrana e aquela transportada através da pilha da membrana, tal como um antígeno ligado a um anticorpo, pode ser visualizada utilizando os materiais e métodos relatores e de detecção conhecidos, vide, por exemplo, as Patentes U.S. N°. 6.602.661 e 6.969.615; bem como as Publicações de Patentes Norte-americanas N°. 20050255473 e 20040081987.

Em outras realizações, uma composição ou um dispositivo de interesse podem ser utilizados para detectar classes diferentes de moléculas associadas ou correlacionadas com o câncer de pulmão. Desse modo, um ensaio pode detectar o autoanticorpo circulante e as moléculas de não-anticorpo associadas ou correlacionadas com o câncer de pulmão, tal como um antígeno do câncer de pulmão, vide, por exemplo, Weynants et al., *Eur. Respir. J.*, 10:1703-1719, 1997 e Hirsch

et al., *Eur. Respir. J.*, 19:1151-1158, 2002. Conseqüentemente, um dispositivo pode conter, como elementos de captação, epítomos para autoanticorpos e moléculas de ligação para moléculas do câncer de pulmão, tais como anticorpos específicos, aptâmeros, ligantes, e assim por diante.

Exemplificação de Amostras e Testes

Amostras receptivas a testes, particularmente em ensaios de triagem são geralmente aquelas que podem ser facilmente obtidas de um paciente, e talvez de uma maneira não-intrusiva ou minimamente invasiva. A amostra também é conhecida por conter um autoanticorpo. Uma amostra de sangue é uma amostra apropriada e é facilmente receptiva à maioria de formatos de imunoensaio.

No contexto de uma amostra de sangue, há muitos tubos de coleta de sangue conhecidos, sendo que muitos coletam 5 ou 10 ml de fluido. Similarmente aos exames de sangue diagnósticos mais geralmente requisitados, 5 ml de sangue são coletados, mas o presente ensaio que é operado como um microarranjo pode provavelmente requerer menos de 1 ml de sangue. O recipiente de coleta de sangue pode conter um anticoagulante, tal como a heparina, citrato ou EDTA. Os elementos celulares são separados, geralmente por centrifugação, por exemplo, a 1.000 x g (RCF) por dez minutos a 4°C (resultando em ~40% de plasma para análise) e podem ser armazenados, geralmente à temperatura de refrigerador ou a 4°C até sua utilização. As amostras de plasma são preferivelmente testadas dentro de três dias da coleta ou são armazenadas congeladas, por exemplo, a -20°C. A amostra em excesso é armazenada a -20°C (em um refrigerador que não precisa ser descongelado para evitar o descongelamento da amostra) por até duas semanas para a análise repetida conforme necessário. A armazenagem por períodos mais longos

do que duas semanas deve ser feita a -80°C . Os métodos de manipulação e de armazenagem padrão para preservar a estrutura do anticorpo e a função tal como conhecido no estado da técnica são praticados.

As amostras de fluido são então aplicadas a uma composição de teste, tal como um microarranjo que contém os sítios carregados, por exemplo, com amostras de polipeptídeos purificados de um dos painéis com cinco marcadores discutidos na presente invenção, juntamente com as amostras positivas e negativas apropriadas. As amostras podem ser fornecidas em quantidades classificadas, tal como uma diluição em série, para permitir a quantificação. As amostras podem ser aleatoriamente localizadas no microarranjo para acessar todos os efeitos posicionais. Depois da incubação, o microarranjo é então lavado e exposto a um detector, tal como um anticorpo anti-humano que é etiquetado com um marcador particular. Para permitir a normalização do sinal, um segundo detector pode ser adicionado ao microarranjo para fornecer uma medida da amostra em cada sítio, por exemplo. Este poderia ser um anticorpo dirigido a um outro sítio nas amostras de polipeptídeo isoladas, o polipeptídeo pode ser modificado para conter seqüências adicionais ou uma molécula que seja inerte à reação específica ou os polipeptídeos podem ser modificados para conter um relator antes da adição no microarranjo. O microarranjo é lavado outra vez e então, caso necessário, é exposto a um reagente para permitir a detecção do relator. Desse modo, se o relator compreender partículas coloridas, tais como sóis de metal, nenhum dispositivo de detecção particular é necessário. Se as moléculas fluorescentes forem utilizadas, a luz incidente apropriada será utilizada. Se enzimas forem utilizadas, o microarranjo será exposto a substratos apropriados. O microarranjo é então avaliado quanto ao produto da reação ligado aos sítios.

Embora esta possa ser uma avaliação visual, há dispositivos que irão detectar e, caso necessário, quantificar a força do sinal. Esses dados são então interpretados para fornecer informações sobre a validade da reação, por exemplo, observando as amostras de controle positivas e negativas, e, se válidas, as amostras experimentais são avaliadas. Essas informações são então interpretadas quanto à presença de câncer. Por exemplo, se o paciente for positivo para três ou mais dos anticorpos, o paciente é diagnosticado como positivo para o câncer de pulmão. Alternativamente, as informações sobre os marcadores podem ser aplicadas à fórmula que descreve a relação de probabilidade máxima dos cinco marcadores junto ao resultado, presença de câncer de pulmão e, se o indício de uma contagem do paciente for maior do que 50% do valor dessa mesma contagem do painel, o paciente é diagnosticado como positivo para o câncer. Uma contagem apropriada pode ser dos valores da ASC calculados.

