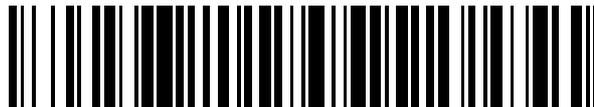


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 830**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2012 E 12168401 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.11.2014 EP 2525227**

54 Título: **Método para detectar el cáncer de páncreas mediante el marcador serológico ULBP2**

30 Prioridad:

19.05.2011 TW 100117502

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.01.2015

73 Titular/es:

**CHANG GUNG UNIVERSITY (A UNIVERSITY OF
TAIWAN) (100.0%)
259, Wen-Hwa 1st Road
Kwei-ShanTao-Yuan, TW**

72 Inventor/es:

**YU, JAU-SONG;
CHANG, YA-TING;
WU, CHIH-CHING;
SHYR, YI-MING y
CHANG, YU-SUN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 527 830 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

Método para detectar el cáncer de páncreas mediante el marcador serológico ULBP2

5 ÁMBITO DE LA PRESENTE INVENCION

Las formas de ejecución se refieren a un marcador serológico para detectar el cáncer de páncreas y a un método para usar el marcador serológico, en particular a un marcador serológico de gran sensibilidad y especificidad para detectar el cáncer de páncreas y a un método para usar el marcador serológico.

10

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

El cáncer de páncreas está clasificado en Estados Unidos y en Taiwan como el cuarto y décimo respectivamente en cuanto a mortalidad por cáncer y en estos años muestra una tendencia de mortalidad creciente. Como el páncreas se halla anatómicamente en un lugar más profundo y los síntomas aparentes de cáncer pancreático son tardíos, menos del 8% de los pacientes de cáncer de páncreas son diagnosticados en fase localizada y pueden ser curados quirúrgicamente. Más del 50% de los pacientes diagnosticados de cáncer de páncreas han presentado metástasis a distancia y su tasa de supervivencia a los 5 años ha sido inferior al 5%.

15

20

Bünger S y otros (J Cancer Res Clin Oncol. 137(3):375-89. Epub 31 dic. 2010. Serum biomarkers for improved diagnostic of pancreatic cancer: a current overview [*biomarcadores serológicos para un mejor diagnóstico del cáncer de páncreas: perspectiva actual*]) hicieron un resumen de los biomarcadores serológicos con potencial detector del cáncer de páncreas. Los autores repasaron 1180 artículos relevantes y seleccionaron 43 documentos de la base de datos PUBMED, en los cuales se comparaba y evaluaba el rendimiento diagnóstico de 41 marcadores serológicos individuales para detectar el cáncer pancreático. Este análisis reveló métodos para detectar el cáncer pancreático en una muestra de sangre obtenida de una persona examinada, empleando marcadores serológicos individuales tales como MIC-1, PAM4, OPN, HSP27, TPS, TSGF, CAM17.1, PF4 y CEACAM1, los cuales dieron valores superiores de rendimiento diagnóstico. Como la mayoría de estos marcadores serológicos se probaron en un pequeño grupo de muestras se necesitan más estudios de validación normalizados, haciendo ensayos múltiples en grandes grupo(s) de muestras multicéntricas, a fin de verificar su utilidad en el ámbito clínico. Dado que ninguno de estos 43 artículos mencionaba el ULBP2 (el marcador serológico en la presente invención) como un marcador serológico para detectar el cáncer de páncreas, se puede considerar que la presente invención aporta un biomarcador serológico alternativo para la detección del cáncer pancreático.

25

30

35

Onda y otros (Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jul 13; 285(2):235-43. A novel secreted tumor antigen with a glycosylphosphatidylinositol-anchored structure ubiquitously expressed in human cancers [*Nuevo antígeno tumoral secretado, con una estructura anclada en glicosilfosfatidilinositol, expresado ubicuamente en cánceres humanos*]) reportaron que el ALCAN (que es un sinónimo de ULBP2) sería una diana potencial para el diagnóstico del cáncer porque su ARNm se pudo detectar en líneas celulares de diversos tipos de cáncer humano (pulmonar, de mama, de colon, de próstata, neuroblastoma, glioma, leucemia, linfoma de células T y condrosarcoma), aunque no (o apenas) en varios órganos normales. Sin embargo los niveles de expresión y secreción de ALCAN varían drásticamente en líneas celulares distintas y, lo que es más importante, este artículo no establece ninguna relación entre el ALCAN y el cáncer de páncreas.

40

45

La patente WO 2011/050328 A2 (fecha de publicación: 28.04.2011. ASSESSMENT OF SOLID TUMOR BURDEN [*Estimación de la carga tumoral sólida*]) reveló un método para el cálculo del volumen de tumores sólidos basado en la medición de los niveles de expresión de uno o ambos ligandos activadores (ligandos NKG2D) del receptor de las células asesinas naturales (NK) en células de sangre periférica de muestras obtenidas de una persona examinada (reivindicación 1) y denominados ULBP2 como ejemplo de ligando NKG2D (reivindicación 2), tomando el cáncer de páncreas como un ejemplo de una lista de docenas de tipos de tumores sólidos (reivindicación 4). No obstante este artículo solo aportaba datos experimentales y ejemplos respecto a tres ligandos NKG2D (MICA, MICB y ULBP1) (reivindicación 3), utilizando muestras de pacientes con 4 tipos de cánceres (glioblastoma multiforme, carcinoma hepatocelular, cáncer de próstata o cáncer de mama) (reivindicación 5). Por lo tanto las reivindicaciones 2 y 4 solo representan dos "listas de preferencias" independientes que contienen una variedad de biomarcadores y tipos de cáncer, y no se revela la combinación particular de ULBP2 y cáncer pancreático de forma practicable. Además este artículo se centra en la medición de los niveles de ligando NKG2D en células de sangre periférica de muestras que pueden diferir de las de la presente invención (es decir, las muestras de suero). Este artículo tampoco revela la sobreexpresión de cualquiera de los ligandos NKG2D en células procedentes de cualquiera de las muestras de tejido analizadas.

50

55

60

65

Wrobel y otros (Scand J Immunol. 2007 Ago-Sept; 66(2-3):320-8. Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor-versus NKG2D-dependent recognition [Lisis de una amplia gama de células tumorales epiteliales mediante células T gamma delta humanas: participación de los ligandos NKG2D y receptores de células T frente al reconocimiento dependiente de NKG2D]) demostraron la expresión superficial de ligandos NKG2D (MICA/B y ULBP-1-3) en varias líneas celulares cancerosas epiteliales, incluyendo las líneas celulares de tumores pancreáticos PancTu1 y Pt45-P1. La liberación proteolítica de

ULBP2 de la superficie de las celulares tumorales también se menciona en la parte descriptiva de este artículo. Sin embargo este artículo se centra en investigación del papel de los ligandos NKG2D en la inmunoterapia del cáncer basada en células T, empleando el modelo de cultivo celular y no cita en absoluto los aspectos diagnósticos.

