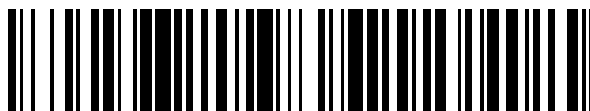


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 686 736**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2014** **E 14175297 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018** **EP 2963124**

54 Título: **Combinaciones de biomarcadores para su uso en la detección del cáncer de páncreas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2018

73 Titular/es:

RANDOX LABORATORIES LTD. (20.0%)
Ardmore, 55 Diamond Road
Crumlin, County Antrim BT29 4QY, GB;
UNIVERSITY OF LUBECK (20.0%);
CHRISTIAN ALBRECHTS UNIVERSITY OF KIEL
(20.0%);
UNIVERSITY HOSPITAL JENA (20.0%) y
GERMAN CANCER RESEARCH CENTER (DKFZ)
(20.0%)

72 Inventor/es:

HABERMAN, JENS;
BUENGER, STEFANIE;
VON EGGELING, FERDINAND;
BRENNER, HERMANN;
FREITAG-WOLF, SANDRA;
MCCONNELL, IVAN y
FITZGERALD, PETER

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 686 736 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

Combinaciones de biomarcadores para su uso en la detección del cáncer de páncreas

Introducción

5 El cáncer de páncreas es una de las neoplasias más letales a nivel mundial y, por lo tanto, muestra una demanda urgente de herramientas de detección mejoradas para la detección temprana. La detección del cáncer de páncreas en estadios tempranos es crucial porque la cirugía exitosa en estadios tempranos del tumor es la única terapia curativa actual. Solo el 10-30% de los pacientes con tumor pancreático se operan con intención curativa y solo se puede lograr una resección R0 para alrededor de la mitad de estos pacientes. La tasa de supervivencia a cinco años esperada para los pacientes resecados R0 con quimioterapia adyuvante adicional es de aproximadamente 4 - 26% [2,3]. Por el contrario, para los pacientes restantes que presentan carcinomas irresecables UICC en estadios III y IV, no existe terapia curativa. Estos pacientes tienen unos tiempos de supervivencia medios de 8 – 12 meses (UICC III) y de 5 – 8 meses (UICC IV), respectivamente. Por lo tanto, la incidencia de esta enfermedad es casi idéntica a su tasa de mortalidad.

15 El retraso persistente en el diagnóstico y la alta mortalidad asociada son atribuibles a la falta de síntomas en estadios tempranos del tumor combinadas con una alta agresividad biológica del tumor y opciones de tratamiento limitadas. Por lo tanto, la detección mejorada para un diagnóstico más temprano es esencial para aumentar la tasa de carcinomas resecables curativamente y por lo tanto mejorar el pronóstico de los pacientes. En la práctica clínica actual, la detección del cáncer de páncreas se basa en imágenes del estado de la técnica o incluso diagnósticos invasivos. Modalidades de diagnóstico comprenden ecografía endoscópica (EUS), tomografía computarizada (CT), colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (ERCP), colangiopancreatografía por resonancia magnética (MRCP), imagen de resonancia magnética (MRI), o incluso laparoscopia/laparotomía explorativa. Cualquier método de detección adicional que mejore la detección temprana tendría un impacto altamente beneficioso en el pronóstico de los pacientes.

25 Una posibilidad relativamente no invasiva y rentable se podría proporcionar mediante la medición de marcadores específicos de la enfermedad en sangre periférica. La identificación de biomarcadores derivados del suero humano es particularmente atractiva porque se puede obtener sangre con una alta conformidad y aceptabilidad del paciente. Tal ensayo se puede visualizar si los cambios en la composición de las proteínas del suero pudiesen indicar enfermedades específicas y/o etapas de la enfermedad. Por lo tanto, los perfiles cuantitativos y cualitativos de la proteína del suero se han convertido en un objetivo buscado de la proteómica clínica para identificar biomarcadores de diagnóstico y pronóstico seguros en la oncología clínica.