Utilização do Kit e do Ensaio

O exame de sangue de acordo com a presente invenção tem utilizações e aplicações múltiplas, embora o diagnóstico precoce ou o aviso precoce para o acompanhamento subsequente sejam muito fortes para seu impacto potencial sobre os resultados da doença. A invenção pode ser empregada como uma ferramenta para complementar a triagem radiográfica para o câncer de pulmão. A triagem em série por TC é geralmente sensível ao câncer de pulmão, mas tende a ser completamente cara e não-específica (64% relataram especificidade). Desse modo, a TC resulta em um número elevado de falsos positivos, quase quatro em dez. A identificação rotineira de nódulos pulmonares indeterminados durante a geração de imagens radiográficas conduz normalmente a um exame minucioso caro e intervenção potencialmente prejudicial, incluindo cirurgia de grande porte. Atualmente, a idade e o histórico de tabagismo

são os únicos dois fatores de risco que têm sido utilizados como critérios de seleção por estudos de triagem amplos para o câncer de pulmão.

A utilização do exame de sangue de acordo com a presente invenção para detectar radiograficamente os cânceres evidentes (> 0,5 cm) e/ou os cânceres ocultos ou pré-malignos (abaixo do limite da detecção radiográfica convencional) deve definir os indivíduos para os quais a triagem adicional é mais garantida. Desse modo, o presente ensaio pode servir como teste de triagem preliminar, em que um resultado positivo é a indicação para um exame adicional, tal como é convencional e conhecido no estado da técnica, tal como a análise radiográfica, tal como uma TC, PET, radiografia, e outros ainda. Além disso, o reexame periódico pode identificar o CPCNP emergente.

Um exemplo de como o teste em questão pode ser incorporado em uma prática médica deve ser onde os fumantes com risco elevado (por exemplo, as pessoas que fumaram o equivalente a um maço por dia por vinte anos ou mais) podem se submeter ao exame de sangue em questão como parte de um exame anual. Um resultado negativo sem nenhum sintoma aparente adicional poderia indicar um teste adicional pelo menos anualmente. Se o resultado do teste fosse positivo, o paciente deveria se submeter a um teste adicional, tal como uma repetição do presente ensaio e/ou uma varredura por TC ou raio X, para identificar possíveis tumores. Se nenhum tumor estivesse aparente na varredura por TC ou raio X, talvez o presente ensaio pudesse ser repetido uma vez ou duas vezes ao ano e múltiplas vezes nos anos seguintes até que o tumor tivesse pelo menos 0,5 mm de diâmetro e pudesse ser detectado e removido cirurgicamente.

Conforme indicado nos Exemplos a seguir, a sensibilidade de ~90% do perfil do autoanticorpo para o CPCNP

que utiliza os painéis com cinco marcadores exemplificados tem uma comparação bastante favorável àquela pela varredura por TC sozinha, e pela comparação pode ser executada especialmente bem para tumores pequenos e representa um avanço sem paralelo na detecção da doença oculta. Além disso, uma especificidade maior do que de 80% do presente ensaio excede aquela da varredura por TC, que se torna cada vez mais importante à medida que a porcentagem de nódulos pulmonares benignos aumenta na população em risco, subindo para níveis de aproximadamente 70% dos participantes na Experimentação de Triagem da Clínica Mayo, por exemplo.

Além da utilização na triagem, o ensaio e o método da presente invenção também podem ser úteis com relação ao problema clínico intimamente relacionado de distinção de nódulos benignos e malignos identificados na varredura por TC. O nódulo pulmonar solitário (NPS) é definido como uma lesão única esférica menor do que 3 cm de diâmetro que é completamente circundado por tecido pulmonar normal. Embora a prevalência relatada de malignidade em NPSs varie de aproximadamente 10% a aproximadamente 70%, os estudos mais recentes que utilizam a definição moderna de NPS revelam a prevalência de malignidade como sendo de aproximadamente 40% a aproximadamente 60%. A maioria das lesões benignas é o resultado de granulomas, sendo que a maioria das lesões malignas são o câncer de pulmão primário. A avaliação diagnóstica inicial de um NPS é feita com base na avaliação dos fatores de risco para a malignidade tal como a idade, o histórico de tabagismo, o histórico prévio de malignidade e as características radiográficas do tórax do nódulo tais como o tamanho, a calcificação, a borda (espiculada ou lisa) e o padrão de crescimento com base na avaliação de raios X do tórax antigos. Estes fatores são então utilizados para determinar a probabilidade de malignidade e guiar um controle

para o paciente adicional.

Após uma avaliação inicial, muitos nódulos serão classificados como tendo uma probabilidade intermediária de malignidade (25-75%). Os pacientes neste grupo podem se beneficiar do teste adicional com o presente ensaio antes de prosseguir com a biópsia ou a cirurgia. A varredura em série que avalia o crescimento ou a geração de imagens metabólicas (por exemplo, a varredura por tomografia de emissão positrônica) são as únicas opções não-invasivas atualmente disponíveis e distantes de serem ideais. A análise radiográfica em série é baseada nas medições do crescimento, requerendo que uma lesão não demonstre nenhum crescimento durante um período de tempo de dois anos; um intervalo ideal entre as varreduras não foi determinado embora as varreduras por TC a cada três meses por dois anos sejam uma avaliação longitudinal convencional. A varredura por tomografia de emissão positrônica tem 90-95% de especificidade para o câncer de pulmão e 80-85% de sensibilidade.

Estes valores de previsão podem variar com base na prevalência regional da doença granulomatosa benigna (por exemplo, a histoplasmose).