5 Los métodos actuales de diagnóstico del cáncer pancreático están basados principalmente en procedimientos de obtención de imágenes, tales como el sonar o la tomografía abdominal computada de alta resolución, que a veces se pueden combinar con una endoscopia invasiva o una colangiopancreatografía magnética nuclear para aumentar la eficacia de la detección. No obstante el volumen del cáncer pancreático en la fase inicial es demasiado pequeño para ser descubierto por métodos de imagen, lo cual dificulta en gran medida su detección. Con el desarrollo de la
10 diagnosis molecular y de la biología tumoral hay un marcador serológico, el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9), que se usa ampliamente para detectar el cáncer de páncreas. Sin embargo, según los conocimientos actuales, el CA 19-9 tiene ciertas desventajas en la detección del cáncer pancreático, tales como una sensibilidad y especificidad insuficientes y la incapacidad de detectar el cáncer de páncreas en su fase inicial. Por lo tanto el desarrollo de otros marcadores serológicos con el fin de superar los antedichos inconvenientes del CA 19-9 e incrementar la eficacia de la detección será un proyecto importante para mejorar el tratamiento del cáncer pancreático. Ello se logra según el contenido de la reivindicación 1.

RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCION

20 Según un aspecto de una forma de ejecución de la presente invención se proporciona un marcador serológico para detectar un cáncer pancreático con gran sensibilidad y especificidad, que comprende al menos una proteína 2 fijadora de UL16 (ULBP2). La expresión del ULBP2 es alta en los tejidos tumorales pancreáticos y en los pacientes de cáncer pancreático está incrementada significativamente respecto a las personas de salud normal. El nivel de ULBP2 también es significativamente superior en el cáncer de páncreas, comparado con los cánceres gástricos
25 (GC), de carcinoma nasofaríngeo (NPC) y de carcinoma colorrectal (CRC). Por consiguiente el ULBP2 puede ser un marcador serológico para detectar eficientemente el cáncer pancreático, comparando sus niveles en las muestras de sangre aisladas de un paciente y de una persona de salud normal.

30 Según otro aspecto de una forma de ejecución de la presente invención se emplea un inmunoensayo basado en microesferas, con el empleo de una proteína 2 fijadora de UL16 (ULBP2) como marcador serológico para detectar el cáncer de páncreas, que ha demostrado una sensibilidad excelente. La limitación del inmunoensayo basado en microesferas para la detección del cáncer pancreático es de 3,91pg/ml.

35 En otra forma de ejecución de la presente invención el ULBP2 se combina con un antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9) para mejorar la eficacia de la detección. El ULBP2 también es capaz de detectar el cáncer de páncreas en la fase inicial y su efecto detector es más preciso que el del CA 19-9.

40 Los objetivos y ventajas de la presente invención arriba mencionados resultarán evidentes para los especialistas en la materia después de ver las siguientes descripciones detalladas y las figuras adjuntas.

DESCRIPCIONES BREVES DE LAS FIGURAS

45 La fig. 1 es una curva de calibración estándar de un marcador serológico para detectar cáncer pancreático con el uso de un inmunoensayo basado en microesferas.

La fig. 2 es una curva característica de la acción receptora del ULBP2 y del CA19-9 en la detección del cáncer pancreático.

La fig. 3A muestra la eficiencia del ULBP2, CA19-9 y ULBP2 combinado con CA19-9 para detectar el cáncer pancreático en la fase T1/T2 de la clasificación TNM.

50 La fig. 3B muestra la eficiencia del ULBP2, CA19-9 y ULBP2 combinado con CA19-9 para detectar el cáncer pancreático en la fase N0 de la clasificación TNM.

La fig. 3C muestra la eficiencia del ULBP2, CA19-9 y ULBP2 combinado con CA19-9 para detectar el cáncer pancreático en la fase I-II de la estadificación total.

55 La fig. 4 muestra el ensayo inmunohistoquímico de las biopsias de tejido canceroso de 67 pacientes de cáncer pancreático, de modo que la tinción de ULBP2 es positiva en todas las biopsias (100%) y la expresión del ULBP2 es más significativa en el tejido canceroso que en el tejido no canceroso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA FORMA DE EJECUCIÓN PREFERIDA

60 Forma de ejecución 1: análisis y selección de un marcador serológico para detectar cáncer pancreático

En esta forma de ejecución el ULBP2 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:1)

Met Ala Ala Ala Ala Ala Thr Lys Ile Leu Leu Cys Leu Pro Leu Leu Leu Leu
 Leu Ser Gly Trp Ser Arg Ala Gly Arg Ala Asp Pro His Ser Leu Cys Tyr Asp Ile
 Thr Val Ile Pro Lys Phe Arg Pro Gly Pro Arg Trp Cys Ala Val Gln Gly Gln Val
 Asp Glu Lys Thr Phe Leu His Tyr Asp Cys Gly Asn Lys Thr Val Thr Pro Val
 Ser Pro Leu Gly Lys Lys Leu Asn Val Thr Thr Ala Trp Lys Ala Gln Asn Pro Val
 Leu Arg Glu Val Val Asp Ile Leu Thr Glu Gln Leu Arg Asp Ile Gln Leu Glu
 Asn Tyr Thr Pro Lys Glu Pro Leu Thr Leu Gln Ala Arg Met Ser Cys Glu Gln
 Lys Ala Glu Gly His Ser Ser Gly Ser Trp Gln Phe Ser Phe Asp Gly Gln Ile Phe
 Leu Leu Phe Asp Ser Glu Lys Arg Met Trp Thr Thr Val His Pro Gly Ala Arg
 Lys Met Lys Glu Lys Trp Glu Asn Asp Lys Val Val Ala Met Ser Phe His Tyr
 Phe Ser Met Gly Asp Cys Ile Gly Trp Leu Glu Asp Phe Leu Met Gly Met Asp
 Ser Thr Leu Glu Pro Ser Ala Gly Ala Pro Leu Ala Met Ser Ser Gly Thr Thr Gln
 Leu Arg Ala Thr Ala Thr Thr Leu Ile Leu Cys Cys Leu Leu Ile Ile Leu Pro Cys

5 El especialista en la materia entiende que la sustitución de cualquier aminoácido por otro de características similares producirá una pequeña variación en la SEQ ID NO:1 original. No obstante una secuencia con una similitud mayor del 95% a la SEQ ID NO:1 es considerada como un marcador serológico para detectar cáncer pancreático que se puede emplear en esta forma de ejecución.