30 Se ha reportado una amplia gama de marcadores séricos desde la década de 1980 pero solo unos pocos han mostrado resultados prometedores en estudios recientes. CA 19-9 es el marcador más ampliamente investigado y evaluado para la detección del cáncer de páncreas. Los niveles séricos de CA 19-9 muestran una sensibilidad del 79 – 81% con una especificidad del 82 – 90% para el diagnóstico del cáncer de páncreas en pacientes sintomáticos [6]. Marcadores de cáncer de páncreas adicionales descritos en la técnica anterior son CEA [12] y S100A11 [13]. La mayoría de los marcadores aún no se han validado en estudios de detección grandes y bien definidos. De este modo, la medición de un panel de marcadores específicos de la enfermedad podría superar la medición de los marcadores individuales con respecto a la sensibilidad y especificidad. Además, un panel de marcadores podría proporcionar una reflexión más global de las redes moleculares y de las afecciones fisiopatológicas de las enfermedades. La tecnología Biochip array permite la determinación múltiple de marcadores múltiples a partir de una sola muestra [4, 5]. Esto también es relevante cuando los volúmenes de muestras clínicas son limitados. Se han reportado implementaciones de esta tecnología en entornos clínicos para diferentes matrices de biochip incluyendo citoquinas, y matrices cerebrales y cardíacas, moléculas de adhesión y también detección de fármacos de abuso.

45 Teniendo en cuenta los estudios de biomarcadores individuales recientes, se reportó la evaluación del nivel sérico de MIC-1, PAM4, OPN, HSP27, TPS, TSGF, CAM17.1, PF4 y CEACAM1 como marcadores prometedores [7]. Además, paneles de marcadores que consisten en M-CSF y CA 19-9, CEA y CA 19-9, SAA, Haptoglobina y CA 19-9, TSGF, CA 242 y CA 19-9, y HSP27 y CA 19-9 parecían ser favorables para la detección del carcinoma de páncreas con alto potencial de diagnóstico. A pesar de la investigación de estos diversos marcadores individuales y combinaciones de marcadores, ninguno se ha implementado para su uso clínico de rutina. Por lo tanto, existe la necesidad de nuevas combinaciones de marcadores para ayudar en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de páncreas.

Referencias

1. Benson AB, 3rd: *JAMA* 2007, 297(3):311-313.
2. Nieto J, Grossbard ML, Kozuch P: *Oncologist* 2008, 13(5):562-576.
3. Katz MH, Hwang R, Fleming JB, Evans DB: *CA Cancer J Clin* 2008, 58(2):111-125.
4. Molloy RM, Mc Connell RI, Lamont JV, FitzGerald SP: *Clin Chem Lab Med* 2005, 43(12):1303-1313.
5. Fitzgerald SP, McConnell RI, Huxley A: *J Proteome Res* 2008, 7(1):450-455.
6. Ballehaninna, U.K, Chamberlain, R.S. *Indian journal of surgical oncology*, 2011, 2(2):88-100.
7. Bünger S, Laubert T, Roblick UJ, Habermann JK: *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, 137(3):375-389.
8. Bünger S, Haug U, Kelly M, Posorski N, Klempt-Giessing K, Cartwright A, Fitzgerald SP, Toner V, McAleer D, Gemoll T et al. *BMC cancer* 2012, 12:393.
9. Austin, P.C and Tu, J.V. *The American Statistician*, 2004, 58:131–137.
10. Streiberberg, E.W. *Journal of clinical epidemiology*, 2001, 54:774–781.
11. Bünger, S. et al. *Biopreservation and Biobanking*, 2013, 11(6):379-386
12. Chames et al. *The Scientific World Journal* 2010, 10:1107-1120
13. Xiao, Ming-Bing et al. *Medical Oncology*, 2011 29(3):1886-1891

Compendio de la invención

5 En un primer aspecto, la presente invención proporciona una nueva combinación de biomarcadores para el diagnóstico precoz del adenoma y carcinoma pancreático. La combinación de M-CSF, S100A11, C3adesArg y CD26 mostró una sensibilidad del 70% con una especificidad del 90% para la detección de los carcinomas pancreáticos. Con la misma especificidad, incluso los carcinomas tempranos se detectaron con una sensibilidad del 69%.