As varreduras por tomografia de emissão positrônica custam atualmente entre \$2000 e \$4000 por teste. O diagnóstico resulta de procedimentos não-cirúrgicos tais como a biópsia com agulha transtorácica (BATT) ou broncoscopia de 40% a 95%. O controle subsequente no caso de um procedimento não-diagnóstico pode ser problemático. A intervenção cirúrgica é freqüentemente perseguida como a opção mais viável com ou sem outro exame minucioso de diagnóstico. A escolha irá depender do risco do teste preliminar de malignidade ser baixo ou elevado, da disponibilidade do teste em uma instituição particular, das características do nódulo (por exemplo, o tamanho e a posição), do risco cirúrgico do

paciente e da preferência do paciente. O histórico precedente de outra malignidade extratorácica sugere imediatamente a possibilidade de câncer metastático do pulmão, e a relevância do teste não-invasivo torna-se insignificante. No cenário clínico confuso do NPS com suspeita clínica indeterminada para o câncer de pulmão, os marcadores de tumor circulantes poderiam ajudar a evitar exames minuciosos diagnósticos invasivos potencialmente prejudiciais e, por outro lado, apóiam o fundamento para a intervenção cirúrgica agressiva.

A invenção descrita intensifica desse modo o conforto clínico de eleger as imagens em série de um nódulo em vez do diagnóstico invasivo. A invenção também terá uma influência no intervalo para o raio X em série ou a varredura por TC, abaixando desse modo os custos clínicos para os cuidados com a saúde. A invenção descrita irá complementar ou suplantará a varredura por tomografia de emissão positrônica como um método de baixo custo para aumentar adicionalmente a probabilidade de que o câncer de pulmão esteja presente ou ausente.

A invenção será útil na avaliação da recorrência da doença após a intervenção terapêutica. Os exames de sangue para o câncer de cólon e de próstata são empregados geralmente nesta capacidade, onde os níveis do marcador são seguidos como um indicador de tratamento bem-sucedido ou falho e onde os níveis crescentes do marcador indicam a necessidade de uma avaliação diagnóstica adicional para a recorrência que conduz à intervenção terapêutica.

A invenção irá fornecer informações importantes sobre as características do tumor; a determinação dos subtipos do tumor com fraco prognóstico poderia significativamente impactar em uma decisão clínica para recomendar terapias adicionais com toxicidade potencial, uma vez que o ensaio confia em marcadores múltiplos, sendo que

qualquer um pode ser característico de um câncer particular ou um parâmetro original deste. O desenvolvimento de tratamentos mais novos utilizados para a consolidação a longo prazo da cirurgia ou da quimioterapia convencional pode requerer uma análise de custo/benefício cuidadosa e a seleção do paciente.

Desse modo, o presente ensaio será uma ferramenta valiosa para a triagem, a escolha do tratamento e a utilização continuada durante o tratamento para monitorar o curso do tratamento, o sucesso do tratamento, a reincidência, a cura, e assim por diante. Os reagentes do presente ensaio e o painel de marcadores particular podem ser manipulados para servir à finalidade particular. Por exemplo, em um ensaio de triagem, um painel de marcadores maior ou um painel de marcadores muito prevalente são utilizados para maximizar o poder de previsão para um número maior de indivíduos.

No entanto, no contexto de um indivíduo que é submetido ao tratamento, por exemplo, a marca digital particular do anticorpo do tumor do paciente pode ser obtida, o que pode ou não requerer todos os marcadores utilizados para a triagem, e esse subconjunto particularizado de marcadores pode ser utilizado para monitorar a presença de tumor nesse paciente e a intervenção terapêutica subsequente.

Os componentes de um ensaio de interesse podem ser configurados em uma série de formatos diferentes para a distribuição, e outros ainda. Desse modo, um ou mais epítomos podem ser aliquotados e armazenados em um ou mais recipientes, tais como frascos de vidro, tubos de centrifugador, e outros ainda. A solução do epítopo pode conter tampões apropriados, e outros ainda, incluindo conservantes, agentes antimicrobianos, estabilizantes, e outros ainda, tal como conhecido no estado da técnica. O epítopo pode estar na forma preservada, tal como dessecado,

congelado a seco, e assim por diante. Os epítomos podem ser colocados em uma fase sólida apropriada para a utilização em um ensaio particular. Desse modo, os epítomos podem ser colocados e secados, nas cavidades de uma placa de cultura, tingidos em uma membrana em um dispositivo de imunoensaio de arranjo em camadas ou de fluxo lateral, tingidos em uma lâmina ou outro suporte para um microarranjo, e assim por diante. Os artigos podem ser empacotados conforme conhecido no estado da técnica para assegurar a vida útil máxima, como com um envoltório de película plástica ou um envoltório opaco e encaixotado. O recipiente do ensaio também pode conter amostras de controle positivas e negativas, cada uma em um recipiente, as quais incluem, quando uma amostra é um líquido, um recipiente com um conta-gotas ou que tem um tampão que permite a queda das gotas, dispositivos para coleta de amostras, outros dispositivos para transferência de líquidos, reagentes detectores, reagentes em desenvolvimento, tais como os reagentes de tingimento de prata e substrato de enzimas, uma solução ácida/básica, a água, e assim por diante. As instruções apropriadas para a utilização podem ser incluídas.

Em outros formatos, tais como com a utilização de um ensaio com base em grânulos, os epítomos plurais podem ser afixados a populações diferentes de grânulos, os quais podem ser então combinados em um único reagente, prontos para serem expostos a uma amostra do paciente.

A invenção será agora exemplificada nos seguintes exemplos não-limitadores, cujos dados foram relatados em Zhong et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 172:1308-1314, 2005 e Zhong et al., *J. Thoracic Oncol.*, 1:513-519, 2006, cujo conteúdo é incorporado a título de referência na presente invenção, em sua totalidade.

EXEMPLOS

Exemplo 1 - Ensaio de Diagnóstico do CPCNP

Neste Exemplo, a identificação dos marcadores para diagnosticar o estágio mais avançado (II, III e IV) do CPCNP foi feita. Duas bibliotecas de CPCNP de fago T7 foram biopeneiradas com pacientes com CPCNP e plasma normal para enriquecer uma população de clones imunogênicos que expressam os polipeptídeos reconhecidos pelo anticorpo circulante nos pacientes com CPCNP.

