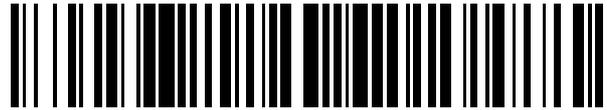


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 919**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2008 E 08718919 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 2140269**

54 Título: **Firma/marcadores de proteínas para la detección de adenocarcinoma**

30 Prioridad:

**27.03.2007 GB 0705876**  
**25.06.2007 GB 0712181**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.02.2014**

73 Titular/es:

**IMMUNOVIA AB (100.0%)**  
**Medicon Village**  
**223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**BORREBAECK, CARL ARNE KRISTER y**  
**WINGREN, LARS BERTIL CHRISTER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 442 919 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Firma/marcadores de proteínas para la detección de adenocarcinoma

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos para el diagnóstico del adenocarcinoma pancreático, y biomarcadores y matrices para uso en el mismo.

**10 Antecedente**

Uno de los desafíos que siguen existiendo en oncología es la capacidad para clasificar pacientes, con respecto a su probabilidad para experimentar la recidiva del tumor o la resistencia al tratamiento con fármacos, o su esperanza de supervivencia.

15 El adenocarcinoma ductal de páncreas es la neoplasia maligna más letal por sitio anatómico, con > 30.000 nuevos casos y muertes anualmente en los Estados Unidos solo y con una supervivencia de 5 años del 3-5 %. Esta extrema mortalidad es debida a la ausencia de métodos diagnósticos tempranos eficaces (5) y a una baja eficacia de las terapias existentes para la enfermedad avanzada. Incluso los pacientes (10-20 %) a los que se les ha diagnosticado un tumor quirúrgicamente extirpable, fallecen en última instancia debido a la enfermedad y a la metástasis recurrente. Una mayor capacidad para detectar y prever el cáncer es por tanto crucial para la gestión individual de cada paciente.

25 La tecnología de micromatrices de anticuerpos (3) tiene el potencial de proporcionar un análisis muy multiplexado (6,7) y se ha sugerido como la plataforma de tecnología que eventualmente proporcionará una firma de proteína definida, *es decir*, una combinación de proteínas séricas que distinga los pacientes de cáncer de las personas sanas. La tecnología de micromatriz ha madurado ahora hasta el punto en que se han superado los obstáculos iniciales y se pueden analizar cantidades mínimas de proteínas en proteomas complejos (8-12). Sin embargo, el perfil de expresión génica del cáncer ha demostrado solo la capacidad de prever el tiempo de supervivencia en pocos casos (1,2) y no se asociado hasta el momento ninguna combinación de proteínas séricas con ninguno de los anteriores parámetros clínicos.

35 Un análisis de muestras de suero que pueda prever el tiempo de supervivencia permitiría un tratamiento del cáncer más individualizado. Se ha puesto énfasis en esto en por ejemplo, el adenocarcinoma de cáncer pancreático, donde no existen marcadores tumorales específicos aunque la mayoría de los pacientes tendrá un CA elevado de 19-9 en el momento del diagnóstico, los marcadores de pronóstico individuales han mostrado estar inconclusos (4). Además, las soluciones no invasivas, tales como la tomografía computerizada, no son suficientemente sensibles para detectar cánceres pequeños, mientras que, por ejemplo, puede utilizarse la ultrasonografía endoscópica para supervisar a los individuos en riesgo de lesiones del páncreas (5).

40 El documento WO 2006/113210 A' divulga un método para diagnosticar la presencia de un cáncer de páncreas en un paciente, que comprende medir los niveles en suero de los marcadores en un panel de marcadores sanguíneos que comprende dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más, siete o más, ocho o más, nueve o más de IP-10, HGF, IL-8,  $\beta$ FGF, IL-12p40, TNFR1, TNFR2, Eotaxin, MCP-1 y CA 19-9, donde un aumento significativo de las concentraciones en suero de IP-10, HGF, IL-8,  $\beta$ FGF, IL-12p40, TNFR1, TNFR2 y CA 19-9 en el paciente en comparación con los correspondientes controles sanos, y una disminución significativa en los niveles en suero de Eotaxin y MCP-1 en el paciente en comparación con los correspondientes controles (supuestamente) sanos indica un diagnóstico probable de cáncer de páncreas en el paciente (véase párrafo 12).

50 Comparado con este antecedente, los inventores han desarrollado ahora una solución proteómica para pronosticar el diagnóstico de cáncer e identificar los primeros conjuntos de biomarcadores séricos para la detección del cáncer de páncreas y para prever la supervivencia.

**55 Sumario de la invención**

De acuerdo con esto, en un primer aspecto, la invención proporciona un método para determinar la presencia de adenocarcinoma de páncreas en un individuo que comprende las etapas de:

- 60 a) proporcionar una muestra de proteína para ensayar (por ejemplo, suero o plasma)  
b) determinar una firma de proteínas de la muestra de ensayo midiendo la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de dos o más proteínas seleccionadas procedentes del grupo definido en la Tabla 1;

donde las dos o más proteínas seleccionadas procedentes del grupo definido en la Tabla 1 incluyen IL-5.  
y donde la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de dos o más proteínas seleccionadas procedentes del grupo definido en la tabla 1 es indicativa de la presencia de adenocarcinoma de páncreas.

Por "firma de proteínas" los inventores incluyen el significado de una combinación de la presencia y/o la cantidad de proteínas séricas presentes en un individuo que tiene cáncer y que se puede distinguir de una combinación de la presencia y/o la cantidad de proteínas séricas presentes en un individuo que no padece cáncer (tal como adenocarcinoma de páncreas) – *es decir*, un individuo normal o sano.

Tal como se ilustra en los Ejemplos que acompañan, la presencia y/o la cantidad de determinadas proteínas séricas presentes en una muestra de ensayo puede ser indicativa de la presencia de cáncer, tal como adenocarcinoma de páncreas, en un individuo. Por ejemplo, la presencia y/o la cantidad relativa de determinadas proteínas séricas puede ser indicativa de la presencia de cáncer, tal como adenocarcinoma de páncreas, en un individuo.

Preferentemente, el individuo es un ser humano, pero puede ser cualquier mamífero, tal como un mamífero domesticado (preferentemente de significación agrícola o comercial que incluye un caballo, cerdo, vaca, oveja, perro y gato).

Preferentemente, el método del primer aspecto de la invención comprende además las etapas de:

- c) proporcionar una muestra de suero o plasma control procedente de un individuo que no padece adenocarcinoma de páncreas;
- d) determinar una firma de proteínas de la muestra control midiendo la presencia y/o la cantidad en la muestra control de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b);

donde la presencia de adenocarcinoma de páncreas se identifica en el caso de que la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b) sea diferente de la presencia y/o la cantidad en la muestra control de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b).

Preferentemente, la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b) es significativamente diferente (*es decir*, estadísticamente diferente) de la presencia y/o la cantidad en la muestra control de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b). Por ejemplo, tal como se describe en los Ejemplos que acompañan, la diferencia significativa entre la presencia y/o la cantidad de una proteína concreta en las muestras de ensayo y de control puede clasificarse como aquella donde  $p < 0,05$ .

Normalmente, el método del primer aspecto comprende medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de todas las proteínas definidas en la Tabla 1 – *es decir*, cada una de las 19 proteínas de la Tabla 1.

De forma alternativa, el método del primer aspecto puede comprender medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 u 11 o 12 o 13 o 14 o 15 o 16 o 17 o 18 o 19 de las proteínas definidas en la Tabla 1.

En una realización preferida, el método del primer aspecto comprende medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de Rantes y/o Eotaxin y/o El y/o TNF-b(1) y/o TNF-b(2) y/o GLP-1 y/o VEGF y/o IL-13 y/o CD40.

Se describe también en el presente documento un segundo método para determinar el tiempo de supervivencia de un individuo que padece un adenocarcinoma de páncreas que comprende las etapas de:

- i) proporcionar una muestra de suero o plasma para ensayar;
- ii) determinar una firma de proteínas de la muestra de ensayo midiendo la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de una o más proteínas seleccionadas procedentes del grupo definido en la Tabla 2;

donde el tiempo de supervivencia de un individuo se identifica en el caso en que la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de una o más proteínas seleccionadas procedentes del grupo definido en la Tabla 2 sea indicativa de un tiempo de supervivencia de menos de 12 meses o más de 12 meses o más de 24 meses.

Preferentemente, el segundo método comprende las etapas de:

- iii) proporcionar una primera muestra de suero o plasma de control procedente de un individuo que tiene un tiempo de supervivencia de menos de 12 meses y/o una segunda muestra de suero o plasma de control procedente de un individuo que tiene un tiempo de supervivencia de más de 12 meses y/o de más de 24 meses;
- iv) determinar una firma de proteínas de la primera y/ la segunda muestra de control midiendo la presencia y/o la cantidad de una o más proteínas medidas en la etapa (ii);

donde el tiempo de supervivencia de un individuo se identifica comparando la presencia y/o la cantidad de una o más proteínas en la muestra de ensayo medida en la etapa (ii) con la presencia y/o la cantidad de la una o más proteínas en la primera y/o la segunda muestra de control medida en la etapa (iv).

Mediante la comparación entre la presencia y/o la cantidad de la una o más proteínas seleccionadas en la muestra

- de ensayo y la muestra de control, es posible determinar el tiempo de supervivencia del individuo que padece adenocarcinoma de páncreas. Por ejemplo, si la muestra de ensayo tiene la misma (es decir, idéntica) o sustancialmente similar o significativamente similar presencia y/o cantidad de la una o más proteínas seleccionadas que la muestra de control procedente de un paciente conocido por tener un tiempo de supervivencia de más de 24 meses, la muestra de ensayo se determinará como una muestra procedente de un paciente que tiene un tiempo de supervivencia de más de 24 meses. La persona experta en temas de diagnóstico entenderá comparaciones diferentes de las mencionadas.
- Normalmente, el segundo método comprende medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de todas las proteínas definidas en la Tabla 2 – *es decir*, cada una de las 22 proteínas de la Tabla 2.
- De forma alternativa, el segundo método puede comprender medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 u 11 o 12 o 13 o 14 o 15 o 16 o 17 o 18 o 19 o 20 o 21 o 22 de las proteínas definidas en la Tabla 2.
- Preferentemente, el segundo método comprende medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo del ligando de CD40 y/o de la mucina y/o IL-16 y/o Rantes y/o Eotaxin y/o MCP-4 y/o IL-11 y/o TNF-b y/o IL-1ra y/o MCP-3 y/o IL-1a y/o IL-3 y/o C3 y/o LDL (1) y/o LDL (2) y/o Lewis Y.
- Preferentemente, el primer aspecto de la invención proporciona un método donde la etapa (b) y/o la etapa (d) se lleva a cabo utilizando un primer agente de unión capaz de unirse a dos o más proteínas. Preferentemente, el segundo método de la etapa (ii) y/o la etapa (iv) se lleva a cabo utilizando un primer agente de unión capaz de unirse a una o más proteínas.
- Los agentes de unión (denominados también moléculas de unión) se pueden seleccionar a partir de una biblioteca, en función de su capacidad para unirse a un motivo dado, tal como se describe a continuación.
- Al menos un tipo, más normalmente todos los tipos de las moléculas de unión pueden ser anticuerpos o sus fragmentos o variantes.
- De esta manera, un fragmento puede contener uno o más de los dominios variable pesado ( $V_H$ ) o variable ligero ( $V_L$ ). Por ejemplo, el término fragmento de anticuerpo incluye moléculas análogas a Fab (Better y col (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra y col (1988) Science 240, 1038); moléculas Fv monocatenarias (ScFv) donde los dominios  $V_H$  y  $V_L$  asociados se unen mediante un oligopéptido flexible (Bird y col (1988) Science 242, 423; Huston y col (1988) Proc. Natl. Acad Sci. USA 85, 5879) y anticuerpos de dominio único (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward y col. (1989) Nature 341, 544).
- El término “variante de anticuerpo” incluye cualquiera de anticuerpos sintéticos, anticuerpos recombinantes o anticuerpos híbridos, tales como, pero sin limitarse a, una molécula de anticuerpo de cadena única producida mediante expresión en fago de la inmunoglobulina ligera y/o la cadena pesada variable y/o las regiones constantes, u otra molécula inmunointeractiva capaz de unirse a un antígeno en un formato de inmunoensayo que es conocido por los expertos en la materia.
- En Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299 se encontrará una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específicos .
- De forma adicional o alternativa, al menos un tipo, más normalmente todos los tipos, de las moléculas de unión son un aptámero.
- Se pueden usar bibliotecas moleculares tales como bibliotecas de anticuerpos (Clackson y col, 1991, Nature 352, 624-628; Marks y col, 1991, J Mol Biol 222(3): 581-97), bibliotecas de péptidos (Smith, 1985, Science 228(4705): 1315-7), bibliotecas expresadas en ADNc (Santi y col (2000) J Mol Biol 296(2): 497-508), bibliotecas en estructuras principales que sean diferentes al marco de los anticuerpos tales como affibodies (Gunneriusson y col. 1999, Appl Environ Microbiol 65(9): 4134-40) o bibliotecas basadas en aptámeros (Kenan y col, 1999, Methods Mol Biol 118, 217-31) como fuente a partir de la cual se seleccionan las moléculas de unión que son específicas para un motivo dado, para su uso en los métodos de la invención.
- Las bibliotecas moleculares se pueden expresar *in vivo* en células procariontas (Clackson y col, 1991, *op. cit.*; Marks y col, 1991, *op. cit.*) o en células eucariotas (Kieck y col, 1999, Proc Natl Acad Sci USA, 96(10):5651-6) o se pueden expresar *in vitro* sin implicación de las células (Hanes & Pluckthun, 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94(10): 4937-42; He & Taussig, 1997, Nucleic Acids Res 25(24): 5132-4; Nemoto y col, 1997, FEBS Lett, 414(2):405-8).
- En los casos en que se utilizan bibliotecas basadas en proteínas, a menudo los genes que codifican las bibliotecas de las potenciales moléculas de unión se empaquetan en virus y la potencial molécula de unión se expresa en la superficie del virus (Clackson y col, 1991, *op. cit.*; Marks y col, 1991, *op. cit.*, Smith, 1985, *op. cit.*).