Forma de ejecución 2: expresión del marcador serológico ULBP2 en los tejidos de cáncer pancreático

10 Ensayo inmunohistoquímico: en esta forma de ejecución se aplica un anticuerpo de cabra anti-ULBP2. Se aísla una biopsia de tejido y se calienta en un tampón de ácido cítrico 0,01 M (pH 6,0). Se añade un tampón de bloqueo y se hace reaccionar 5 minutos a temperatura ambiente. La biopsia de tejido se hace reaccionar con el anticuerpo anti-ULBP2 (dilución 1:20) a 4°C durante 16 horas. Luego la biopsia de tejido se tiñe con N-Histofine® (Nichirei, Japón) a temperatura ambiente y después se trata con substrato DAB (Novocastra/Leica Microsystems, IL, USA). La biopsia
 15 de tejido se contratiñe asimismo con hematoxilina. El nivel de expresión de las proteínas diana se evaluó según el sistema de calificación H simplificado, el cual se basa en la intensidad de la tinción celular [3 (fuerte), 2 (moderada), 1 (débil) o 0 (sin tinción celular)] y en el porcentaje de la misma 3 (≥ 90%), 2 (50-89%), 1 (10-49%) o 0 (0-9%)]. Las dos calificaciones se multiplicaron una por otra y el resultado se dividió por 3 para obtener la calificación final. La tinción positiva se definió una calificación final ≥ 0,67.

20 Con referencia a la fig. 4, el ensayo inmunohistoquímico de las biopsias de tejido canceroso de 67 pacientes de cáncer pancreático demuestra que la tinción de ULBP2 es positiva en todas las biopsias (100%). Asimismo, la expresión del ULBP2 es más significativa en el tejido canceroso que en los tejidos adyacentes no cancerosos (la intensidad del color marrón indica el nivel de expresión del ULBP2). El nivel medio de expresión del ULBP2 en el tejido canceroso y en el tejido adyacente no canceroso da un valor de 2,71 ± 0,49 y 1,89 ± 0,74 respectivamente.
 25 Además, haciendo referencia a la tabla 1, la expresión del ULBP2 en esta forma de ejecución no está influida por síntomas patológicos clínicos tales como el sexo, la edad, el grado histológico, el estado global del cáncer o la clasificación TNM. El resultado de la detección del ULBP2 tiene una gran consistencia en pacientes con síntomas patológicos clínicamente diferentes.

30

Tabla 1. Correlación entre las características clínico-patológicas y la expresión del ULBP2 en 67 pacientes de cáncer de páncreas

Características	Paciente nº	Valor IHQ (media ± DE) ^a	Valor <i>p</i>
Sexo			
Hombre	44	2,64 ± 0,54	0,180 ^b
Mujer	23	2,83 ± 0,36	
Edad (años)			
< 64 ^c	33	2,61 ± 0,55	0,089 ^b
≥ 64	34	2,80 ± 0,41	
Grado histológico ^d			
Bien diferenciado	23	2,71 ± 0,59	0,746 ^c
Diferenciación moderada	31	2,68 ± 0,44	
Poco diferenciado	10	2,70 ± 0,48	
Estado global			
Fase I	9	2,52 ± 0,82	0,593 ^e
Fase II	56	2,73 ± 0,43	
Fase IV	2	3,00 ± 0,00	
Clasificación tumor-nodo-metástasis (TNM)-T			
TNM-T2	9	2,52 ± 0,82	0,653 ^b
TNM-T3	58	2,74 ± 0,42	
Clasificación TNM-N			
TNM-N0	25	2,69 ± 0,59	0,806 ^b
TNM-N1	42	2,72 ± 0,43	
Clasificación TNM-M			
Ninguna metástasis	65	2,70 ± 0,50	0,479 ^b
Metástasis distante	2	3,00 ± 0,00	

^a Se multiplicaron uno por otro los valores de intensidad y porcentaje de tinción celular y el resultado se dividió por 3 para obtener los valores IHQ finales.

^b Por la prueba de Wilcoxon.

^c Mediana.

^d Falta la información del grado histológico en 3 pacientes.

^e Por la prueba de Kruskal-Wallis.

5 Forma de ejecución 3: niveles del marcador serológico ULBP2 del cáncer pancreático en las muestras de suero de pacientes de cáncer de páncreas

10 Para detectar el nivel de ULBP2 en una muestra de suero se usa un inmunoensayo basado en microesferas. Un anticuerpo de ULBP2, empleado como anticuerpo de captura, se acopla previamente a microesferas COOH, usando el Bio-Plex Amine Couplin Kit (Bio-Rad). Como anticuerpo de detección se usa un anticuerpo anti-ULBP2 conjugado con biotina. Las microesferas con el anticuerpo de captura se añaden a una placa de microvaloración de 96 pocillos con fondo filtrante (Millipore). Luego la solución de muestra de suero o la solución estándar que contiene proteína ULBP2 a varias concentraciones ($3,91 \sim 3,2 \times 10^4$ pg/ml) se añade al pocillo para reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora. Después de lavar la solución de muestra de suero o la solución estándar se añade el anticuerpo de detección a cada pocillo y se deja reaccionar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 hora. Después de eliminar por lavado el anticuerpo de detección se agrega la solución de estreptavidina conjugada con ficoeritrina durante 10 minutos para permitir la unión entre la estreptavidina y la biotina. La estreptavidina no unida se elimina en una etapa de lavado. El nivel de ULBP2 en la muestra de suero se calcula luego mediante la intensidad de fluorescencia de la ficoeritrina, basándose en la intensidad de fluorescencia de la curva de calibración estándar.

20 Haciendo referencia a la fig. 1, el ULBP2 en la muestra de suero es muy fácil de detectar mediante el inmunoensayo basado en microesferas. La concentración de ULBP2, que varió de 4,3 pg/ml hasta 31,9 ng/ml, se detecta de modo preciso en esta forma de ejecución, lo cual no sucede de manera estable y exacta en un ensayo ELISA sándwich. El nivel de ULBP2 está notablemente aumentado en las muestras de suero canceroso ($200,2 \pm 168,6$ pg/ml) respecto a las muestras de control sanas ($51,4 \pm 64,6$ pg/ml). Si se elige un valor límite de 60 pg/ml para el ULBP2, los valores de sensibilidad y especificidad en la detección del cáncer son del 83,8% y 73,9%, respectivamente. Estos hallazgos indican que el ULBP2 es un nuevo marcador serológico para la detección del cáncer pancreático. Sin embargo los niveles de ULBP2 en suero no están relacionados estadísticamente con la edad, el sexo, el grado histológico, el estado global del tumor y la clasificación TNM de los cánceres pancreáticos en este estudio de control de casos (tabla 2).