Uma biblioteca de cDNA de CPCNP de fago T7 foi adquirida (Novagen, Madison, WI, EUA) e uma segunda biblioteca foi construída a partir da linhagem de células de adenocarcinoma NCI 1650 utilizando os sistemas OrientExpress cDNA Synthesis and Cloning da Novagen. As bibliotecas foram biopeneiradas com plasma agrupado de cinco pacientes com CPCNP (estágios 2-4; diagnóstico confirmado por histologia) e de doadores saudáveis normais, para enriquecer a população das proteínas expressas por fago reconhecidas por anticorpos associados com o tumor. Resumidamente, a biblioteca de exibição de fago foi selecionada por afinidade pela incubação com os grânulos de agarose da proteína G revestidos com os anticorpos de soros normais agrupados (250 µl de soros normais agrupados, diluídos 1:20, a 4°C o/n) para remover as proteínas específicas de não-tumor. O fago não-ligado foi separado do fago ligado aos anticorpos no plasma normal por meio de centrifugação. O sobrenadante foi então biopeneirado contra os grânulos de agarose da proteína G revestidos com o plasma do paciente agrupado (4°C o/n) e separados do fago não-ligado por meio de centrifugação.

O fago ligado/reactivo foi eluído com 1% de SDS e foi então coletado por meio de centrifugação. O fago foi amplificado em *E. coli* NLY5615 (Gibco BRL Grand Island, NY) na presença de 1 mM de IPTG e 50 µg/ml de carbenicilina até a lise. Os lisatos amplificados que contêm fago foram coletados

e submetidos a três ciclos seqüenciais adicionais de enriquecimento de biocrivo. Os lisatos que contêm fago do quarto biocrivo foram amplificados, os clones de fago individuais foram isolados e então incorporados em arranjos de proteína conforme descrito abaixo.

Construção de arranjo e triagem com efluência elevada

Os lisatos de fago do quarto ciclo de biopeneiração foram amplificados e cresceram em placas de LB-ágar cobertas com 6% de agarose para isolar o fago individual. Um robô de colheita de colônia (Genetic QPix 2, Hampshire, Reino Unido) foi utilizado para isolar 4.000 colônias individuais (2.000/biblioteca). O fago escolhido foi amplificado nas placas com 96 cavidades, a seguir 5 nl do lisato transparente de cada cavidade foram tingidos roboticamente em duplicata nas lâminas FAST (Schleicher e Schuell, Keene, NH) utilizando um Affymetrix 417 Arrayer (Affymetrix, Santa Clara, CA).

O fago 4.000 foi então selecionado com os cinco plasmas de pacientes individuais com CPCNP não utilizados no biocrivo para identificar o fago imunogênico. O anticorpo primário de coelho anti-T7 (Jackson Immuno-Research, West Grove, PA) foi utilizado para detectar as proteínas de cápside T7 como um controle para uma quantidade de fago. As amostras do plasma pré-absorvido (plasma:lisato bacteriano, 1:30) e os anticorpos anti-T7 foram diluídos 1:3.000 com 1 X TBS mais 0,1% de Tween 20 (TBST) e incubados com as lâminas de triagem por uma hora à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas e então sondadas com os anticorpos secundários anti-coelho etiquetados por Cy3 e anti-humano etiquetado por Cy5 (Jackson ImmunoResearch; 1:4.000 cada anticorpo em 1 X TBST) juntos por uma hora à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas outra vez e foram então varridas utilizando um scanner Affymetrix 428. As imagens foram analisadas utilizando o software GenePix 5.0 (Axon Instruments, Union

City, CA). O fago que contém uma relação de sinal entre Cy5/Cy3 maior do que dois desvios padrão de uma regressão linear foi selecionado como candidato para a utilização em uma "microplaqueta de diagnóstico".

Projeto de microplaqueta de diagnóstico e medição do anticorpo

Duzentos e doze fagos imunorreativos identificados na triagem com efluência elevada acima mais cento e vinte fagos T7 "vazios" foram combinados, re-amplificados e manchados em duplicata em lâminas FAST como microplaquetas de diagnóstico únicas. As microplaquetas de réplica foram utilizadas para testar quarenta amostras de CPCNP em estágio avançado utilizando o protocolo descrito para triagem acima. O número médio do sinal Cy5 foi normalizado para o número médio do sinal Cy3 (relação de sinal entre Cy5/Cy3) como a medição do anticorpo humano contra uma proteína expressa por fago original. Para compensar a variabilidade de microplaqueta-a-microplaqueta, as medições foram adicionalmente normalizadas ao subtrair a reatividade do fundo do plasma contra as proteínas de fago T7 vazias e ao dividir o número médio do sinal T7 $[(\text{Cy5/Cy3 de fago}) - (\text{Cy5/Cy3 de T7}) / (\text{Cy5/Cy3 de T7})]$.

O teste T-student de sinal normalizado de 40 pacientes (estágios II-IV) e 41 normais forneceram um corte estatístico ($p < 0,01$) que sugeriu o valor de previsão relativo de cada marcador candidato. Dos 212 candidatos, 17 atenderam a esse critério de corte ($p = 0,00003$ a $p = 0,01$).

A redundância dentro do grupo foi avaliada por PCR e a análise de seqüência revelou diversos clones em duplicata e em triplicata. Quando clones redundantes foram eliminados, um conjunto de sete proteínas expressas por fago foi identificado.