El sistema mencionado más comúnmente usado actualmente es el de los bacteriófagos filamentosos que expresan fragmentos de anticuerpos en sus superficies, los fragmentos de anticuerpos se expresan como una fusión de la proteína de revestimiento menor del bacteriófago (Clackson y col, 1991, *op. cit.*; Marks y col, 1991, *op. cit.*). Sin embargo, se han utilizado también otros sistemas de expresión que utilizan otros virus (documento EP 39578), bacterias (Gunneriusson y col, 1999, *op. cit.*; Daugherty y col, 1998, *Protein Eng* 11(9): 825-32; Daugherty y col, 1999, *Protein Eng* 12(7): 613-21), y levaduras (Shusta y col, 1999, *J Mol Biol* 292 (5): 949-56).

Además, recientemente, se han presentado sistemas de expresión que utilizan la unión del producto polipeptídico a su ARNm que se codifica en los denominados sistemas de expresión de ribosomas (Hanes & Pluckthun, 1997, *op. cit.*; He & Taussig, 1997, *op. cit.*; Nemoto y col, 1997, *op. cit.*), o de forma alternativa la unión del producto polipeptídico al ADN codificante (véase la Patente de los Estados Unidos N° 5.856.090 y el documento WO 98/37186).

Cuando las potenciales moléculas de unión se seleccionan a partir de bibliotecas, se emplean normalmente uno o unos pocos péptidos selectores que tienen motivos definidos. Se pueden usar restos de aminoácidos que proporcionan estructura, disminuyendo la flexibilidad en el péptido o cadenas secundarias polares o hidrófobas cargadas que permiten la interacción con la molécula de unión en el diseño de motivos de péptidos selectores. Por ejemplo -

- (i) La prolina puede estabilizar una estructura peptídica ya que su cadena secundaria se une tanto al carbono alfa como al nitrógeno;
- (ii) Fenilalanina, tirosina y triptófano tienen cadenas secundarias aromáticas y son muy hidrófobos, mientras que leucina e isoleucina tienen cadenas secundarias alifáticas y son también hidrófobos;
- (iii) Lisina, arginina e histidina tienen cadenas secundarias básicas y estarán cargados positivamente a pH neutro, mientras que aspartato y glutamato tienen cadenas secundarias ácidas y estarán cargados negativamente a pH neutro;
- (iv) Asparagina y glutamina son neutros a pH neutro pero contienen un grupo amida que puede participar en enlaces de hidrógeno;
- (v) Serina, treonina y tirosina tienen cadenas secundarias que contienen grupos hidroxilo, que pueden participar en enlaces de hidrógeno.

Normalmente, la selección de moléculas de unión puede implicar el uso de tecnologías y sistemas de matriz para analizar la unión a manchas que corresponden a tipos de moléculas de unión.

Preferentemente, el primer agente de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo. De forma conveniente, el anticuerpo o su fragmento se selecciona entre el grupo que consiste en: scFv, Fab, un dominio de unión de una inmunoglobulina.

Los dominios variable pesado ( $V_H$ ) y variable ligero ( $V_L$ ) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento del antígeno, un hecho reconocido en primer lugar por los experimentos iniciales de digestión con la proteasa. Se encontró confirmación adicional mediante la "humanización" de anticuerpos de roedores. Los dominios variables procedentes de roedores se pueden fusionar con los dominios constantes de origen humano de tal manera que el anticuerpo resultante retiene la especificidad antigénica del anticuerpo originario de roedor (Morrison y col (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855).

Esta especificidad antigénica, que está conferida por los dominios variables y es independiente de los dominios constantes, es conocida a partir de los experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpo, conteniendo cada uno de los cuales uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas análogas a Fab (Better y col (1988) *Science* 240, 1041); moléculas Fv (Skerra y col (1988) *Science* 240, 1038); moléculas Fv monocatenarias donde los dominios  $V_H$  y  $V_L$  asociados se unen mediante un oligopéptido flexible (Bird y col (1988) *Science* 242, 423; Huston y col (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5879) y anticuerpos de dominio único (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward y col (1989) *Nature* 341, 544). En Winter & Milstein (1991) *Nature* 349, 293-299 se encuentra una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de los fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específicos.

Por "moléculas ScFv" los inventores entienden moléculas donde los dominios  $V_H$  y  $V_L$  asociados se unen mediante un oligopéptido flexible.

Las ventajas de utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos completos son de diferentes tipos. El tamaño más pequeño de los fragmentos puede conducir a propiedades farmacológicas mejoradas, tales como mejor penetración del tejido sólido. Se eliminan las funciones efectoras de los anticuerpos completos, tales como la unión del complemento. Todos los Fab, Fv, ScFv y los fragmentos de anticuerpos dAb se pueden expresar en y secretarse a partir de *E. coli*, permitiendo de esta manera la fácil producción de grandes cantidades de dichos fragmentos.

Los anticuerpos completos, y los fragmentos  $F(ab)_2$  son "bivalentes". Por "bivalente" los inventores entienden que dichos anticuerpos y los fragmentos  $F(ab)_2$  tienen dos sitios de combinación de antígenos. En contraste, Fab, Fv,

ScFv y los fragmentos dAb son monovalentes, teniendo solamente un sitio de combinación de antígenos.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Se pueden preparar anticuerpos monoclonales adecuados mediante técnicas conocidas, por ejemplo, las divulgadas en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982), ambas cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización preferida, la invención proporciona métodos donde las dos o más proteínas en la muestra de ensayo se marcan con un resto detectable. Preferentemente, el primer aspecto proporciona un método donde las dos o más proteínas en la muestra de control se marcan con un resto detectable. De forma alternativa, en el segundo método, la una o más proteínas en la primera y/o segunda muestra de control se marca con un resto detectable.

Por un "resto detectable" los inventores incluyen el significado de que el resto es aquel que se puede detectar y determinarse la cantidad y/o la localización del resto (por ejemplo, la localización en una matriz).

Son bien conocidos en la materia los restos detectables.

Un resto detectable puede ser un resto fluorescente y/o luminiscente y/o quimioluminiscente que, cuando se expone a condiciones específicas, se puede detectar. Por ejemplo, un resto fluorescente puede necesitar exponerse a radiación (es decir, luz) a una longitud de onda e intensidad específicas para producir la excitación del resto fluorescente, permitiendo de esta manera emitir fluorescencia detectable a una longitud de onda específica que se puede detectar.

De forma alternativa, el resto detectable puede ser una enzima que sea capaz de convertir un sustrato (preferentemente indetectable) en un producto detectable que se puede visualizar y/o detectar. Se describen con más detalles a continuación los ejemplos de enzimas adecuadas en relación a, por ejemplo, ensayos ELISA.

De forma alternativa, el resto detectable puede ser un átomo radioactivo que es de utilidad en la formación de imágenes. Los átomos radioactivos adecuados incluyen  $^{99m}\text{Tc}$  e  $^{123}\text{I}$  para estudios de gammagrafía. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcas de espín para diagnóstico por imágenes mediante resonancia magnética (IRM) tales como  $^{123}\text{I}$  de nuevo,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ , gadolinio, manganeso o hierro. Evidentemente, el agente que se va a detectar (tal como, por ejemplo, la una o más proteínas en la muestra de ensayo y o la muestra de control descritas en el presente documento y/o la molécula de anticuerpo para uso en la detección de una proteína seleccionada) deben tener suficientes isótopos atómicos adecuados a fin de que el resto detectable sea fácilmente detectable.

Se pueden incorporar radiomarcas u otras marcas a los agentes de la invención (es decir, las proteínas presentes en las muestras de los métodos de la invención y/o los agentes de unión de la invención) en las maneras conocidas. Por ejemplo, si el resto de unión es un polipéptido, este se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Rh}$ ,  $^{188}\text{Re}$  e  $^{111}\text{In}$  se pueden, por ejemplo, unir mediante restos cisteína en el resto de unión. El itrio-90 se puede unir mediante un resto lisina. Se puede usar el método del IODOGEN (Fraker y col (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57) para incorporar  $^{123}\text{I}$ . La referencia ("Monoclonal Antibodies in immunoscintigraphy". J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros métodos en detalle. Son bien conocidos en la técnica los métodos para conjugar otros restos detectables (tales como restos enzimáticos, fluorescentes, luminiscentes, quimioluminiscentes o radioactivos) a proteínas.

Los ejemplos que acompañan proporcionan un ejemplo de métodos y restos detectables para marcar agentes de la invención (tales como, proteínas en la muestra de los métodos de la invención y/o moléculas de unión) para uso en los métodos de la invención.

Preferentemente, el resto detectable se selecciona entre el grupo que consiste en: un resto fluorescente; un resto luminiscente; un resto quimioluminiscente; un resto radioactivo; un resto enzimático.

Preferentemente, el primer aspecto proporciona un método donde la etapa (b) y/o la etapa (d) se llevan a cabo utilizando una matriz. De forma conveniente, en el segundo método, la etapa (ii) y/o la etapa (iv) se llevan a cabo utilizando una matriz.

Las matrices per se son bien conocidas en la materia. Normalmente están formadas por una estructura lineal o bidimensional que tiene regiones uniformemente separadas (es decir, discretas) ("manchas"), teniendo cada una un área finita, formada sobre la superficie de un soporte sólido. Una matriz puede ser también una estructura en forma de perla donde cada perla se puede identificar mediante un código molecular o código de colores o identificarse en un flujo continuo. Se puede llevar a cabo el análisis de forma secuencial donde la muestra se pasa sobre una serie de manchas adsorbiendo cada una de ellas la clase de moléculas procedente de la disolución. El soporte sólido es normalmente vidrio o un polímero, los polímeros utilizados más comúnmente son celulosa, poliácridamida, nilón,

poliestireno, poli(cloruro de vinilo). Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, chips de silicio, microplacas, membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF), membranas de nitrocelulosa, membranas no porosas (por ejemplo, de plástico, polímero, perspex, silicio, entre otras), una pluralidad de alfileres poliméricos, o una pluralidad de pocillos de microvaloración, o cualquier otra superficie adecuada para inmovilizar proteínas, polinucleótidos y otras moléculas adecuadas y/o llevar a cabo un inmunoensayo. Son bien conocidos en la materia los procedimientos de unión y consisten generalmente en reticular covalentemente la unión o adsorber físicamente una molécula de proteína, polinucleótido o similar en el soporte sólido. Utilizando técnicas bien conocidas, tales como la impresión por contacto o sin contacto, el enmascaramiento o la fotolitografía, se puede definir la localización de cada mancha. Para revisiones, véanse Jenkins, R.E., Pennington, S.R. (2001, *Proteomics*, 2, 13-29) y Lal y col (2002, *Drug Discov Today* 15; 7(18 Suppl):S143-9).