Tabla 2. Correlación de ULBP2 y CA19-9 en suero con las características clínico-patológicas en 154 pacientes de cáncer de páncreas

Características	n°	ULBP2 (pg/ml) media ± DE) ^a	Valor p	CA19-9 (U/ml) media ± DE) ^a	Valor p
Sexo					
Hombre	111	199,5 ± 168,4		64,7 ± 24,6	
Mujer	43	202,0 ± 170,8		60,1 ± 23,7	
Edad (años)					
< 70 ^b	75	200,4 ± 182,9		60,2 ± 26,0	
≥ 70	79	199,9 ± 154,9		66,4 ± 22,5	
Grado histológico^c					
Bien diferenciado	12	148,8 ± 101,0	0,377 ^d	70,0 ± 13,7	0,553 ^d
Diferenciación moderada	102	198,7 ± 173,1		59,8 ± 26,0	
Poco diferenciado	14	134,4 ± 99,9		58,7 ± 25,2	
Estado global^c					
Fase I-II	106	181,2 ± 158,8		60,7 ± 24,4	
Fase III-IV	22	215,3 ± 178,5		60,4 ± 28,9	
Clasificación tumor-nodo-metástasis (TNM)-T^c					
TNM-T1	7	251,0 ± 150,0	0,418 ^d	62,1 ± 20,5	0,536 ^d
TNM-T2	27	194,0 ± 192,9		54,8 ± 28,4	
TNM-T3	77	175,1 ± 150,5		61,8 ± 24,0	
TNM-T4	17	204,0 ± 171,1		63,9 ± 26,8	
Clasificación TNM-N^c					
TNM-N0	57	191,6 ± 155,2		62,1 ± 25,5	
TNM-N1	71	183,4 ± 168,5		59,4 ± 24,9	
Clasificación TNM-M^c					
Ninguna metástasis	125	190,5 ± 162,4		60,9 ± 25,2	
Metástasis distante	3	40,8 ± 27,7		48,5 ± 22,1	

^a Por la prueba de Wilcoxon.
^b Mediana.
^c Falta la información de grado histológico, estado global y clasificación TNM en 26 pacientes.
^d Por la prueba de Kruskal-Wallis.

- 5 Se compara el rendimiento del marcador de cáncer pancreático CA 19-9 actualmente utilizado con el del marcador serológico del cáncer pancreático ULBP2 en 154 pacientes de cáncer de páncreas, a fin de evaluar su eficacia de detección. Tanto el CA 19-9 como el ULBP2 presentan niveles en suero más elevados en los pacientes de cáncer de páncreas que en los controles sanos y no están influidos por las características clínico-patológicas. A 40 U/ml de CA 19-9, un valor límite aplicado actualmente en la detección clínica del cáncer pancreático, los valores de sensibilidad y especificidad son del 84,4% y 74,6%, respectivamente. Debe tenerse en cuenta que al elegir un valor límite de 60 pg/ml para el ULBP2, 21 de los 24 pacientes de cáncer pancreático con niveles de CA 19-9 < 40 U/ml se pudieron excluir de los individuos considerados sanos en base a niveles de ULBP2 > 60 pg/ml. Asimismo, 24 de 36 individuos sanos con niveles de CA 19-9 > 40 U/ml también se pudieron distinguir de los pacientes, basándose en niveles de ULBP2 < 60 pg/ml. El uso combinado de ULBP2 y CA19-9 tiene una gran ventaja para la detección del cáncer pancreático, en comparación con el uso único de CA19-9 (mostrado en la tabla 3).

Tabla 3. Eficacia del ULBP2 y del CA 19-9 para detectar cánceres de páncreas

Pacientes de cáncer (n = 154)	Muestras en total	ULBP2 (> 60 pg/ml)	ULBP2 (< 60 pg/ml)
CA 19-9 (< 40 U/ml)	24	21	3
CA 19-9 (> 40 U/ml)	130	108	22
Controles sanos (n = 142)			
CA 19-9 (< 40 U/ml)	118	24	82
CA 19-9 (> 40 U/ml)	36	12	24

- 20 Con referencia a la fig. 2 también se ensayan las capacidades del ULBP2 y CA 19-9 como marcadores de detección mediante el análisis de la curva característica receptor-operador (CRO) y del área bajo la curva CRO (ABC). El análisis demostró que el ULBP2 (línea 1) [ABC = 0,862, 95% de intervalo de confianza (IC), 0,821-0,904] es algo mejor que el CA 19-9 (línea 2) [ABC = 0,856, 95% de IC, 0,809-0,902] como marcador de detección. Más importante es la combinación de ULBP2 y CA 19-9 (línea 3) que, empleando el modelo de regresión logística, demuestra una mayor capacidad diagnóstica que uno de los dos marcadores solos (ABC = 0,910, 95% de IC, 0,877-0,943). Estos resultados revelan en suma que el ULBP2 es un marcador serológico útil para el cáncer de páncreas, especialmente cuando se usa junto con el CA 19-9.

Forma de ejecución 5: capacidad del marcador serológico ULBP2 para la detección precoz del cáncer pancreático

Se toman 142 muestras sanas y 154 de pacientes de cáncer de páncreas para evaluar la capacidad del ULBP2 en la detección precoz de los cánceres pancreáticos. El nivel de ULBP2 en las muestras de suero de los controles sanos es $51,4 \pm 64,6$ pg/ml, inferior al de los pacientes de cáncer de páncreas en cualquier fase (clasificación TNM-T1/T2, clasificación TNM-N0 y estado global I-II iguales a $205,7 \pm 184,3$ pg/ml, $191,6 \pm 155,2$ pg/ml y $181,2 \pm 158,8$ pg/ml, respectivamente, $p < 0,0001$). Los resultados son similares a los del CA19-9 e indican que el marcador serológico ULBP2 se puede utilizar para la detección precoz del cáncer pancreático.

Con referencia a las figs. 3A hasta 3C, los análisis CRO demuestran que el ULBP2 tiene mejor rendimiento que el CA19-9 en la detección precoz del cáncer pancreático. Además la eficiencia de la detección se mejora combinando ULBP2 y CA 19-9.