Análise estatística

A análise de regressão logística foi executada para prever a probabilidade que uma amostra era de um paciente com CPCNP. Um total de 81 pacientes e amostras normais foi dividido em dois grupos. Os pacientes foram diagnosticados com CPCNP nos Estágios II-IV. O primeiro grupo consistiu em 21 amostras normais e 20 amostras de plasma de pacientes escolhidas aleatoriamente que foram utilizadas como um conjunto de treinamento para identificar os marcadores que eram distintos entre as amostras de pacientes e as amostras normais utilizando marcadores individuais ou uma combinação de marcadores. O segundo grupo que consiste em 20 amostras de pacientes e 20 normais foi utilizado para validar a taxa de predição dos marcadores identificados utilizando o grupo de treinamento. As curvas características operantes receptoras (COR) foram geradas para comparar a sensibilidade e especificidade de previsão com marcadores diferentes e a área sob a curva (ASC) foi determinada. Os classificadores foram adicionalmente examinados utilizando a validação cruzada com a exclusão de um. O histórico de tabagismo e o estágio da doença também foram analisados e comparados.

Os dois grupos foram então invertidos e o grupo de 40 se transformou no grupo de treinamento para identificar os marcadores que eram indicativos da presença de CPCNP. Os marcadores identificados dessa maneira como pela provisão do poder de previsão máximo foram então utilizados para diagnosticar o CPCNP no outro grupo de 41 amostras.

Tabela 5 - Áreas sob as curvas de COR e precisão de previsão

Clone de Fago	Conjunto de Treinamento*			Conjunto de Validação ^t	
	ASC ^s	Especificidade, %	Sensibilidade, %	Especificidade, %	Sensibilidade, %
1864	0,857	75	81	65	85
1896	0,857	70	86	70	75
1919	0,824	75	81	70	90
1761	0,798	70	81	70	85
1747	0,864	70	86	70	80
5 Combinado	0,983	92	95	90	95

* O Conjunto de Treinamento consistiu em 21 amostras normais e 20 amostras de pacientes com CPCNP.

^t O Conjunto de Validação consistiu em 20 amostras normais e 20 amostras de pacientes com CPCNP.

^s ASC: área sob a curva de COR.

Tabela 6 - Validação com a exclusão de um*

Clone de Fago	Especificidade, %	Sensibilidade, %	Precisão de Diagnóstico ^t , %
1864	70	82,9	76,5
1896	70	82,9	75,3
1919	70	82,9	76,5
1761	60	82,9	71,6
1747	72,5	82,9	77,8
5 Combinado	87,5	90,2	88,9

* Validação com a exclusão de um: uma amostra foi removida do conjunto de teste que contém um total de 81 amostras, um classificador foi gerado para prever o status (normal ou paciente) da amostra removida utilizando o restante das amostras. Este procedimento foi repetido para todas as amostras.

^t Precisão de diagnóstico = (o número positivo verdadeiro + o número de negativo verdadeiro)/número total das amostras.

Análise de seqüência das proteínas expressas por fago

Os 17 fagos que foram escolhidos para o valor de previsão suposto utilizando o teste T e o valor de $p < 0,01$ foram arranjados em seqüência para identificar a redundância, que revelou sete seqüências originais. Embora a identidade das proteínas expressas por fago não fosse essencial para a utilização em um ensaio de diagnóstico de interesse, as seqüências foram comparadas àquelas obtidas nos estudos precedentes que utilizaram uma metodologia de triagem diferente (independente) e também comparadas com o banco de dados GenBank para obter uma identidade possível. As seqüências de nucleotídeo obtidas dos sete clones mostraram homologia a GAGE 7, NOPP140, EEFIA, PMS2L15, SEC15L2,

paxilina e clone de BAC RP11-499F19.

Das sete proteínas, EEF 1 A (o fator de alongamento de tradução eucariótico 1), um componente do núcleo da maquinaria de síntese da proteína, e GAGE7, um antígeno de câncer de testículo, são superexpressas em alguns cânceres de pulmão. A paxilina é uma proteína de aderência focal que regula a aderência e a migração da célula. A expressão aberrante e a atividade anômala da paxilina foram associadas com um fenótipo metastático agressivo em algumas malignidades incluindo o câncer de pulmão. PMS2L é uma proteína relacionada ao reparo de incompatibilidade do DNA, mas ainda nenhuma mutação foi identificada no câncer. Similarmente, SEC15L2, uma proteína de tráfego intracelular, e NOPP140, uma proteína nucleolar envolvida na regulação da atividade do transcricional, não têm associação maligna conhecida. A função fisiológica dessas três proteínas, no entanto, sugere que cada uma poderia ter um papel no fenótipo maligno.

Modelagem estatística e exatidão da predição do ensaio

Para desenvolver classificadores utilizando as sete proteínas expressas por fago originais para taxas de previsão mais elevadas, as 81 amostras foram divididas aleatoriamente em dois grupos, um foi utilizado para finalidades de treinamento e o outro para a validação. A regressão logística foi utilizada para calcular a sensibilidade e a especificidade para a exatidão de previsão utilizando proteínas expressas por fago individuais bem como uma combinação de marcadores expressos por fago múltiplos. Os resultados mostram que cinco marcadores de fago tiveram capacidade significativa de distinguir amostras de pacientes dos controles normais no conjunto de treinamento. A ASC de COR para cada um variou individualmente de 0,79 a 0,86. Uma combinação de marcadores atingiu uma taxa de predição promissora (ASC = 0,98), com sensibilidade de 95% e

especificidade de 85% (Tabela 5).

Utilizando este modelo estatístico para testar o grupo de validação que consiste em 20 normais de controle e 20 amostras de CPCNP, o ensaio forneceu uma sensibilidade de 90% e uma especificidade de 95% (Tabela 5).

Para examinar adicionalmente a associação dos classificadores com a sensibilidade e a especificidade diagnóstica, a predição de classe que utiliza a validação cruzada com a exclusão de um em todas as 81 microplaquetas foi executada.