Normalmente, la matriz es una micromatriz. Por "micromatrices" los inventores incluyen el significado de una matriz de regiones que tienen una densidad de regiones discretas de al menos aproximadamente 100/cm<sup>2</sup> y preferentemente al menos aproximadamente 1000/cm<sup>2</sup>. Las regiones de una micromatriz tienen dimensiones típicas, por ejemplo, diámetros en el intervalo de entre aproximadamente 10-250 μm, y están separadas de otras regiones en la matriz por aproximadamente la misma distancia. La matriz puede ser también una macromatriz o una nanomatriz.

Una vez que las moléculas de unión (descritas anteriormente) se han identificado y aislado, la persona experta puede fabricar una matriz usando métodos bien conocidos en la técnica de la biología molecular.

De forma alternativa, el primer aspecto de la invención proporciona un método donde la etapa (b) y/o la etapa (d) se lleva a cabo utilizando un ensayo que comprende un segundo agente de unión capaz de unirse a una o más proteínas, teniendo el segundo agente de unión un resto detectable.

Normalmente, en el segundo método, la etapa (ii) y/o la etapa (iv) se lleva a cabo utilizando un ensayo que comprende un segundo agente de unión capaz de unirse a una o más proteínas, teniendo el segundo agente de unión un resto detectable.

Los agentes de unión se han descrito con detalle anteriormente.

En una realización preferida, el segundo agente de unión es un anticuerpo o fragmento del mismo; normalmente un anticuerpo recombinante o fragmento del mismo. De forma conveniente, el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona entre el grupo que consiste en: scFv, Fab, un dominio de unión de una molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos se han descrito con detalle anteriormente.

Se prefiere que, cuando se utiliza el ensayo, la invención proporcione un método donde el resto detectable se selecciona entre el grupo que consiste en: un resto fluorescente; un resto luminiscente; un resto quimioluminiscente, un resto radioactivo; un resto enzimático. Los ejemplos de restos detectables adecuados para su uso en los métodos de la invención se han descrito anteriormente.

Los ensayos preferidos para detectar proteínas en suero o plasma incluyen enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA) incluyen ensayos de tipo sándwich utilizando anticuerpos monoclonales y/o policlonales. David y col en las Patentes de los Estados Unidos N<sup>os</sup>. 4.376.110 y 4.486.530 describen los ensayos de tipo sándwich a modo de ejemplo, incorporados de esta manera por referencia en el presente documento. Se puede usar la tinción de anticuerpos de células sobre portas en métodos bien conocidos en pruebas diagnósticas de laboratorio de citología, conocidas también por los expertos en la materia.

Normalmente, el ensayo es un ELISA (enzoinmunoanálisis de adsorción) que implica normalmente el uso de enzimas que proporcionan un producto de reacción coloreado, usualmente en ensayos en fase sólida. Las enzimas tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa se han empleado ampliamente. Una manera de amplificar la reacción de la fosfatasa es el uso del NADP como sustrato para generar NAD que actúa ahora como una coenzima para un segundo sistema de enzimas. La pirofosfatasa de *Escherichia coli* proporciona un buen conjugado debido a que la enzima no está presente en tejidos, es estable y proporciona un color de reacción bueno. Se pueden usar también sistemas quimioluminiscentes basados en enzimas tales como luciferasa.

La conjugación con la vitamina biotina se utiliza con frecuencia debido a que puede detectarse fácilmente por su reacción con la avidina o la estreptavidina unida a enzima, a la cual se une con gran especificidad y afinidad.

En un segundo aspecto, la invención proporciona una matriz para determinar la presencia de adenocarcinoma de páncreas en un individuo que comprende dos o más agentes de unión de acuerdo con la invención. Preferentemente, los dos o más agentes de unión son capaces de unirse a todas las proteínas definidas en la Tabla 1.

Se describe también en el presente documento una matriz para determinar el tiempo de supervivencia de un

individuo que padece un adenocarcinoma de páncreas que comprende uno o más agentes de unión de acuerdo con el segundo aspecto descrito en el presente documento. Preferentemente, el uno o más agentes de unión es capaz de unirse a todas las proteínas definidas en la Tabla 2.

5 Las matrices adecuadas para su uso en el método de la invención se han descrito anteriormente. En un tercer aspecto, la invención proporciona el uso de una matriz para su uso en el método del primer aspecto de la invención. Se describe también en el presente documento el uso de una matriz para su uso en el segundo método descrito.

10 En un cuarto aspecto, la invención proporciona el uso de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 como un marcador diagnóstico para determinar la presencia de adenocarcinoma de páncreas en un individuo, donde las dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 incluyen IL-5. De forma conveniente, todas las proteínas definidas en la Tabla 1 se usan como marcador diagnóstico para determinar la presencia de adenocarcinoma de páncreas en un individuo.

15 Se describe también en el presente documento el uso de una o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 2 como marcador diagnóstico para determinar el tiempo de supervivencia de un individuo que padece un adenocarcinoma de páncreas. Se prefiere que todas las proteínas definidas en la Tabla 2 se utilicen como marcador diagnóstico para determinar el tiempo de supervivencia de un individuo que padece un adenocarcinoma de páncreas.

20 En un quinto aspecto, se proporciona un kit para determinar la presencia de un adenocarcinoma de páncreas que comprende:

- 25 A) dos o más primeros agentes de unión, o una matriz de acuerdo con el primer aspecto de la invención;  
B) instrucciones para llevar a cabo el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

donde las dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 incluyen IL-5.

30 En un sexto aspecto, la invención proporciona un kit para determinar la presencia de un adenocarcinoma de páncreas que comprende:

- A) dos o más segundos agentes de unión tal como se ha definido en el presente documento,  
B) instrucciones para llevar a cabo el método tal como se ha definido en el primer aspecto de la invención.

35 Se describe también en el presente documento un kit para determinar el tiempo de supervivencia de un individuo que padece un adenocarcinoma de páncreas que comprende:

- 40 1) uno o más primeros agentes de unión tal como se define en el presente documento;  
2) instrucciones para llevar a cabo el método de acuerdo con el segundo método.

Se describe también en el presente documento un kit para determinar el tiempo de supervivencia de un individuo que padece un adenocarcinoma de páncreas que comprende:

- 45 1) uno o más segundos agentes de unión tal como se ha definido en el presente documento;  
2) instrucciones para llevar a cabo el método tal como se ha definido en el segundo método.

50 El listado o la discusión de un documento anteriormente publicado en esta memoria descriptiva no debe tomarse generalmente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es un conocimiento general común.

Los ejemplos no limitantes preferidos que abarcan determinados aspectos de la invención se describirán ahora, con referencia a las siguientes tablas y figuras:

- 55 **Tabla 1:** Perfil de proteínas séricas para distinguir a pacientes normales frente a pacientes con cáncer de páncreas  
**Tabla 2:** Firma de proteínas séricas para distinguir supervivientes a corto plazo (<12 meses) frente a supervivientes a largo plazo (>24 meses) entre los pacientes con cáncer de páncreas  
**Tabla 3:** 129 fragmentos de anticuerpos recombinantes, dirigidos contra 60 proteínas séricas, para su uso en la micromatriz de la invención  
60 **Tabla 4:** Datos demográficos del paciente de pacientes a partir de los cuales se obtuvieron muestras de suero. PC = adenocarcinoma de páncreas.

65 **Figura 1:** *Detección de adenocarcinomas de páncreas mediante el análisis de la expresión de la proteína sérica, utilizando micromatrices de anticuerpos recombinantes.* (a) Una imagen escaneada de una matriz de anticuerpos que contiene 1280 puntos de datos, (b) Un análisis multidimensional representado como un gráfico de Sammon no supervisado basado en los 129 fragmentos de anticuerpos, donde se muestra que los pacientes de cáncer (rojo)

están completamente separados de los individuos sanos (azul), (c) Un dendrograma, donde los pacientes de cáncer (PA) están completamente separados de los individuos normales (N); el agrupamiento jerárquico bilateral se basó en 19 biomarcadores séricos que se expresaron significativamente de forma diferencial ( $p < 0,05$ ) en individuos con cáncer comparado con los individuos normales, utilizando un conjunto de entrenamiento compuesto de 28 muestras de suero. Posteriormente, un conjunto de ensayo de 19 muestras de suero (marcado con \*) se clasificó correctamente en un 100 %. Las columnas representan donantes, donde el azul es para los individuos normales (N) y el rojo es para los pacientes con cáncer (PA). Cada hilera representa un biomarcador sérico, tal como se señala en el lado a mano derecha, donde cada píxel demuestra el nivel de expresión de este biomarcador concreto en cada donante (expresión en exceso) (rojo), expresión en defecto (verde) o sin cambios (negro) en el suero de cáncer de páncreas comparado con un suero normal); (d) algunos de los biomarcadores séricos, tales como IL-4, IL-5, IL-13, y MCP-3, también se analizaron mediante ELISA para confirmar los resultados de la micromatriz. Se muestra el conjunto de datos representativos para IL-3, demostrando que el análisis ELISA convencional y el análisis de la micromatriz de anticuerpos generaron resultados similares. La sensibilidad del análisis de la micromatriz fue igual a, o mejor, en comparación con la que se obtuvo mediante ELISA (no se muestran los datos).

**Figura 2:** Identificación de una firma predictiva de biomarcadores de proteínas séricas, que discrimina entre dos grupos de pacientes supervivientes a corto (<12 meses) frente a largo plazo (>24 meses). (a) Un área bajo la curva de rendimiento diagnóstico (AUROC) como una función del número de analitos incluidos en una firma predictiva, que demuestra con claridad que se podrían discriminar bien dos grupos de supervivientes usando una firma >29 analitos; (b) El área bajo ROC de una firma predictiva de biomarcadores séricos, basada en 29 analitos específicos de anticuerpos identificados (c) Se entrenó una SVM con la firma de biomarcadores escogida como el conjunto de entrenamiento. Un conjunto de ensayo consistente en 10 pacientes escogidos de forma aleatoria (muestras marcadas con \*) se clasificó a continuación, utilizando el Valor de Predicción de la SVM; (d) Cartografía térmica basada en las 22 proteínas séricas no redundantes en la firma predictiva. Las columnas representan pacientes con cáncer, donde el azul son supervivientes a largo plazo (>24 meses) y rojo son supervivientes a corto plazo (<12 meses). Véase la leyenda de la Figura 1c para la codificación de los colores.

**Figura 3:** Principio de la tecnología de micromatriz de anticuerpos recombinantes

### Ejemplo

#### Visión general

El impulso subyacente de la oncoproteómica es identificar las firmas de proteínas que están asociadas con una neoplasia maligna concreta. Basándose en el análisis de micromatrices de anticuerpos recombinantes de proteomas séricos completos humanos sin fraccionar, derivados de carcinomas de páncreas y de donantes sanos normales, los inventores han identificado una firma de proteínas, basada en 22 analitos no redundantes, que discrimina entre pacientes con cáncer y pacientes sanos. Se previó que la especificidad y la sensibilidad fueran del 99,7 y del 99,9, respectivamente. Además, se definió que una firma de proteínas consistente en 19 analitos de proteínas tenía el potencial de prever la supervivencia entre pacientes con cáncer. Esta novedosa firma predictora distinguió entre pacientes que tenían <12 meses o >24 meses de tiempo de supervivencia y sugiere nuevas posibilidades en la medicina individualizada.