Tabla 4. Capacidad del ULBP2 y CA 19-9 para la detección precoz de cánceres de páncreas

	ULBP2		CA 19-9		ULBP2 combinado con CA 19-9	
	ABC	95% IC	ABC	95% IC	ABC	95% IC
Clasificación TNM-T1/T2	0,854	0,778~0,930	0,796	0,690~0,901	0,883	0,816~0,949
Clasificación TNM-N0	0,866	0,811~0,920	0,841	0,764~0,917	0,893	0,841~0,946
Estado global I-II	0,846	0,798~0,895	0,839	0,782~0,896	0,897	0,856~0,937

Forma de ejecución 6: especificidad del marcador serológico del cáncer pancreático ULBP2

Para evaluar la especificidad del marcador serológico ULBP2 del cáncer pancreático se usan muestras obtenidas de pacientes con cáncer gástrico (GC), carcinoma nasofaríngeo (NPC) y carcinoma colorrectal (CRC). Se detectan los niveles de ULBP2 en muestras de suero del NPC y del CRC y en muestras de plasma del GC. Tal como muestra la tabla 5, en comparación con los controles sanos ($51,4 \pm 64,6$ pg/ml de ULBP2 en suero), los niveles de ULBP2 en suero son ligeramente superiores en pacientes de NPC ($N = 28$, $65,5 \pm 74,3$ pg/ml, $p = 0,122$) o de CRC ($N = 29$, $70,6 \pm 73,8$ pg/ml, $p = 0,038$). Sin embargo los niveles de ULBP2 en suero son notablemente elevados en el cáncer pancreático, en comparación con los encontrados en el CRC ($200,2 \pm 168,6$ frente a $70,6 \pm 73,8$ pg/ml, $p < 0,0001$) y en el NPC ($200,2 \pm 168,6$ frente a $65,5 \pm 74,3$ pg/ml, $p < 0,0001$). Los resultados revelan que el ULBP2 representa un marcador relativamente específico del cáncer pancreático y en particular que su nivel no cambia o solo aumenta de manera marginal en los otros dos cánceres gastrointestinales, CRC y GC.

Tabla 5. eficiencia de detección del marcador serológico del cáncer pancreático ULBP2 en diferentes cánceres

	Nº de muestras	ULBP2 en suero (pg/ml)	ULBP2 en plasma (pg/ml)
Cáncer pancreático	154	$200,2 \pm 168,6$	-
GC	30	-	$78,1 \pm 79,7$
NPC	28	$65,5 \pm 74,4$	-
CRC	29	$70,6 \pm 73,8$	-
Control 1	142	$51,4 \pm 64,6$	-
Control 2	25	-	$86,1 \pm 101,2$

Por tanto las formas de ejecución arriba descritas revelan que el marcador serológico ULBP2 está significativamente incrementado en el suero de un paciente de cáncer de páncreas y no tiene relación con las características clínico-patológicas. La sensibilidad de detección del marcador serológico ULBP2 mejora claramente hasta $3,91$ pg/ml en la muestra de suero. El marcador serológico ULBP2 tiene la capacidad de detectar el cáncer pancreático en una fase inicial. El ULBP2 se combina con el CA19-9 para promover la eficiencia y aumentar la especificidad en la detección del cáncer de páncreas, incluso en la fase inicial. Por consiguiente el marcador serológico ULBP2 tiene realmente la capacidad de detectar el cáncer pancreático en la fase inicial y mejora la eficiencia del diagnóstico clínico.

Lista de secuencias

<110> UNIVERSIDAD DE CHANG GUNG
 <120> Marcador serológico para detectar cáncer pancreático y método para usar el marcador serológico
 <160> 1
 <210> SEQ ID NO: 1
 <211> 240
 <212> NUCLEÓTIDO
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

MetAlaAlaAlaAlaAlaThrLysIleLeu LeuCysLeuProLeuLeuLeuLeuLeuSer 20
 GlyTrpSerArgAlaGlyArgAlaAspPro HisSerLeuCysTyrAspIleThrValIle 40
 ProLysPheArgProGlyProArgTrpCys AlaValGlnGlyGlnValAspGluLysThr 60
 PheLeuHisTyrAspCysGlyAsnLysThr ValThrProValSerProLeuGlyLysLys 80
 LeuAsnValThrThrAlaTrpLysAlaGln AsnProValLeuArgGluValValAspIle 100
 LeuThrGluGlnLeuArgAspIleGlnLeu GluAsnTyrThrProLysGluProLeuThr 120
 LeuGlnAlaArgMetSerCysGluGlnLys AlaGluGlyHisSerSerGlySerTrpGln 140
 PheSerPheAspGlyGlnIlePheLeuLeu PheAspSerGluLysArgMetTrpThrThr 160
 ValHisProGlyAlaArgLysMetLysGlu LysTrpGluAsnAspLysValValAlaMet 180
 SerPheHisTyrPheSerMetGlyAspCys IleGlyTrpLeuGluAspPheLeuMetGly 200
 MetAspSerThrLeuGluProSerAlaGly AlaProLeuAlaMetSerSerGlyThrThr 220
 GlnLeuArgAlaThrAlaThrThrLeuIle LeuCysCysLeuLeuIleIleLeuProCys 240

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar el cáncer pancreático, que comprende las siguientes etapas:
5 detección: detectar al menos el nivel de una proteína 2 fijadora de UL16 (ULBP2), que tiene una analogía del 95% o más con una secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1, en una muestra de sangre obtenida de personas examinadas;
 cálculo: calcular una concentración de ULBP2 empleando una curva de calibración estándar y comparar la concentración del ULBP2 con una concentración de control del ULBP2 en una muestra de sangre procedente
10 de una persona sana.
2. El método según la reivindicación 1, en que el ULBP2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1.
3. El método según la reivindicación 1, en que la etapa de detección incluye al menos otro marcador serológico
15 para detectar un cáncer pancreático.
4. El método según la reivindicación 3, en que el otro marcador serológico es el antígeno carbohidrato 19-9 (CA
19-9).
- 20 5. El método según la reivindicación 1, en que la muestra de sangre es de sangre entera, de suero o de plasma sanguíneo.
6. El método según la reivindicación 1, en que el marcador serológico se aplica en un inmunoensayo basado en
25 microesferas, en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich, en un ensayo basado en espectrometría de masas o en un inmunoensayo basado en espectrometría de masas.
7. El método según la reivindicación 2, en que el marcador serológico se aplica en un inmunoensayo basado en
30 microesferas, en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich, en un ensayo basado en espectrometría de masas o en un inmunoensayo basado en espectrometría de masas.
8. El método según la reivindicación 3, en que el marcador serológico se aplica en un inmunoensayo basado en
microesferas, en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich, en un ensayo basado en
espectrometría de masas o en un inmunoensayo basado en espectrometría de masas.
- 35 9. El método según la reivindicación 4, en que el marcador serológico se aplica en un inmunoensayo basado en
microesferas, en un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich, en un ensayo basado en
espectrometría de masas o en un inmunoensayo basado en espectrometría de masas.