A sensibilidade e a especificidade eram de 90% e 87%, respectivamente, com as 81 amostras, e a precisão de diagnóstico total era de 89% (Tabela 6). Também utilizando todas as 81 amostras, a ID do clone correspondente, o nome do gene e o valor de p eram como segue: 1864, GAGE7, $p = 9,1 \times 10^{-9}$; 1896, clone BAC de RP 11-499F19, $p = 3,5 \times 10^{-8}$; 1919, SEC15L2, $p = 1,2 \times 10^{-6}$; 1761, PMS2L15, $p = 5,2 \times 10^{-7}$; e 1747, EEFIA, $p = 5,9 \times 10^{-7}$. Todos os cinco marcadores passaram por uma correção de Bonferroni de $0,001/262 = 3,8 \times 10^{-6}$ que torna a probabilidade de que um ou mais deles sejam falsos positivos menores do que 0,001.

Portanto, no geral, o painel com cinco marcadores foi utilizado para segregar as amostras de 40 pacientes com CPCNP e 41 normais com uma taxa de 89% de identificação bem-sucedida quando uma amostra continha todos os cinco marcadores.

Exemplo 2 - Detecção do câncer de pulmão em estágio precoce

Neste exemplo, a capacidade do ensaio e do método de acordo com a presente invenção de identificar os marcadores capazes de distinguir o câncer do pulmão em estágio I e a doença oculta das amostras de controle combinadas a riscos foram investigados.

Indivíduos humanos

Depois de consentimento informado, as amostras de plasma foram obtidas de indivíduos com CPCNP de histologia confirmada na Universidade do Centro Médico de Administração de Veteranos de Kentucky e de Lexington. Os controles de não-câncer foram escolhidos aleatoriamente a partir de 1.520 indivíduos que participaram na Experimentação de Triagem de Câncer de Pulmão da Clínica Mayo. Resumidamente, os indivíduos eram elegíveis para a experimentação de triagem por TC com um histórico de tabagismo de no mínimo 20 maços de cigarros ao ano, uma idade entre 50 e 75 e nenhuma outra malignidade no intervalo de cinco anos do início do estudo. Além das amostras de não-câncer da Experimentação de Triagem do Pulmão de Mayo, seis amostras de CPCNP no estágio I e 40 amostras de pré-diagnóstico estavam disponíveis para a análise.

As amostras de pré-diagnóstico foram extraídas no início do estudo dos indivíduos diagnosticados com cânceres de incidência de CPCNP pela varredura por TC de um a cinco anos após a doação da amostra.

Biblioteca de fagos

As bibliotecas, a peneiração e a triagem de fago foram tal como descrito acima.

Projeto de microplaqueta de diagnóstico e medição do anticorpo

Duzentos e doze fagos imunorreativos identificados na triagem com efluência elevada acima mais cento e vinte fagos T7 "vazios" foram combinados, re-amplificados e manchados em duplicata em lâminas FAST como microplaquetas de diagnóstico únicas. As microplaquetas de réplica foram utilizadas para testar vinte e três amostras de CPCNP no estágio I e vinte e três amostras combinadas a riscos utilizando o protocolo descrito para triagem acima.

Análise estatística

A relação entre Cy5/Cy3 normalizada para cada uma das 212 proteínas expressas por fago foi analisada independentemente para diferenças estatisticamente significativas entre as 23 amostras de pacientes e as 23 amostras de controle pelo teste T utilizando o software estatístico JMP (SAS, Inc., Cary, NC) como descrito no exemplo precedente. Todas as 46 amostras foram utilizadas para construir os classificadores que poderiam distinguir as amostras de pacientes das normais utilizando um marcador individual ou uma combinação de marcadores. As curvas de COR foram geradas para comparar a sensibilidade e especificidade de previsão e a ASC foi determinada. Os classificadores foram então examinados utilizando a validação cruzada com a exclusão de um para todas as 46 amostras.

O conjunto de classificadores foi então utilizado para prever a probabilidade da doença em um conjunto independente de 102 casos e os controles combinados a riscos de uma Experimentação de Triagem do Pulmão da Clínica de Mayo. Os efeitos relativos ao tabagismo e outras doenças pulmonares não-malignas também foram avaliados.

A ASC de COR para cada marcador individual, atingida ao testar todas as 46 amostras para estimar a capacidade de previsão, variou de 0,74 a 0,95; e a combinação de cinco marcadores indicou a capacidade significativa de distinguir amostras de pacientes em estágio precoce dos controles combinados a riscos (ASC=0,99). A sensibilidade e a especificidade computadas utilizando a validação cruzada com a exclusão de um foram de 91,3% e 91,3% respectivamente (Tabela 7).

Uma família de amostras da experimentação de Varredura por TC da Clínica de Mayo que incluiu 46 amostras extraídas 0 a 5 anos antes do diagnóstico (6 cânceres de prevalência e 40 amostras de pré-câncer) e 56 amostras

combinadas a riscos da população selecionada foram então analisadas como uma série de dados independentes. Os resultados indicaram uma classificação exata de 49/56 amostras de não-câncer, 6/6 amostras de câncer extraídas no momento da detecção radiográfica em uma varredura por TC, 9/12 amostras extraídas um ano antes do diagnóstico, 8/11 extraídas dois anos antes do diagnóstico, 10/11 extraídas três anos antes do diagnóstico, 4/4 extraídas quatro anos antes do diagnóstico e 1/2 extraídas cinco anos antes do diagnóstico, correspondendo a 87,5% de especificidade e 82,6% de sensibilidade. Três das oito amostras de pré-câncer classificadas incorretamente pelo ensaio tiveram histologia celular bronquioalveolar.