El presente estudio describe un enfoque proteómico por afinidad para pronosticar un diagnóstico de cáncer basándose en una matriz de anticuerpos recombinantes, que utiliza una matriz adaptada a fragmentos de scFv recombinantes, específica de proteínas inmunoregulatoras, puede discriminar entre proteomas séricos humanos derivados tanto de pacientes con cáncer como de individuos sanos. Los inventores presentan los primeros conjuntos de biomarcadores séricos para la detección de cáncer de páncreas así como para prever la supervivencia del paciente.

#### Materiales y métodos

*Producción y purificación de anticuerpos scFv* - 129 fragmentos de anticuerpos scFv recombinantes humanos contra 60 proteínas diferentes implicadas en la inmunoregulación, se seleccionaron a partir de la biblioteca n-CoDeR (13) y fueron amablemente proporcionados por BioInvent International AB (Lund, Suecia). De esta manera, cada antígeno fue reconocido por hasta cuatro fragmentos de scFv diferentes. Todos los anticuerpos scFv se produjeron en 100 ml de cultivos de *E. coli* y se purificaron a partir de sobrenadantes para la expresión, utilizando cromatografía de afinidad en Ni-NTA agarosa (Qiagen, Hilden, Alemania). Las moléculas unidas se eluyeron con imidazol 250 mM, se dializaron ampliamente frente a PBS, y se almacenaron a 4° C, hasta uso posterior. Se determinó la concentración de proteínas midiendo la absorbancia a 280 nm (concentración promedio 210 µg/ml, intervalo de 60-1090 µg/ml). Se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE al 10 % (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.)

*Muestras de suero* – En total, 44 muestras de suero suministradas por el Stockholm South General Hospital (Suecia) y el Lund University Hospital (Lund, Suecia) se incluyeron en este estudio. Se recogieron 24 muestras de suero (PA1-PA30) de pacientes con cáncer de páncreas en el momento del diagnóstico. Se recogieron 20 muestras de suero (N1-N20) (sin síntomas clínicos) procedentes de donantes sanos. En la Tabla 4 se muestran los datos

demográficos de los pacientes. Todas las muestras se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a  $-80^{\circ}$  C, siguiendo los procedimientos de funcionamiento normalizados.

5 *Marcado de muestras de suero* – Las muestras de suero se marcaron utilizando los protocolos de marcado anteriormente optimizados para los proteomas séricos (9, 14, 15). Todas las muestras de suero se biotinilaron utilizando EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotina (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Se centrifugaron alícuotas de suero de 50  $\mu$ l a 16.000 x g durante 20 minutos a  $4^{\circ}$  C y se diluyeron a 1:45 en PBS, dando como resultado una concentración de aproximadamente 2 mg/ml. A continuación las muestras se biotinilaron mediante la adición de Sulfo-NHS-biotina hasta una concentración final de 0,6 mM durante 2 h en hielo, sometiénolas a vortización cuidadosamente cada 20 minutos. Se eliminó la biotina sin reaccionar mediante diálisis frente a PBS durante 72 horas, utilizando una membrana de diálisis de 3,5 kDa de PM (Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, EE.UU.). Las muestras se distribuyeron en alícuotas y se almacenaron a  $-20^{\circ}$  C.

15 *Enzimoinmunoanálisis de adsorción.* Se midieron las concentraciones en suero de 4 analitos de proteínas (MCP-3, IL-4, IL-5 e IL-13) en todas las muestras, utilizando kits ELISA comerciales (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.). Se llevaron a cabo las medidas de acuerdo con las recomendaciones proporcionadas por el suministrador.

20 *Fabricación y procesamiento de micromatrices de anticuerpos* – Para la producción de micromatrices de anticuerpos, los inventores utilizaron una configuración previamente optimizada y validada (9, 12, 14, 15). De forma breve, las micromatrices de scFv se fabricaron utilizando una impresora sin contacto (Biochip Arrayer, Perkin Elmer Life & Analytical Sciences), que deposita aproximadamente 330 pl/gota, utilizando piezotecnología. Los anticuerpos scFv se distribuyeron en la matriz manchando 2 gotas en cada posición y la primera gota se dejó secar antes de que se dispensara la segunda gota. Los anticuerpos se distribuyeron en manchas sobre portas de la micromatriz MaxiSorb de polímero negro (NUNC A/S, Roskilde, Dinamarca), dando como resultado un promedio de 5 fmol de scFv por mancha (intervalo de 1,5 – 25 fmol). Ocho réplicas de cada clon de scFv se distribuyeron en la matriz para asegurar una estadística adecuada. En total, se imprimieron 160 anticuerpos y controles por porta orientados en dos columnas con 8 x 80 anticuerpos por columna. Para ayudar a la alineación de la cuadrícula durante la cuantificación, una hilera que contenía estreptavidina conjugada con Cy5 (2  $\mu$ g/ml) se distribuyó en forma de mancha por cada decena de hileras. Se utilizó una pluma hidrófoba (DakoCytomation Pen, DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) para levantar una barrera hidrófoba alrededor de las matrices. Las matrices se bloquearon con 500  $\mu$ l de leche en polvo desnatada al 5 % (p/v) (Semper AB, Sundbyberg, Suecia) en PBS durante la noche. Todas las incubaciones se llevaron a cabo en una cámara de humedad a temperatura ambiente. Las matrices se lavaron a continuación cuatro veces con 400  $\mu$ l de Tween-20 al 0,05 % en PBS (PBS-T), y se incubaron con 350  $\mu$ l de suero biotinilado, se diluyeron 1:10 (dando como resultado una dilución total del suero de 1:450) en leche en polvo desnatada al 1 % (p/v) y Tween al 1 % en PBS (PBS-MT) durante 1 h. A continuación, las matrices se lavaron cuatro veces con 400  $\mu$ l de PBS-T y se incubaron con 350  $\mu$ l de 1  $\mu$ g/ml de estreptavidina conjugada con Alexa-647 diluida en PBS-MT durante 1 h. Finalmente, las matrices se lavaron cuatro veces con 400  $\mu$ l de PBS-T, se secaron inmediatamente en una corriente de nitrógeno gas y se escanearon con un escáner de micromatriz confocal (ScanArray Express, Perkin Elmer Life & Analytical Sciences) a una resolución de 5  $\mu$ m, utilizando seis configuraciones de barrido diferentes. Se utilizó el software ScanArray Express V2.0 (Perkin Elmer Life & Analytical Sciences) para cuantificar la intensidad de cada mancha, utilizando el método del círculo fijo. Se sustrajo el fondo local y para compensar los posibles defectos locales, las dos réplicas más altas y las dos réplicas más bajas se excluyeron automáticamente y cada punto de datos representa el valor promedio de las cuatro réplicas restantes. El coeficiente de correlación para los intraensayos fue  $>0,99$  y para los interensayos fue  $>0,96$ , respectivamente.

50 *Normalización de datos* – Solo las manchas no saturadas se utilizaron para el análisis posterior de los datos. Se llevó a cabo la normalización de los datos entre chips, utilizando una solución de normalización semiglobal, conceptualmente similar a la normalización desarrollada para las micromatrices de ADN. De esta manera, se calculó en primer lugar el coeficiente de variación (CV) para cada analito y se clasificó. Se identificó el quince % de los analitos que presentaron los valores de CV más bajos sobre todas las muestras, que correspondían a 21 analitos, y se utilizó para calcular un factor de normalización entre chips. El factor de normalización  $N_i$  se calculó mediante la fórmula  $N_i = S_i/\mu$ , donde  $S_i$  es la suma de las intensidades de señal para los 21 analitos de cada muestra y  $\mu$  es la suma de las intensidades de señal de los 21 analitos promediados sobre todas las muestras. Cada conjunto de datos generados a partir de una muestra se dividió con el factor de normalización  $N_i$ . Para la intensidad, se utilizaron valores del log 2 en el análisis.

60 *Análisis de datos* – Se llevó a cabo la cartografía de Sammon utilizando distancias en el espacio euclidiano de los 129 analitos. Se llevó a cabo la clasificación supervisada con una máquina de soporte vectorial (SVM) utilizando un kernel lineal – (16,18). El coste de violación de las restricciones (el parámetro C en la SVM) se fijó en 1, que es el valor por defecto en la función R de svm, y no se realizó ningún intento de afinarlo. Se escogió esta ausencia de afinación de parámetros para evitar un ajuste excesivo y para llevar a cabo el procedimiento de clasificación de manera más fácil de entender. La salida de la SVM en una muestra de ensayo es un valor de decisión de SVM, que es la distancia señalada con respecto al hiperplano. En la Figura 1C y 2C, se llevó a cabo una vez de forma aleatoria la división entre conjunto de entrenamiento y conjunto de ensayo y se mantuvo fija a partir de ese momento. En la Figura 2A se utilizó el procedimiento de validación cruzada que deja fuera un elemento en cada iteración. Para cada

número K entre 1 y 129, se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Para el conjunto de entrenamiento, es decir, todas las muestras excepto una, se seleccionaron los analitos clasificados con el número K más alto en el ensayo de Wilcoxon, y se entrenó la SVM con dichos analitos K. A continuación se calculó un valor de decisión de la SVM para la muestra abandonada por el clasificador. Como práctica común, esto se llevó a cabo para todas las muestras en la validación cruzada que deja fuera un elemento en cada iteración.

Se construyó una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) utilizando los valores de decisión de la SVM y se encontró el área bajo la curva. La Figura 2A muestra la curva ROC para el valor K = 29. Se llevaron a cabo todas las estadísticas en R (19).

## Resultados

El adenocarcinoma ductal de páncreas es un cáncer con un pronóstico malo y una herramienta de diagnóstico mejorada que facilitara la decisión clínica sería significativamente beneficiosa para los pacientes. Una solución para un diagnóstico mejorado es identificar un conjunto de biomarcadores que puedan detectar el cáncer y que prevea también el resultado clínico. Por consiguiente, para ser capaces de identificar una firma de proteínas vinculada a un cáncer de páncreas con alta sensibilidad, los inventores han diseñado la primera micromatriz a gran escala (Figura 1A) basada en 129 fragmentos de anticuerpos recombinantes (12, 14, 15), dirigida contra 60 proteínas séricas, principalmente de naturaleza inmunoreguladora (Tabla 2). En este estudio, los sueros marcados de 24 pacientes con cáncer de páncreas y 20 pacientes sanos se incubaron en las micromatrices de anticuerpos, que posteriormente se cuantificaron, utilizando un escáner confocal. En primer lugar, para ensayar la capacidad de los inventores para detectar el cáncer, los datos de la micromatriz se visualizaron en una representación gráfica de Sammon no supervisada basada en todos los anticuerpos y se pudieron distinguir con claridad dos poblaciones distintas (Figura 1B). Esto indicó la existencia de una clara diferencia entre los proteomas de cáncer y los proteomas normales, en relación con los analitos séricos analizados mediante la micromatriz. Los inventores ejecutaron posteriormente una validación cruzada que deja fuera un elemento en cada iteración, con una máquina de soporte vectorial (SVM), y extrajeron los valores de decisión de cada muestra. El valor de decisión es la salida del predictor, y las muestras con un valor de predicción por encima (por debajo) de un umbral se prevé que sean carcinomas de páncreas (sano). El umbral parametriza el equilibrio entre la sensibilidad y la especificidad y se ajusta a menudo, pero no siempre, a cero. Las 24 muestras de carcinoma de páncreas obtuvieron valores de decisión en el intervalo de 0,20 a 1,93, y las muestras sanas en el intervalo de -1,84 a -0,30. De esta manera, con un valor umbral de cero, o cualquier otro valor entre -0,30 y 0,30, la sensibilidad y la especificidad son del 100 % en el conjunto de datos de los inventores. Sin embargo, para extrapolar la sensibilidad y la especificidad a una población más grande, los inventores verificaron en primer lugar que los valores de decisión se distribuyeran normalmente de forma aproximada, en los grupos normales frente a los grupos con cáncer, respectivamente, y calcularon los promedios y las varianzas. Configurando el umbral de clasificación en el punto intermedio entre los dos promedios y utilizando distribuciones normales, los inventores encontraron un 99,9 % de sensibilidad y un 99,3 % de especificidad, que indicó una potencia de la clasificación excelente incluso en una población más grande. Para ilustrar la clara separación entre el grupo normal y el grupo con cáncer, los inventores seleccionaron de manera aleatoria un conjunto de entrenamiento, consistente en 18 muestras con cáncer y 10 normales. Este conjunto de entrenamiento de proteomas séricos de cáncer y normales definió un conjunto más pequeño de biomarcadores, consistente en 19 proteínas séricas no redundantes que diferían significativamente ( $p < 0,05$ ) entre las dos muestras. Estas proteínas expresadas de forma diferencial se utilizaron posteriormente para construir un dendograma de las 28 muestras de entrenamiento y las 16 muestras restantes, que se utilizaron como un conjunto de ensayo. Como se puede ver en la Figura 1C, las muestras de cáncer se separaron completamente de las muestras normales para el conjunto de entrenamiento y el conjunto de ensayo (100 % de sensibilidad y especificidad).