10 Un segundo aspecto de la presente invención es un método para detectar adenomas y/o carcinomas pancreáticos en una muestra *in vitro* tomada de un paciente, en donde la muestra se pone en contacto con un dispositivo de estado sólido sobre el que se han inmovilizado sondas específicas para cada uno de los biomarcadores.

Otro aspecto descrito aquí es un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada sobre la que se inmovilizan las sondas para M-CSF, S100A11, C3aDesArg y CD26 en áreas discretas de dicha superficie activada. Este dispositivo de estado sólido no solo tiene potencial en el diagnóstico, sino también en la monitorización de la progresión del cáncer de páncreas.

15 Otro aspecto descrito aquí es un método para determinar la eficacia de un tratamiento farmacológico para el cáncer de páncreas que comprende determinar los niveles de M-CSF, S100A11, C3aDesArg y CD26 en una muestra de un paciente tratado con el fármaco, y comparar los niveles con los de un control sano o con niveles del mismo paciente antes del tratamiento con el fármaco, en donde dependiendo del biomarcador, un aumento o disminución en el nivel indica la efectividad del tratamiento.

20 Descripción de los dibujos

Figura 1 – Rendimiento del diagnóstico de marcadores individuales para la detección precoz del cáncer de páncreas.

Gráficos de puntos de muestras individuales con niveles séricos promedio y curvas ROC con respecto a la discriminación entre controles sanos y carcinoma pancreático para M-CSF, S100A11, C3adesArg y CD26 en el rendimiento de marcadores individuales.

25 Figura 2 – Rendimiento del diagnóstico de una combinación de marcadores para la detección del cáncer de páncreas. Curva de características de funcionamiento del receptor con respecto a la discriminación entre el cáncer de páncreas y los controles para un modelo predictivo basado en los biomarcadores M-CSF, S100A11, C3adArg, CD26 en combinación. AUC = 0,9015 (95% CI: 0,8595 – 0,9435).

30 Figura 3 – Rendimiento del diagnóstico de una combinación de marcadores para adenomas y carcinomas pancreáticos tempranos. Curva de características de funcionamiento del receptor con respecto a la discriminación entre a) carcinomas tempranos y controles (AUC = 0,937, 95%CI: 0,892 – 0,983) y b) adenoma pancreático y controles (AUC = 0,687, 95%CI: 0,554 – 0,820) para un modelo predictivo basado en los biomarcadores M-CSF, S100A11, C3adArg, CD26 en combinación.