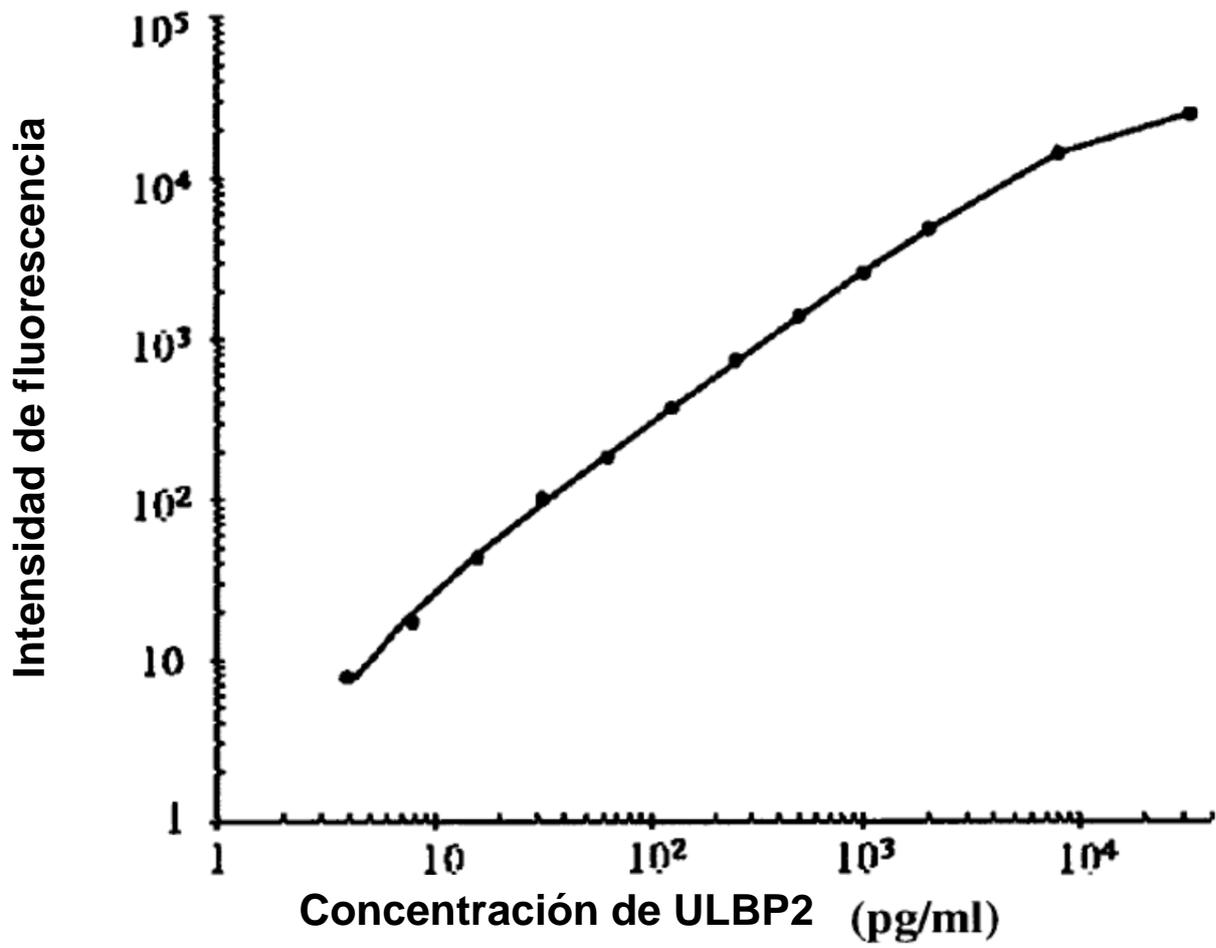


Fig. 1

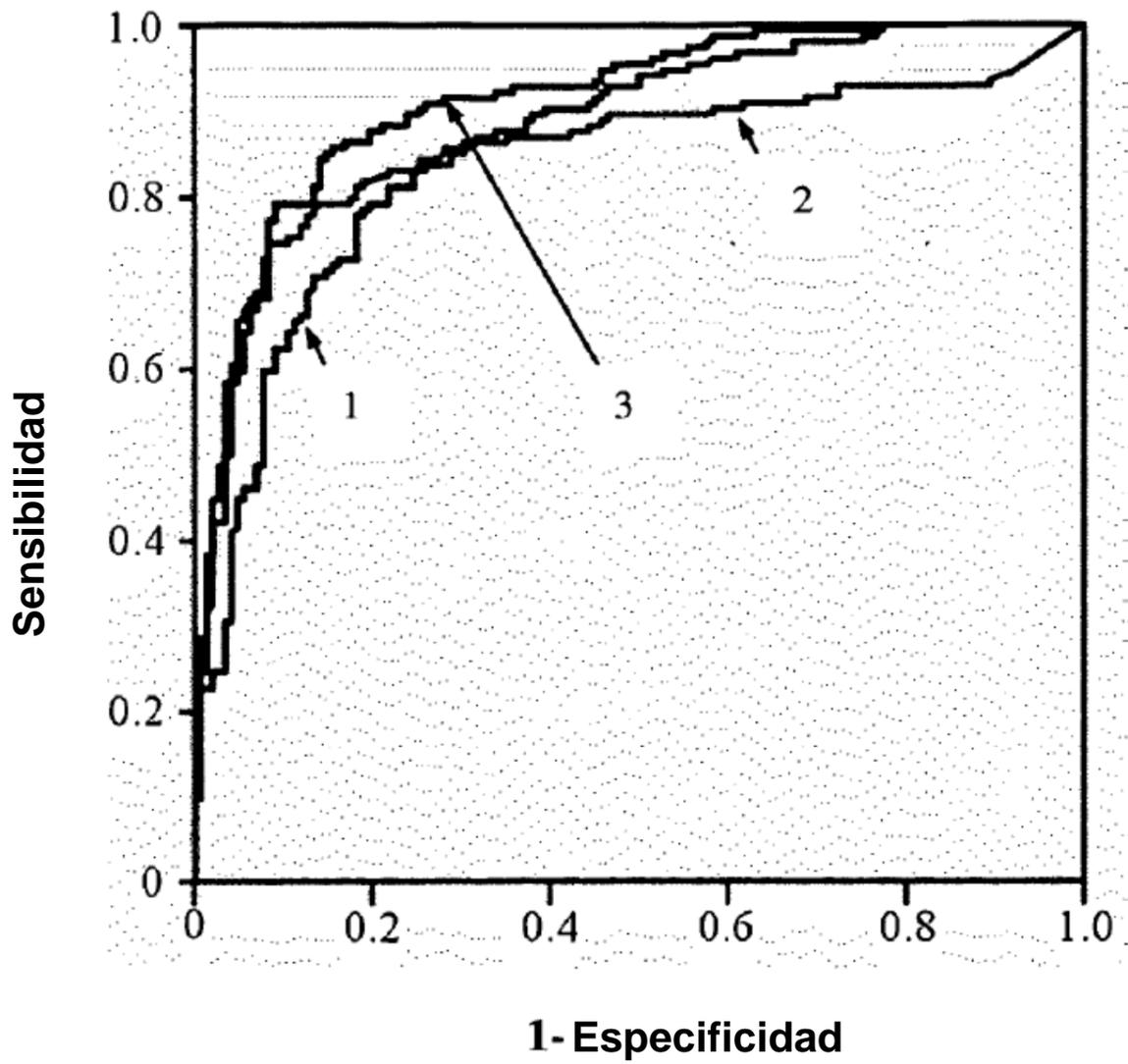


Fig. 2