Una observación interesante fue el hecho de que los inventores habían obtenido de forma enmascarada tres muestras de suero procedentes de un paciente (PA14), extraídas en diferentes ocasiones con una diferencia de pocas semanas pero 11-12 meses antes de que al paciente se le diagnosticara cáncer de páncreas. Además, todas las muestras se clasificaron de manera correcta como cáncer, cuando se usaron en el conjunto de ensayo (no se muestran los datos). De forma importante, la firma de proteínas, definida por el entrenamiento y utilizada para la clasificación de las muestras de ensayo, es específica de adenocarcinomas de páncreas y difiere de las firmas séricas encontradas en la configuración de micromatriz de los inventores en otros cánceres, tales como adenocarcinomas gástricos (9) y de mama (manuscrito en preparación). Se confirmaron también algunos de los datos de la micromatriz analizando algunas de las proteínas séricas mediante el enzoinmunoanálisis de adsorción (Figura 1D). Sin embargo, el análisis basado en las medidas de la micromatriz es a menudo más sensible, en comparación con los enzoinmunoanálisis tradicionales. Por consiguiente, podrían validarse los analitos cuando el ELISA fuera suficientemente sensible, pero a continuación se confirmaron los datos de la micromatriz de los inventores.

Aunque una detección temprana del cáncer tiene sus méritos, especialmente en el cáncer de páncreas, se ha sugerido también el perfil de proteínas séricas como la solución para definir firmas que, además de clasificar cáncer frente a normal, pudiera también asociarse con parámetros clínicos (16). Ser capaces de prever el tiempo de supervivencia podría ser de gran relevancia, debido a que esto podría afectar las pautas terapéuticas asignadas a cada paciente. Por consiguiente para interrogar la plataforma de micromatriz de anticuerpos recombinantes de los

inventores, estos compararon dos grupos de pacientes con cáncer divididos en supervivientes a corto plazo (<12 meses) frente a supervivientes a largo plazo (>24 meses). En primer lugar, los inventores calcularon el área bajo las curvas de rendimiento diagnóstico (AUROC), como una función del número total de analitos definidos por anticuerpo en una firma predictiva, utilizando un ensayo de Wilcoxon para filtrar los analitos, seguido por una máquina de soporte vectorial (Figura 2A). Estos cálculos incluyeron los 129 anticuerpos y puesto que los inventores disponían de 1 a 4 anticuerpos/analitos del suero, estuvo presente una determinada redundancia en el tamaño del biomarcador de la firma predictiva. A partir de estos cálculos, fue evidente que podrían discriminarse los dos grupos, con un área bajo ROC (AUC) de >0,80. Para resaltar, esta curva demostró también que una firma de proteínas consistente en <26 analitos proporcionó un predictor más variable y menos sólido. Por consiguiente, los inventores seleccionaron una firma de predictores consistente en 29 analitos, para el análisis adicional. La curva bajo ROC de los 29 analitos tiene un área bajo la curva de 0,86 (Figura 2B).

De nuevo, para ilustrar la capacidad predictiva de esta firma de biomarcadores, los pacientes con cáncer de páncreas (n = 23), que comprendían los supervivientes a corto plazo y los supervivientes a largo plazo, se dividieron de forma aleatoria en un conjunto de entrenamiento de 13 pacientes y un conjunto de ensayo de 10 pacientes. Debido a que la supervivencia promedio para los pacientes con enfermedad no extirpable sigue siendo de 5-6 meses, hubo un sesgo inevitable en el tamaño del grupo, y el grupo de los supervivientes a largo plazo consistió solo en 5 pacientes. Se entrenó una SVM con la firma de biomarcadores seleccionada por el conjunto de entrenamiento y podría a continuación clasificarse el conjunto de ensayo, tal como se muestra en la Figura 2C. Todos los pacientes que sobrevivieron <12 meses se clasificaron correctamente, utilizando un valor de previsión de la SVM de <0, que se consideró la clasificación más importante. Un superviviente a largo plazo se clasificó de manera incorrecta. Los 29 analitos más significativos que separan los supervivientes a largo plazo y los supervivientes a corto plazo entre los 23 pacientes en un ensayo de Wilcoxon corresponden a 22 proteínas séricas no redundantes (7 de los 29 analitos estaban duplicados pero definidos por clones de anticuerpo diferentes). Esta novedosa firma de predictores, representados por 22 proteínas no redundantes, y la respuesta de analitos diferenciales expresada por supervivientes a corto y a largo plazo, respectivamente se muestran como una cartografía térmica en la Figura 2D. Cuando se analizaron las proteínas individuales no hubo una configuración estricta de consenso entre las proteínas séricas, aunque fue evidente que las citoquinas, tales como IL-1a, IL-3, IL-8, e IL-11 estaban reguladas por exceso en los supervivientes a corto plazo, mientras que Rantes, IL-16, IL-4 y eotaxin estuvieron reguladas por exceso en mayor grado en los supervivientes a largo plazo (Figura 2D). La significancia de esto sigue siendo validada pero podría indicar posiblemente un compartimento de linfocitos T activos en la última población.

#### Discusión

Las micromatrices de anticuerpos, como herramienta en la proteómica de afinidad, han evolucionado durante los últimos años desde una herramienta prometedora a una solución que comienza a procurar resultados prometedores en la oncoproteómica (3, 12, 20, 21). El principal foco en este empeño es detectar el cáncer en una etapa temprana para prever la recidiva del tumor y la resistencia al tratamiento, o para seleccionar pacientes para una pauta terapéutica concreta (3). Estos es de particular importancia para cánceres con pronósticos malos, que es una característica intrínseca al cáncer de páncreas debido a que metastatiza rápidamente por ejemplo, hacia los ganglios linfáticos, los pulmones, el peritoneo (4, 23) y es difícil de diagnosticar en una etapa temprana. Sin embargo, la capacidad de una firma de biomarcadores para distinguir entre diferentes carcinomas o entre cáncer e inflamación ha sido hasta ahora difícil de conseguir (para una revisión, véase la ref. 3) (20). El motivo para la distinción observada entre proteomas séricos de cáncer y normales en este estudio es más probable que sea dependiente de la gama de especificidades de anticuerpos en la micromatriz, que está también recientemente apoyada por la matriz designada lógicamente, notificada por Sanchez-Carbayo y col. (21). Estos investigadores podían clasificar pacientes con tumores de vejiga en función de su supervivencia global utilizando anticuerpos generados contra productos génicos expresados diferencialmente. Durante los últimos años, los inventores han desarrollado una plataforma de micromatriz de anticuerpos recombinantes de alto rendimiento para el análisis complejo del proteoma (6, 9, 11, 12, 14, 15), evaluando y optimizando los parámetros tecnológicos clave (24), tales como un diseño de sonda y sustrato (13, 25), diseño de matriz/ensayo (9, 15) y un formato de muestra (9, 14, 15). Esto ha permitido su uso para llevar a cabo el primer perfil de expresión de proteínas diferencial del proteoma de plasma humano, utilizando las micromatrices de scFv optimizadas, que dirigen principalmente las proteínas inmunoreguladoras. De acuerdo con los resultados previos, estas micromatrices de anticuerpos presentan sensibilidades en el intervalo pM a fM, detectando fácilmente las citoquinas poco abundantes. Además, los inventores han mantenido una reproducibilidad del ensayo con un coeficiente de correlación en el intervalo de 0,96 – 0,99, que es una característica clave del análisis multiplexado y que se compara bien con otros informes (12, 26). Además, los datos de la micromatriz de anticuerpos se compararon con ELISA y, cuando fueron suficientemente sensibles, este ensayo convencional corroboró los resultados de los inventores.

Los pacientes con cáncer de páncreas se diagnostican a menudo de forma tardía, dando como resultado un pronóstico malo. Debido a la baja incidencia es difícil recopilar grandes cantidades de muestras, especialmente de los supervivientes a largo plazo, es decir >24 meses. Los inventores han tenido acceso a 25 pacientes para este estudio, que utilizando una rigurosa evaluación estadística les ha permitido utilizarlo para clasificar proteomas de cáncer y proteomas normales. Esta es una clasificación supervisada y los inventores han empleado una máquina de soporte vectorial como clasificador, aunque los inventores han obtenido resultados muy similares para este conjunto

de datos con un clasificador bayesiano no utilizado aún (no se muestran los datos). La SVM separó los dos grupos mediante el hallazgo de un hiperplano en el espacio de todos los analitos, y asignó muestras en un lado del hiperplano a uno de los grupos y aquellas en el otro lado al otro grupo. La distancia al hiperplano se denomina valor de previsión o decisión (Figura 2C). El hiperplano y, de esta manera, la clasificación de los grupos, se encontraron utilizando el conjunto de entrenamiento de los inventores. A continuación se estimó el rendimiento del clasificador posteriormente, utilizando un conjunto de ensayo, donde no se permitió el solapamiento entre el conjunto de entrenamiento y el de ensayo. Sin embargo, un conjunto de datos se puede dividir aleatoriamente en diferentes conjuntos de entrenamiento y ensayo, que se utilizan a continuación para entrenar y ensayar el clasificador, respectivamente. El inconveniente de esto es que el resultado final depende de la división entre el conjunto de entrenamiento y el de ensayo. Por consiguiente, los inventores utilizaron la validación cruzada como procedimiento para preparar algunas divisiones del conjunto de datos de los mismos y se utilizó el rendimiento promedio de los conjuntos de ensayos como una medida de precisión de la clasificación de los datos. Por consiguiente, en la validación cruzada que deja fuera un elemento en cada iteración que se llevó a cabo, el conjunto de ensayo contiene una muestra y el conjunto de entrenamiento contiene el resto. Se puede medir el rendimiento de la SVM mediante la curva bajo ROC y, en particular, el área bajo la curva de ROC. Las muestras de carcinoma normal y de páncreas quedaron notablemente bien separadas, ya que la SVM clasificó todas las muestras correctamente con un hueco entre los dos grupos. La extrapolación de los valores de decisión proporcionó sensibilidad (99,9 %) y especificidad (99,3 %) muy altas, mostrando que podría llevar cientos de muestras obtener una clasificación incorrecta

En este estudio, los inventores no pudieron comparar los cánceres de páncreas con un grupo de pacientes con pancreatitis, que podría haber sido una comparación deseable, pero los inventores, en vez de ello, utilizaron muestras de suero normales. Es de resaltar, que el presente cáncer de páncreas asociado con la firma de biomarcadores tenía, sin embargo solamente eotaxin, IL-5 e IL-13 en común con los catorce biomarcadores encontrados como resultado de la infección bacteriana, asociados con otro cáncer gastrointestinal (12), lo que indicó que la firma pancreática no estaba relacionada con la inflamación general. Además, esta firma no fue similar a los biomarcadores encontrados en el lupus sistémico eritematoso, un trastorno autoinmune con un significativo componente inflamatorio (Wingren y col., manuscrito en preparación). La firma fue también completamente diferente de la de Orzechowski y col., notificada (26) donde se llevó a cabo el perfil de las muestras en suero de cáncer de páncreas utilizando una micromatriz basada en anticuerpos monoclonales y policlonales. Las proteínas séricas muy abundantes dirigidas, tales como albúmina, transferrina y hemoglobina, así como los marcadores de inflamación más comunes, tales como la proteína c reactiva (CRP), la proteína amiloide A y las inmunoglobulinas séricas, mientras que solamente se analizaron ocho citoquinas. Por otra parte, la firma de cáncer presente de los inventores contenía un número de citoquinas TH2 expresadas en exceso (IL-4, 5, 10 y 13) mientras que las citoquinas TH1 clásicas (IL-12 y TNF- $\beta$ ) estaban reguladas por defecto, lo que también estaba de acuerdo con el estudio de Belone y col., que mostraron que TGF- $\beta$  e IL-10 estaban reguladas en exceso en el suero de cáncer de páncreas (27). Estos autores mostraron también que los monocitos derivados de sangre de pacientes con cáncer de páncreas desarrollaron desde un principio una respuesta análoga a TH2, con una creciente expresión de IL-4 y una disminución en la expresión de IL-12.