Descripción detallada

- La presente invención describe un método basado en un biomarcador para ayudar en el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas. Específicamente se realiza la medición de los niveles relativos o concentraciones de los biomarcadores *in vitro* de una muestra tomada de un paciente. En el contexto de la presente invención, la utilidad para diagnosticar el cáncer de páncreas se ha utilizado a modo de ejemplo. Sin embargo, se prevé además que la invención pueda utilizarse para monitorizar la progresión o recurrencia del cáncer de páncreas y también la eficacia de cualquier estrategia de tratamiento que se haya implementado. La presente invención se puede utilizar también para determinar personas en riesgo de desarrollo de cáncer de páncreas, por ejemplo ayudando en el diagnóstico de adenoma pancreático, una afección premaligna que se puede convertir en un cáncer de páncreas.
- El término “paciente” se refiere a cualquier mamífero que es el receptor del diagnóstico, preferiblemente un ser humano. El paciente puede ser una persona que se presenta para una evaluación de rutina de la enfermedad o puede presentar síntomas sugestivos de cáncer. El paciente también puede ser un individuo considerado de alto riesgo de cáncer de páncreas, debido a los antecedentes familiares por ejemplo. Alternativamente, el paciente podría ser un individuo que ha recibido tratamiento para el cáncer de páncreas y la evaluación es para monitorizar el progreso o detectar posibles reapariciones.
- El término “biomarcador” en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula presente en una muestra biológica de un paciente, cuyos niveles pueden ser indicativos de cáncer de páncreas o adenoma. Tales moléculas pueden incluir péptidos/proteínas o ácidos nucleicos y derivados de los mismos.
- La combinación de biomarcadores de la presente invención para la detección de cáncer de páncreas comprende S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26. Sin embargo, está dentro del alcance de la invención determinar los niveles de biomarcadores adicionales que podrían contribuir al diagnóstico del cáncer de páncreas, por ejemplo, pero no limitado a, CA 19-9, CEA, IL-8, VEGF y CRP. En otro aspecto, se describen combinaciones de dos o tres biomarcadores que se pueden utilizar en un método para determinar si un paciente tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas.
- Los biomarcadores se seleccionan preferiblemente de la lista que consiste en M-CSF, S100A11, C3adesArg, CD26, CA 19-9, CEA, IL-8, VEGF y CRP. Más preferiblemente, uno de los biomarcadores en una combinación de dos o tres marcadores es S100A11. Ejemplos de combinaciones preferidas de dos biomarcadores incluyen S100A11 y VEGF, S100A11 y CRP, S100A11 y CEA, S100A11 y CD26, S100A11 y M-CSF, S100A11 y C3adesArg, S100A11 y IL-8.
- El término “M-CSF” como se utiliza aquí se refiere a un factor que estimula que estimula la colonia de Macrófagos, también conocido como factor 1 estimulante de colonias (número UniProt P09603).
- El término “S100A11” como se utiliza aquí se refiere a la proteína A11 de unión al calcio S100 (número UniProt P31949), también conocida como calgizarina.
- El término “C3adesArg” como se utiliza aquí se refiere al producto de escisión del complemento C3 (número UniProt P01024) que también se denomina comúnmente como proteína estimulante de la acilación (ASP).
- El término “CD26” como se utiliza aquí se refiere a un grupo de diferenciación 26, también conocido como Dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) (número UniProt P27487).
- El término “CEA” como se utiliza aquí se refiere a un antígeno carcinoembrionario (número UniProt P06731), también conocido como molécula de adhesión celular 5 relacionada con el antígeno carcinoembrionario.
- El término “VEGF” como se utiliza aquí se refiere al factor de crecimiento endotelial vascular (número UniProt P15692).
- El término “CRP” como se utiliza aquí se refiere a la proteína reactiva C (número UniProt P02741).
- El término “IL-8” como se utiliza aquí se refiere a la interleucina 8 (número UniProt P10145).
- En el contexto de la presente invención, una desviación de un valor de control para cada uno de los biomarcadores puede ser una indicación de que el paciente sufre de adenoma pancreático o carcinoma pancreático. Dependiendo del biomarcador individual esta desviación puede ser un aumento o una disminución del valor de control. Por ejemplo, en la cohorte de pacientes de la presente invención, los niveles de M-CSF y C3adesArg fueron menores en pacientes con adenoma y carcinoma en comparación con los de los controles sanos. Los niveles de S100A11 y CD26 fueron más altos con pacientes de adenoma y carcinoma que en los controles sanos (Tabla 2).
- La presente invención proporciona una combinación de biomarcadores en estadios tempranos, que permite la detección de una enfermedad neoplásica en un estadio temprano o todavía benigno y/o en estadios tempranos del tumor. La detección y extirpación temprana de un adenoma o carcinoma pancreático es fundamental y puede aumentar drásticamente las posibilidades de supervivencia de los pacientes. Adicionalmente la combinación de biomarcadores de la presente invención permite la monitorización del desarrollo del adenoma o carcinoma