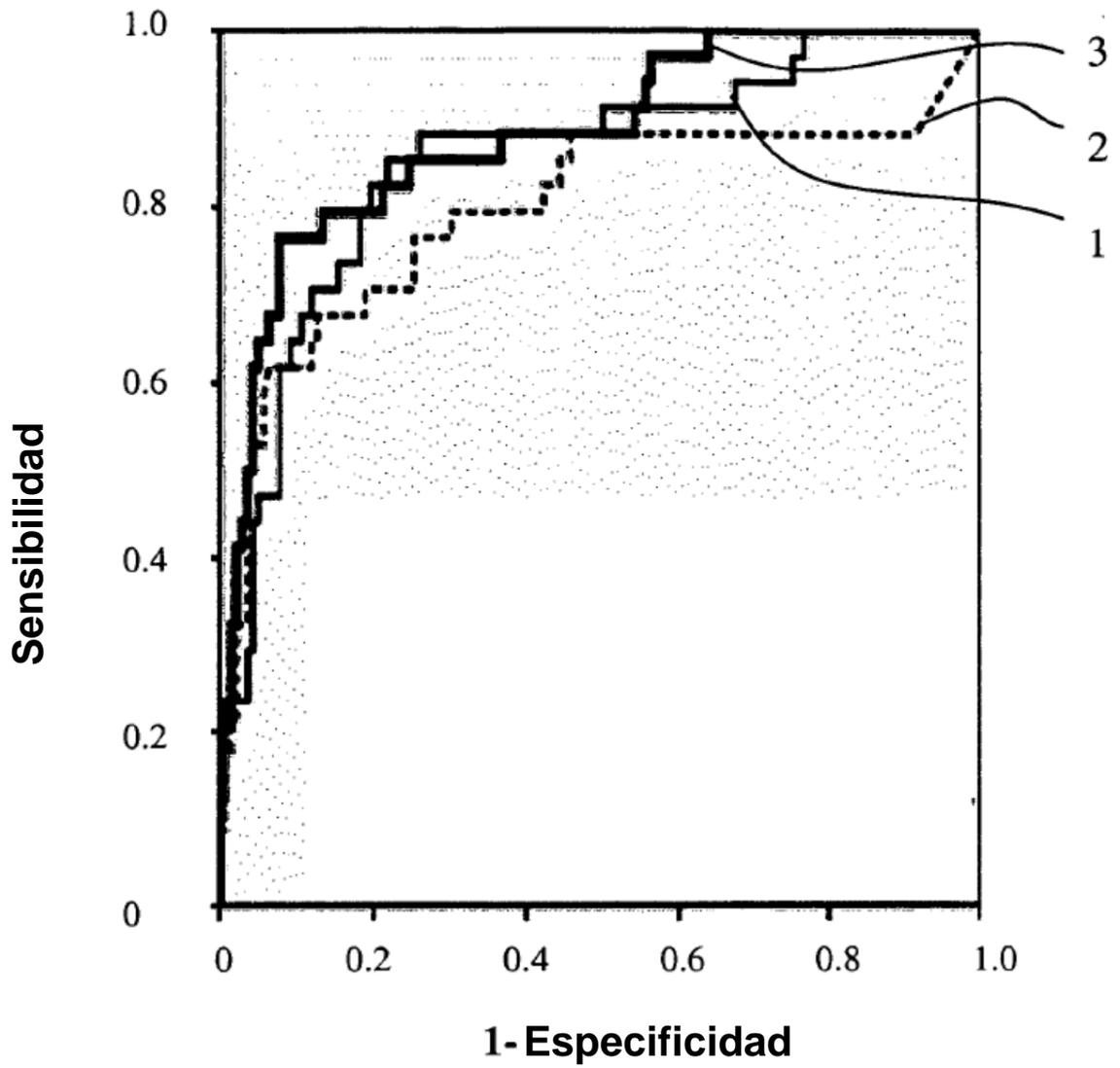


Fig. 3A

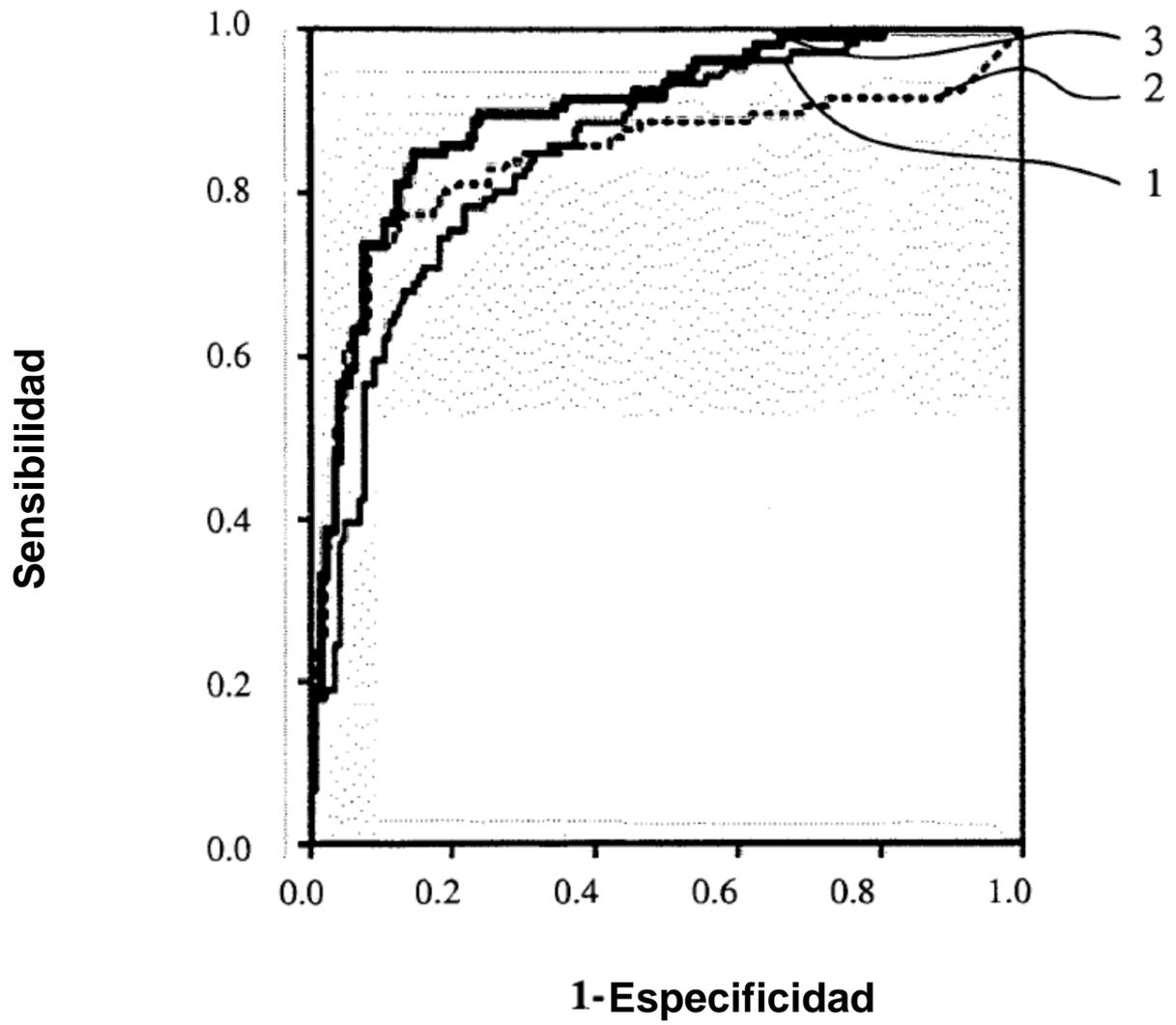


Fig. 3B