Nos conjuntos de teste, 6/6 dos controles de não-câncer foram identificados corretamente com um diagnóstico clínico de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), um indivíduo com sarcoidose e um indivíduo com um diagnóstico de intervalo de câncer no seio. No último conjunto de teste independente, dois indivíduos com câncer de próstata localizado também foram classificados corretamente como normais. Um indivíduo com um diagnóstico prévio de câncer no seio (> 5 anos antes) foi classificado como não-câncer, mas um segundo foi classificado como câncer. Trinta e quatro de setenta e nove indivíduos não-câncer tiveram nódulos benignos detectados em varreduras de triagem por TC. O histórico de fumante ativo versus ex-fumante pareceu não afetar a exatidão de previsão do teste. Também não houve nenhuma associação da sensibilidade do ensaio com o tempo para o diagnóstico.

Análise da seqüência das proteínas expressas por fago

As seqüências de nucleotídeo das cinco proteínas expressas por fago de previsão foram comparadas ao banco de dados GenBank. As seqüências de nucleotídeo obtidas dos cinco clones utilizados no modelo de previsão final mostraram

grande homologia à paxilina, SEC15L2, ao clone BAC de RP11-499F19, XRCC5 e MALAT1. Os primeiros três foram identificados como imunorreativos com o plasma de pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado descrito no exemplo precedente. XRCC5 é um gene de reparo do DNA superexpresso em alguns cânceres de pulmão. A atividade anômala e a expressão aberrante da paxilina, uma proteína de aderência focal, foram associadas com um fenótipo metastático agressivo no câncer de pulmão e em outras malignidades. MALAT1 é um RNA regulatório conhecido por ser expresso anormalmente no câncer de pulmão.

O potencial do presente ensaio para complementar a varredura radiográfica para o câncer de pulmão pode ser reconhecido na validação subsequente onde as medidas combinadas destes cinco marcadores de anticorpos previram corretamente 49/56 das amostras de não-câncer da Experimentação de Triagem do Pulmão da Clínica de Mayo, bem como 6/6 dos cânceres de prevalência e 32/40 dos cânceres de incidência do sangue extraído um a cinco anos antes da detecção radiográfica, correspondendo a 87,5% de especificidade e 82,6% de sensibilidade.

O relatório inicial do Experimento de Triagem do Pulmão da Clínica Mayo descreveu 35 CPCNP diagnosticados por TC sozinhos, um CPCNP detectado pela exameção citológica da saliva sozinha e um CPCNP em estágio IV detectado clinicamente entre as triagens de varreduras anuais, correspondendo a uma sensibilidade de 94,5% da varredura por TC sozinha. Além disso, a revisão retrospectiva que seguiu a primeira varredura de incidência anual revelou que nódulos pulmonares pequenos faltavam em 26% das varreduras de prevalência, consistentemente com as taxas de falsos negativos significativas relatadas em outras experimentações de varredura por TC. O diâmetro dos nódulos retrospectivamente identificados era menor do que 4 mm em 231

participantes (62% daqueles 375 participantes), 4 a 7 mm em 137 (37%) e 8 a 20 mm em 6 (2%). Como tal, a sensibilidade de 82,6% do perfil do autoanticorpo para CPCNP se compara bastante favoravelmente àquela por varredura por TC sozinha, por comparação pode se desempenhar especialmente bem para tumores pequenos e representa um avanço sem paralelo na detecção da doença oculta.

Além disso, a especificidade de 87,5% do presente ensaio excede aquela da varredura por TC, que se torna mais importante conforme a porcentagem de nódulos pulmonares benignos aumenta na população em risco, subindo para níveis de 69% dos participantes na Experimentação de Triagem da Clínica Mayo.

Tabela 7. Regressão logística e validação com a exclusão de um no grupo de treinamento

Clone de Fago	ASC ^s	Treinamento*		Validação ^t	
		Especificidade, %	Sensibilidade, %	Especificidade, %	Sensibilidade, %
L1919	0,85	82,6	78,3	82,6	60,9
L1896	0,95	87	87	87	87
G2004	0,80	82,6	65,2	82,6	65,2
G1954	0,74	82,6	87	73,9	69,6
G1689	0,82	82,6	65,2	82,6	65,2
5 Combinado	0,99	100	95,7	91,3	91,3

* O Conjunto de Treinamento consistiu em 23 amostras normais de alto risco e 23 amostras de pacientes com CPCNP no estágio I.

^t. Validação com a exclusão de um: Predição de amostra única com base em 45 casos e controles.

^s ASC: área sob a curva COR.

Os cinco marcadores diagnosticaram precisamente o câncer oculto e o câncer de pulmão na Fase I. A presença dos cinco marcadores em um indivíduo pode prever e previu o câncer antes do diagnóstico utilizando metodologias padrão. Os anticorpos circulantes que se ligam às células do CPCNP estão presentes nos pacientes que são diagnosticados

atualmente como negativos utilizando metodologias disponíveis.

Todas as referências citadas na presente invenção são aqui incorporadas a título de referência em sua totalidade.