Finalmente, los inventores investigaron la posibilidad de identificar una firma, que además de ser capaz de clasificar las muestras de cáncer frente a las muestras normales, pudiera también utilizarse para prever la supervivencia del paciente. Inicialmente, la SVM podría clasificar los supervivientes a corto y a largo plazo con un área bajo ROC de 0,81, utilizando todos los analitos (no se muestran los datos), lo que fue muy prometedor. A continuación se preparó un clasificador para cada cantidad de biomarcadores, seleccionando los analitos más significativos, que posteriormente se utilizó para distinguir los dos grupos de muestras en el conjunto de entrenamiento. Como se observa en la Figura 2A, el rendimiento del clasificador fue estable por encima de 26 analitos, y los inventores pudieron demostrar que una firma de 29 biomarcadores (22 analitos no redundantes) proporcionaba un ROC de 0,86. Un estudio con más de 18 supervivientes a corto plazo y 5 supervivientes a largo plazo es, sin embargo, necesario para establecer firmemente un perfil de proteínas para la clasificación de supervivencia, pero este estudio establece ciertamente la posibilidad de dicho perfil.

En conclusión, al utilizar una micromatriz de anticuerpos recombinantes contra proteínas reguladoras, los inventores han sido capaces de detectar de forma específica el adenocarcinoma de páncreas y discriminar completamente entre proteomas séricos de cáncer frente a suero normal. Lo más importante es que se presenta el primer intento para definir una firma capaz de prever la supervivencia de pacientes con cáncer, indicando la potencia de afinidad oncoproteómica para la toma de decisiones clínicas.

## Referencias

1. Rosenwald A. y col. *Cancer Cell* 3, 195-197 (2003).
2. van de Vijver, y col. *N. Eng. J. Med* 347, 1999-2009 (2002).
3. Borrebaeck, C.A.K. *Expert Opin. Biol. Ther* 6, 833-838 (2006).
4. Garcea, G., Neal, C.P., Pattenden, C.J., Steward, W.P. y Berry, D.P. *Eur. J. Cancer* 41, 2213-2236 (2005).
5. Yeo, T.P. y col. *Curr. Probl. Cancer* 26, 176-275 (2002).
6. Wingren, C. y Borrebaeck, C.A.K.. *Exp. Rev. Proteomics* 1, 355-364 (2004).

7. Pavlickova, P., Schneider, M.E., y Hug, H., Clin. Chim. Acta 342, 17-35 (2004).
8. Haab, B.B, y col. Genome Biol. 2, 1-13 (2001).
9. Wingren, C., y col., Microarrays based on affinity tagged single-chain Fv antibodies: sensitive detection of analyte in complex proteomes. Proteomic 5, 1281-1291 (2005).
- 5 10. Pawlak, M. y col. Proteomics 2, 383-393 (2002).
11. Wingren, C. y Borrebaeck, C.A.K OMICS 3, 411-427 (2006).
12. Ellmark, P., y col., Identification of protein expression signatures associated with H. pylori infection and gastric adenocarcinoma using recombinant antibody microarrays. Mol Cell Proteomics 5, 1638-1646 (2006).
- 10 13. Soderlind, E., y col., Recombining germline-derived CDR sequences for creating diverse single framework antibody libraries. Nat. Biotechnol, 18, 852-856 (2000)
14. Ingvarsson, J.; Larsson, A.; Sjöholm, L.; Truedsson, L.; Jansson, B.; Borrebaeck, C. A.K. y Wingren, C. Design of recombinant antibody microarrays for serum protein profiling: Targeting of complement proteins. J. Proteome Res.in press
- 15 15. Wingren, C., Ingvarsson, J., Dexlin, L., Szul, D. y Borrebaeck, CAK. Design of recombinant antibody microarrays for complex proteome analysis: choice of sample labelling-tag and solid support. Proteomics in press
16. Eisen, M.B., y col., Cluster analysis and display of genome-wide expression patters. Proc Natl Acad Sci U S A. 95, 14863-14868 (1998).
- 20 17. N. Cristianini y J. Shawe-Taylor, An introduction to support vector machines (and other kernel based learning methods), Cambridge University Press (2000).
18. Chih-Chung Chang y Chih-Jen Lin, LIBSVM: a library for support vector machines, available at <http://www.csie.ntu.edu.tw/~cjlin/libsvm>
19. R. Ihaka y R. Gentleman, R: A language for data analysis and graphics, J. Comp. Graph Stat. 5, 299-314, (1996)
- 25 20. Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Lozano, J.J., Haab, B.B. y Cordon-Cardo, C. Am. J. Pathol. 168, 93-103 (2006).
21. Schafer, M.W., Mangold, L., Partin, A.W. y Haab, B.B. (2007) Antibody array profiling reveals serum TSP-I as a marker to distinguish benign from malignant prostatic disease, The Prostate 67, 255-267.
22. Rustgi, A.K. Gastroenterology 129, 1344-1347 (2005).
- 30 23. More, G., y col. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 102, 7677-7682 (2005).
24. Wingren, C. and Borrebaeck, C.A.K. (2007) nya reviewn
25. Steinhauer, C., y col., Biocompatibility of surfaces for antibody microarrays: design of macroporous silicon substrates. Anal Biochem 341, 204-13 (2005)
- 35 26. Orchekowski, R., y col., Antibody microarray profiling reveals individual and combined serum proteins associated with pancreatic cancer. Cancer Res. 65, 11193-202 (2005)
27. Bellone, G., y col., Tumor-associated transforming growth factor-beta and interleukin-10 contribute to a systemic Th2 immune phenotype in pancreatic carcinoma patients. Am J Pathol. 155, 537-47 (1999)

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para determinar la presencia de adenocarcinoma de páncreas en un individuo que comprende las etapas de:
- a) proporcionar una muestra de suero o plasma para ensayar;
  - b) determinar una firma de proteínas de la muestra de ensayo midiendo la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1;
- 10 donde las dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 incluyen IL-5, y donde la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 es indicativa de la presencia de adenocarcinoma de páncreas.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además las etapas de:
- c) proporcionar una muestra de suero o plasma de control procedente de un individuo que no padece un adenocarcinoma de páncreas;
  - d) determinar una firma de proteínas de la muestra de control midiendo la presencia y/o la cantidad en la muestra de control de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b);
- 20 donde la presencia de un adenocarcinoma de páncreas se identifica en el caso de que la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b) sea diferente de la presencia y/o la cantidad en la muestra de control de las dos o más proteínas medidas en la etapa (b).
- 25 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 donde la etapa (b) comprende medir la presencia y/o la cantidad en la muestra de ensayo de todas las proteínas definidas en la Tabla 1.
- 30 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 donde la etapa (b) y/o la etapa (d) se llevan a cabo utilizando un primer agente de unión capaz de unirse a las dos o más proteínas.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4 donde el primer agente de unión es un anticuerpo o un fragmento del mismo.
- 35 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde las dos o más proteínas en la muestra de ensayo están marcadas con un resto detectable.
- 40 7. Una matriz para determinar la presencia de un adenocarcinoma de páncreas en un individuo que comprende dos o más agentes de unión tal como se ha definido en la reivindicación 4 o 5, donde la matriz comprende primeros agentes de unión para IL-5 y C5.
- 45 8. Uso de dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 como un marcador diagnóstico para determinar la presencia de un adenocarcinoma de páncreas en un individuo, donde las dos o más proteínas seleccionadas entre el grupo definido en la Tabla 1 incluyen IL-5.
- 50 9. Un kit para determinar la presencia de un adenocarcinoma de páncreas que comprende:
- A) dos o más primeros agentes de unión tal como se ha definido en la reivindicación 7, o una matriz de acuerdo con la reivindicación 7;
  - B) instrucciones para llevar a cabo el método tal como se define en una cualquiera de la reivindicación 1.

**Tabla 1**

Perfil de proteína sérica para distinguir pacientes normales frente a pacientes con cáncer de páncreas

<b>Proteína analito</b>
Rantes
Eotaxin
EI ( <i>es decir</i> , inhibidor de la esterasa C1
IL-8
MCP-1
TNF-b (1)
TNF-b (2)
GLP-1
VEGF
IL-5
IL-4
IL-13
angiomotin
C4
C3
Factor B
C5
CD40

Tabla 2

Firma de proteínas séricas para distinguir los supervivientes a corto plazo (<12 meses) frente a los supervivientes a largo plazo (>24 meses) entre los pacientes con cáncer de páncreas

<b><i>Proteína analito</i></b>
TGF-b1
Ligando de CD40
IL-4
Mucina
IL-16
Rantes
Eotaxin
C5
MCP-4
IL-11
TNF-b
IL-1ra
MCP-3
IL-1a
IL-8
IL-3
C3
Angiomotin
LDL (1)
LDL (2)
Factor B
Lewis Y

Tabla 3

129 fragmentos de anticuerpos recombinantes, dirigidos contra 60 proteínas séricas para uso en una micromatriz de la invención

Antígeno	número de clones de ScFv	Concentración <sub>1</sub> (µg/ml)
IL-1a	1	130
	2	130
	3	130
IL-1b	1	170
	2	130
	3	<100
IL-1m	1	400
	2	330
	3	330
IL-2	1	140
	2	160
	3	110
IL-3	1	130
	2	110
	3	<100
IL-4	1	<100
	2	170
	3	330
	4	<100
IL-6	1	110
	2	130
	3	130
IL-6	1	140
	2	<100
	3	420
	4	1390
IL-7	1	140
	2	<100
IL-8	1	370
	2	220
	3	330
IL-9	1	140
	2	510
	3	220
IL-10	1	130
	2	<100
	3	130
IL-11	1	330
	2	310
	3	330
IL-12	1	300
	2	170
	3	110
	4	220
IL-13	1	250
	2	230
	3	130
IL-19	1	<100
	2	<100
	3	130
IL-18	1	100
	2	160
	3	420

Tabla 3 (continuación)

TGF- $\beta$ 1	1	320
	2	400
	3	280
TNF- $\alpha$	1	410
	2	280
	3	150
TNF- $\beta$	1	180
	2	180
	3	350
	4	350
TNF- $\gamma$	1	350
	2	110
	3	350

Tabla 3 continuación

Antígeno	número de Clones de ScFv	Concentración <sub>1</sub> (µg/ml)
VEGF	1	160
	2	370
	3	400
	4	140
Angiotensin	1	510
	2	1500
MCP-1	1	<100
	2	420
	3	210
MCP-3	1	<100
	2	150
	3	<100
MCP-4	1	790
	2	<100
	3	470
Eotaxin	1	<100
	2	100
	3	<100
RANTES	1	330
	2	130
	3	<100
G-CSF	1	100
	2	170
	3	200
GM-CSF	1	1070
	2	1320
	3	450
	4	850
IL-1	1	350
	2	720
	3	410
	4	550
IL-1R	1	1110
	2	170
C1	1	300
	2	470
C5	1	1000
	2	220
Factor B	1	370
	2	1300
Properdina	1	650
Inhibidor de la esterasa	1	880
ligando de CD40	1	400
FBS	1	190
Leptina	1	190
LPS	1	570
	2	<100
Integrina α5-10	1	240
Integrina α5-11	1	240
Procatapina	1	130
Tirosina-proteína quinasa BTK	1	350
Tirosina-proteína quinasa JAK3	1	350
β-lactamasa	1	350
Leuco	1	350