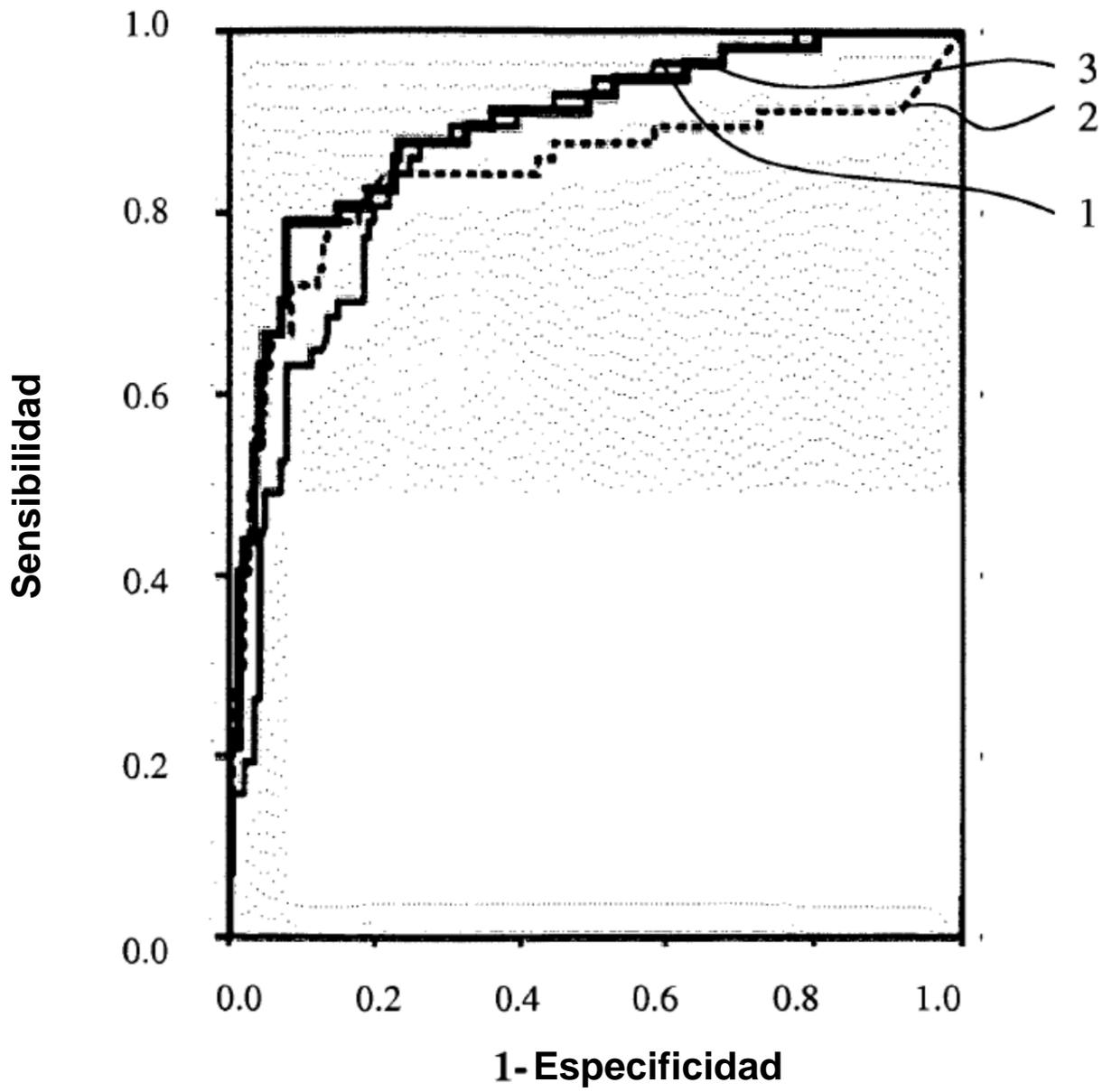


Fig. 3C



tejido canceroso



tejido no canceroso

Fig. 4