Deve ficar evidente que várias modificações podem ser feitas nos preceitos da presente invenção, sem que se desvie do caráter e âmbito da presente invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. DISPOSITIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM PACIENTE COMO UM CANDIDATO PARA TESTES RADIOGRÁFICOS PARA O CÂNCER DO PULMÃO, caracterizado pelo fato de compreender um
5 painel que compreende pelo menos uma molécula de afinidade, em que o dito painel fica em contato funcional com uma amostra de fluido do dito paciente,
em que a dita amostra de fluido pode conter um marcador para o câncer do pulmão;
10 em que a dita molécula de afinidade tem afinidade com o dito marcador,
e em que o dito o dispositivo identifica o dito paciente como um candidato para os ditos testes radiográficos se o dito marcador estiver presente na dita amostra.
- 15 2. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita amostra de fluido é de um paciente assintomático.
- 20 3. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita molécula de afinidade ou o dito marcador é um auto-anticorpo.
- 25 4. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito paciente é um paciente de alto risco sem câncer do pulmão radiograficamente detectável.
- 30 5. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que a detecção por radiografia não será efetuada por até cinco anos a partir da data do uso do dispositivo de diagnóstico no dito paciente.
6. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito câncer do pulmão é um NSCLC.
7. COMPOSIÇÃO PARA DETECTAR RADIOGRAFICAMENTE UM CÂNCER DO PULMÃO DE ESTÁGIO ADIANTADO, em uma pessoa em risco

para essa doença, caracterizada pelo fato de compreender:

um painel de moléculas de afinidade que podem detectar o câncer do pulmão oculto e/ou pré-maligno até cinco anos antes de ser identificável por radiografia; e

5 uma amostra de fluido de uma pessoa em risco para o câncer do pulmão;

em que, se o câncer do pulmão oculto e/ou pré-maligno for detectado na dita composição, a dita pessoa dita será submetida a exames radiográficos periódicos, até que a
10 presença e a localização de um tumor do câncer do pulmão sejam identificadas para a cirurgia ou outras formas de terapia.

8. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o dito fluido é o sangue.

15 9. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o câncer do pulmão no estágio inicial e o dito tumor do câncer do pulmão são NSCLC.

10. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que as ditas moléculas de
20 afinidade são peptídeos.

11. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que o dito painel compreende pelo menos duas moléculas de afinidade.

12. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 11,
25 caracterizada pelo fato de que o dito painel compreende pelo menos três moléculas de afinidade.

13. COMPOSIÇÃO, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o câncer do pulmão está presente no dito indivíduo e o dito indivíduo é um candidato
30 para a seleção radiográfica:

a. se pelo menos metade das ditas moléculas de afinidade detectar marcadores do câncer do pulmão na dita amostra; ou

b. se:

(i) um valor normalizado correlacionado com a presença de cada um dos ditos marcadores na dita amostra for obtido;

5 (ii) os ditos valores normalizados forem agregados para obter uma soma; e

(iii) a dita soma for comparada a um valor de referência que é o valor preditivo máximo do câncer do pulmão dos ditos marcadores, e a dita soma é pelo menos 30% do dito
10 valor de referência.

14. DISPOSITIVO PARA O ENSAIO DO CÂNCER DO PULMÃO, caracterizado pelo fato de compreender um painel, em que o dito painel compreende pelo menos dois membros do painel, sendo que cada membro do dito painel é uma molécula que tem
15 afinidade com um marcador expresso em pacientes de câncer do pulmão;

em que a preditibilidade do painel para o câncer do pulmão é maior do que a preditibilidade de qualquer um de seus membros individuais; e

20 em que o dito painel pode detectar a presença do câncer do pulmão antes do câncer ser identificável por meios radiográficos.

15. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que cada membro do dito painel tem
25 a afinidade com o dito marcador presente no câncer do pulmão até cinco anos antes que um câncer do pulmão seja identificável por meios radiográficos.

16. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito painel compreende pelo
30 menos três membros.

17. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito marcador está presente no sangue.

18. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o dito câncer do pulmão é NSCLC.

19. DISPOSITIVO, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o câncer do pulmão está presente no dito paciente:

a. se pelo menos metade dos ditos membros produz um sinal; ou

b. se:

(i) um valor normalizado correlacionado com a presença de cada marcador detectado na dita amostra for obtido;

(ii) os ditos valores normalizados forem agregados para obter uma soma; e

(iii) a dita soma for comparada a um valor de referência que é o valor preditivo máximo do câncer do pulmão dos ditos membros, e a dita soma é pelo menos 30% do dito valor de referência.

20. USO DE UM PAINEL, caracterizado pelo fato de servir para a preparação de um dispositivo para identificar uma pessoa que tem um tumor não benigno de câncer do pulmão, o qual compreende um painel de marcadores de auto-anticorpo que podem distinguir entre tumores benignos e cancerosos, em que o dispositivo fica em contato com uma amostra de fluido das pessoas identificadas como tendo tumores por telas radiográficas ou de CAT.

21. USO DO PAINEL, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a dita amostra de fluido é o sangue.

22. USO DO PAINEL, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que o dito tumor de câncer do pulmão é um tumor NSCLC.

23. DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DO

CÂNCER DO PULMÃO, caracterizado pelo fato de compreender um painel que compreende pelo menos dois membros de câncer do pulmão e uma fase sólida, em que os ditos membros podem identificar o câncer do pulmão em um fluido de um paciente até cinco anos antes da detecção radiográfica de um câncer do pulmão no dito paciente.

24. DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o dito painel compreende pelo menos três membros de câncer do pulmão.

25. DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO, de acordo com a reivindicação 23, caracterizado pelo fato de que o dito câncer do pulmão é NSCLC.

RESUMO

DISPOSITIVO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE UM PACIENTE COMO UM CANDIDATO PARA TESTES RADIOGRÁFICOS PARA O CÂNCER DO PULMÃO, COMPOSIÇÃO PARA DETECTAR RADIOGRAFICAMENTE UM CÂNCER DO PULMÃO DE ESTÁGIO ADIANTADO, DISPOSITIVO PARA O ENSAIO DO CÂNCER DO PULMÃO, USO DE UM PAINEL, E, DISPOSITIVO DE DIAGNÓSTICO PARA A DETECÇÃO DO CÂNCER DO PULMÃO

Um ensaio de diagnóstico para determinar a presença de câncer de pulmão em um paciente depende, em parte, da verificação da presença de um anticorpo associado com o câncer de pulmão. O ensaio prevê o câncer de pulmão antes da evidência do tecido de câncer radiograficamente detectável.