Tabla 3 continuación

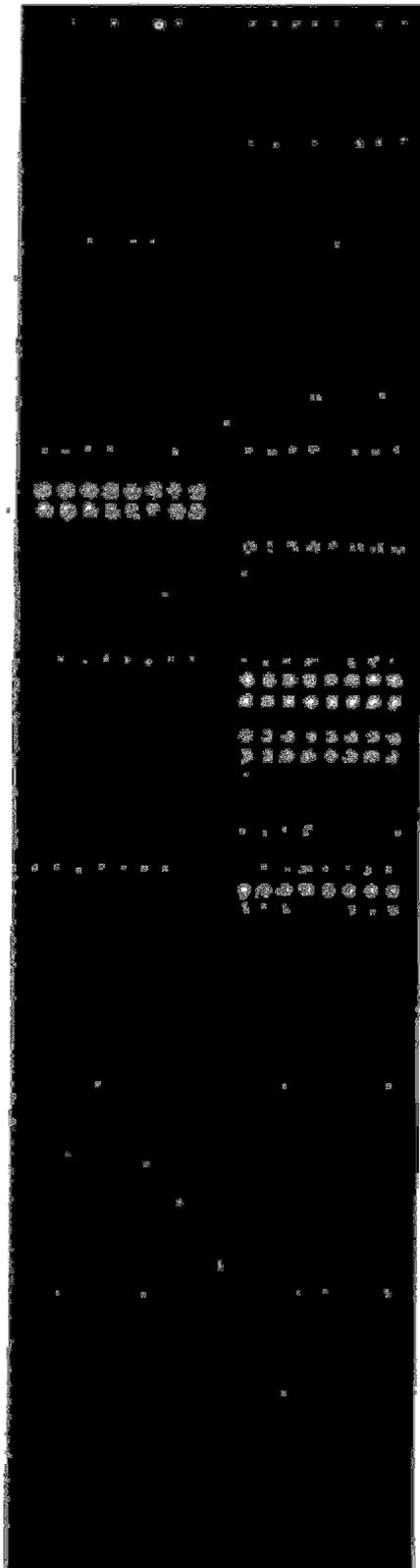
	2	280
Lewis'	1	710
Linfoma de linf. B sAg	1	630
Sialo Lewis'	1	140
MUC-1	1	<100
Estreptavidina (control)	1	390
Digoxina (control)	1	210
FITC (control)	1	250
TAT (control)	1	550
	2	500

Tabla 4  
Datos demográficos del paciente

Clase	n	Sexo	Edad	
			Media (SD)	Intervalo
PC*	11	M	74 (8)	60-85
	14	F	69 (14)	31-82
Normal	18	M	49 (23)	22-85
	2	F	28 (1)	27-39
Todos	45	MF	61 (21)	22-85

\* PC = adenocarcinoma de páncreas

Figura 1



8

Figura 1 (continuación)

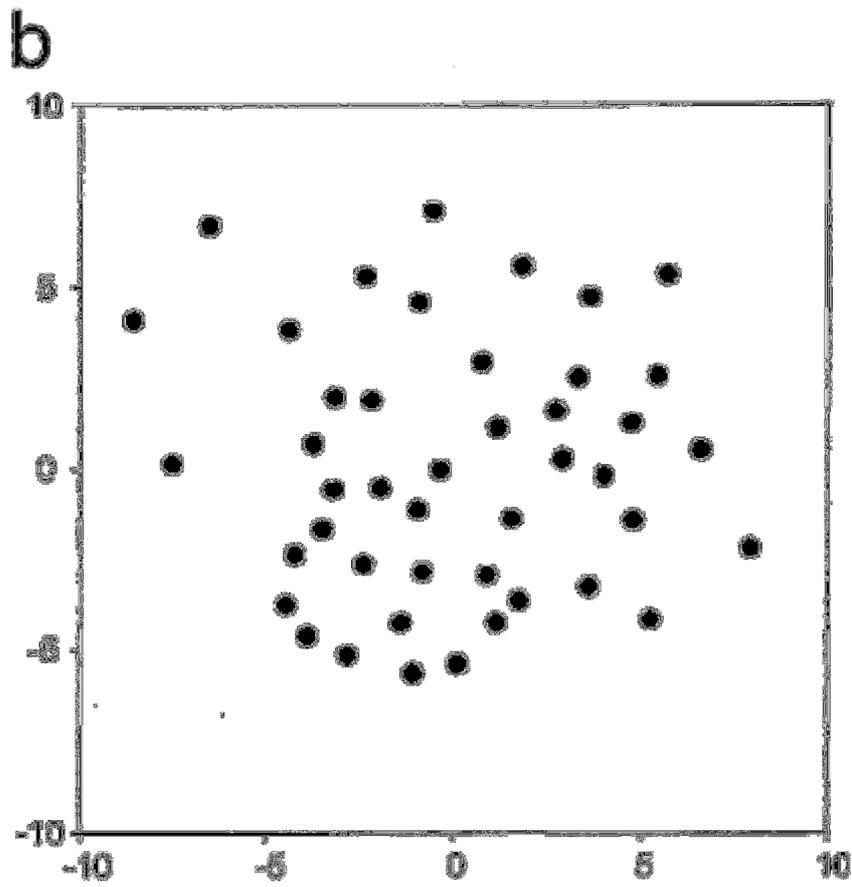


Figura 1 (continuación)

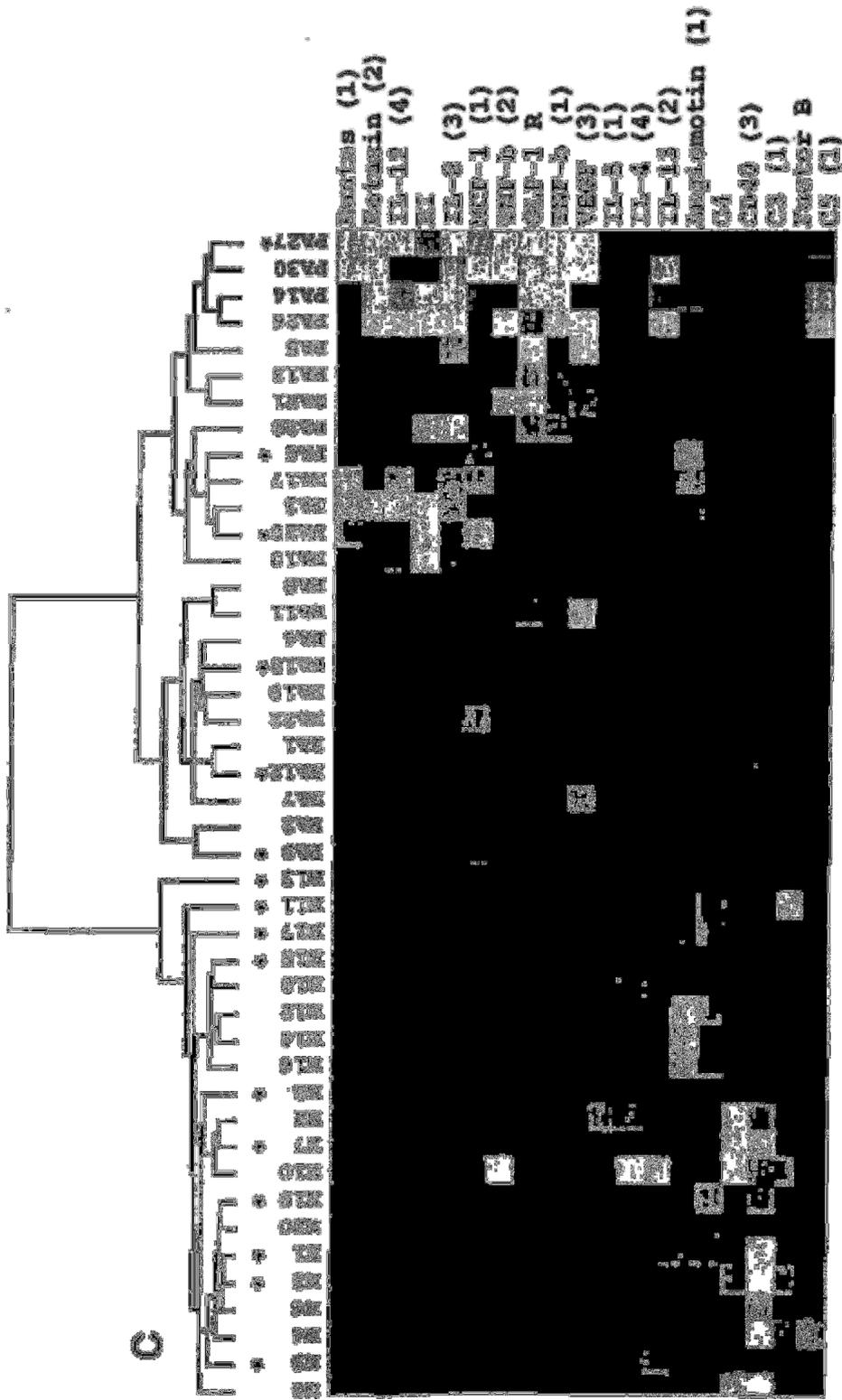


Figura 1 (continuación)

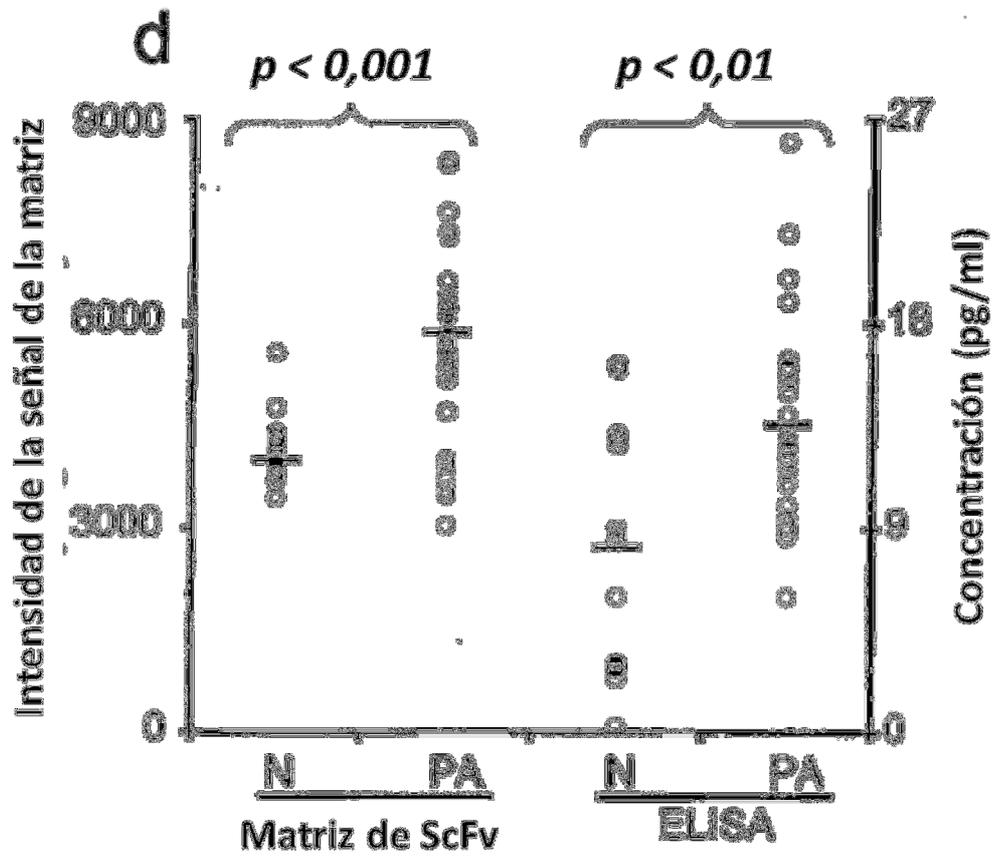


Figura 2

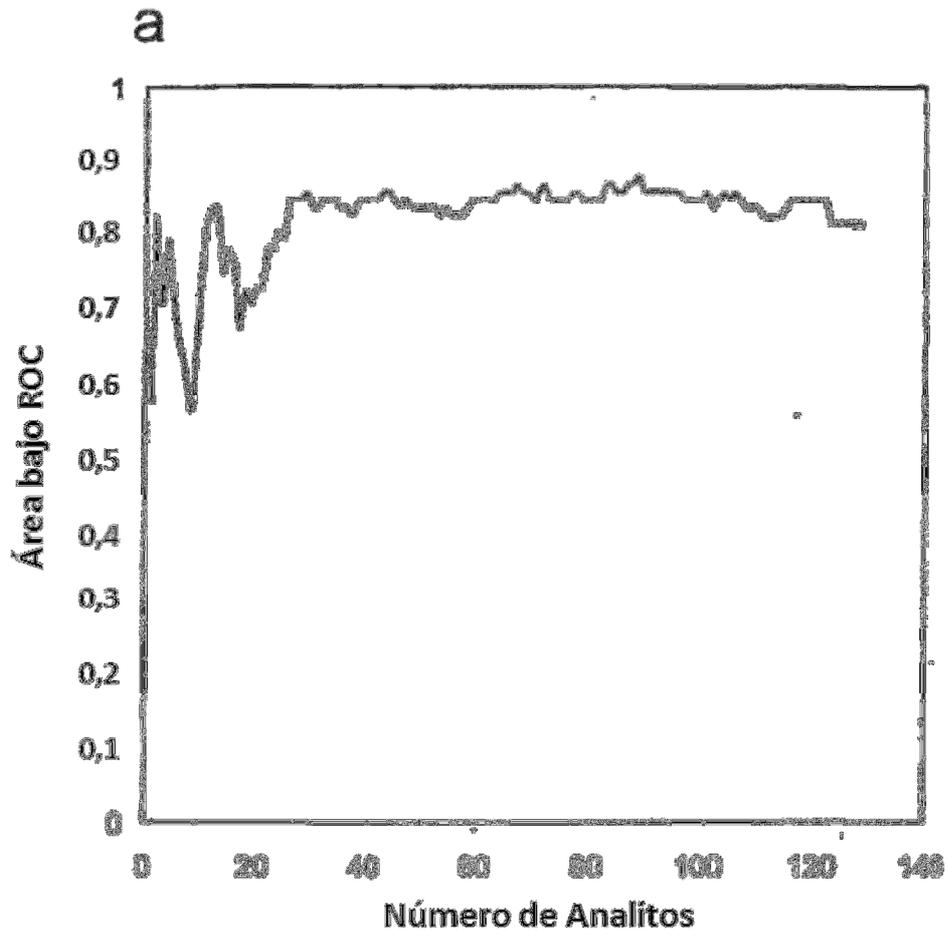


Figura 2 (continuación)

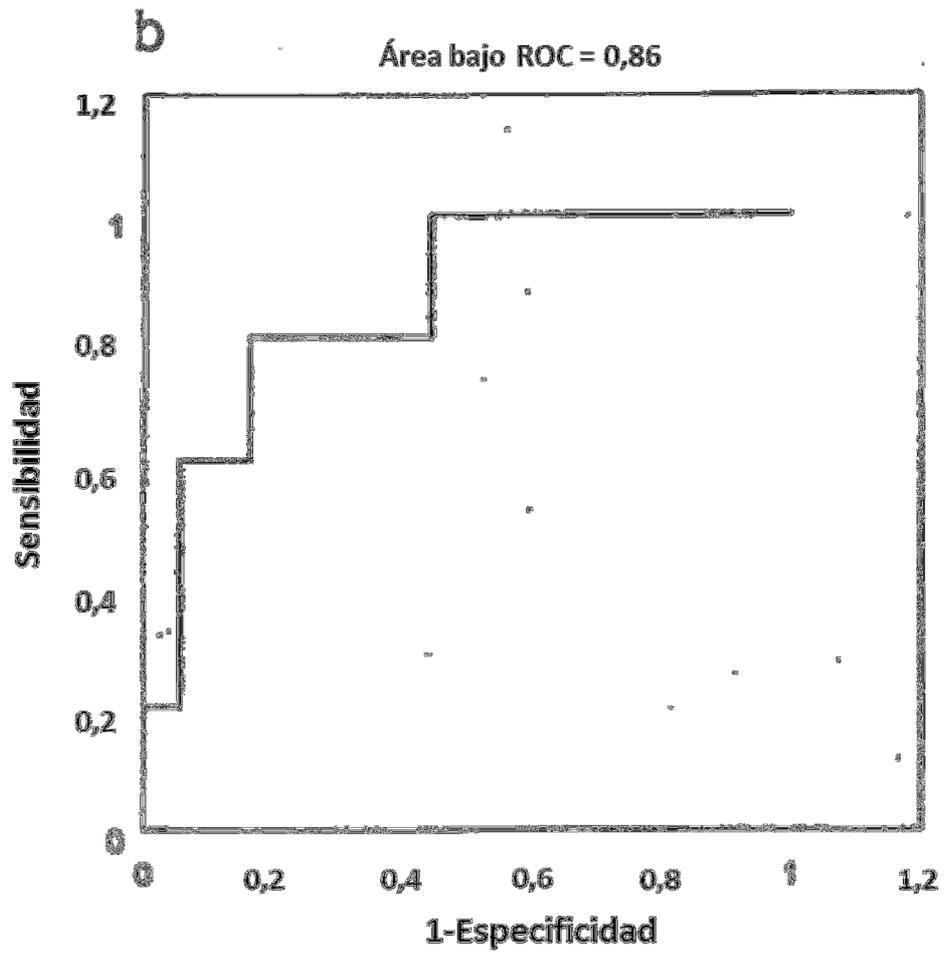


Figura 2 (continuación)

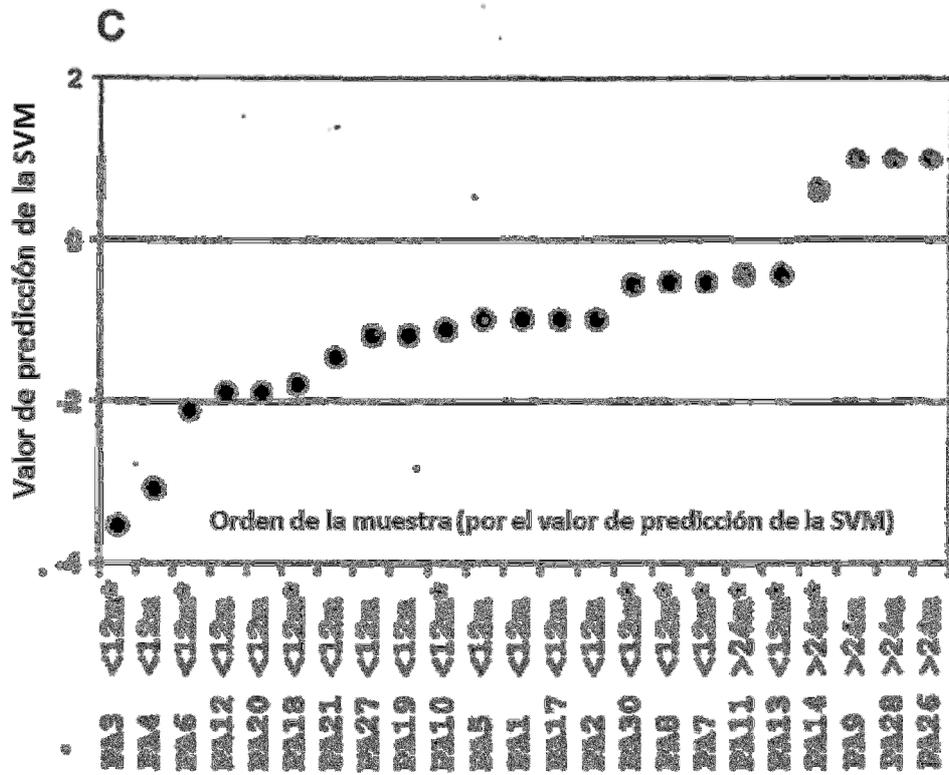


Figura 2 (continuación)



Figura 3

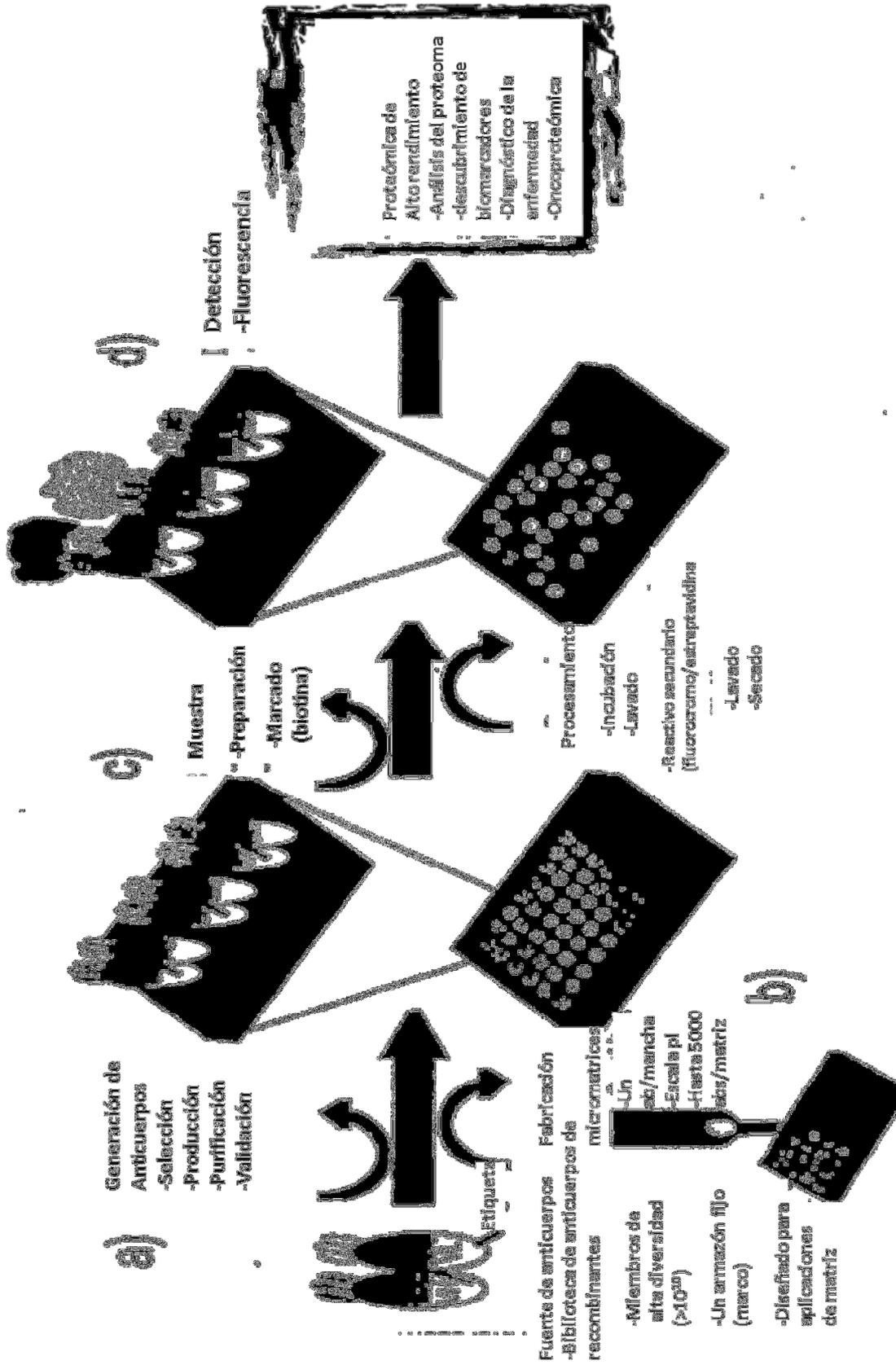


Figura 3 (continuación)