pancreático dentro de un individuo mediante el ensayo en serie del suero de dicho individuo durante un periodo prolongado. Por ejemplo, la determinación rutinaria de los niveles de los cuatro biomarcadores de la combinación preferida podría detectar los cambios de los valores de control sanos, que son indicativos del desarrollo del adenoma pancreático y/o carcinoma pancreático en un estadio temprano. Un cambio adicional en los niveles podría ser indicativo de la progresión de la enfermedad a un estadio posterior.

Un aspecto adicional es un método para determinar la eficacia de un tratamiento para el cáncer de páncreas que comprende determinar los niveles de dos o más biomarcadores seleccionados de la lista que consiste en S100A11, M-CSF, C3aDesArg, CD26, CA 19-9, CEA, IL-8, VEGF y CRP en una muestra de un paciente tratado, y comparar los niveles con los de un control sano o con niveles del mismo paciente antes del tratamiento, en donde dependiendo del biomarcador, un aumento o una disminución del nivel indica la efectividad del tratamiento. El tratamiento puede ser por ejemplo, un tratamiento farmacológico, un tratamiento basado en radioterapia o una intervención quirúrgica. En un método preferido para determinar la eficacia de un tratamiento para cáncer de páncreas, uno de los dos o más marcadores es S100A11. En un método preferido adicional para determinar la eficacia de un tratamiento de cáncer de páncreas los dos o más biomarcadores consisten en S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26. Cuando el tratamiento es un tratamiento farmacológico, el método para determinar la eficacia del tratamiento farmacológico para cáncer de páncreas comprendería determinar los niveles de biomarcadores, por ejemplo S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26, en una muestra de un paciente tratado con el fármaco, y comparar los niveles de biomarcadores con aquellos de un control sano o con niveles del mismo paciente antes del tratamiento con el fármaco, en donde, dependiendo del biomarcador, un aumento o disminución del nivel indica la efectividad del tratamiento farmacológico.

En el contexto de la presente invención, un "valor de control" se entiende que es el nivel de un biomarcador particular, tal como S100A11 o M-CSF, C3adesArg o CD26 encontrados típicamente en individuos sanos. El nivel de control de un biomarcador se puede determinar mediante el análisis de una muestra aislada de un individuo sano o puede ser el nivel del biomarcador que el experto en la materia entiende que es típico para un individuo sano. El valor de control puede ser un intervalo de valores considerados por el experto en la materia como un nivel normal para el biomarcador en un individuo sano. La persona experta en la materia apreciará que los valores de control para un biomarcador pueden ser calculados por el usuario analizando el nivel del biomarcador en una muestra de un individuo sano o por referencia a valores típicos proporcionados por el fabricante del ensayo utilizado para determinar el nivel del biomarcador en la muestra.

La "muestra" puede ser cualquier muestra biológica ex vivo de la que se pueden determinar los niveles de biomarcadores. Preferiblemente, la muestra aislada del paciente es una muestra de suero o de plasma. Sin embargo, la muestra podría seleccionarse de, por ejemplo, sangre total, orina, saliva o esputo. La determinación del nivel de los biomarcadores se puede llevar a cabo en una o más muestras tomadas del paciente. La muestra se puede obtener del paciente mediante métodos utilizados rutinariamente en la técnica.

La determinación del nivel de los biomarcadores en la muestra se puede determinar mediante métodos inmunológicos tales como el ensayo basado en ELISA. Los métodos de la presente invención comprenden preferiblemente las siguientes etapas: unir los biomarcadores a una sonda(s), adicionar una sonda(s) detectora y detectar y medir la señal del complejo biomarcador/sonda, colocar estos valores en un algoritmo automático y analizar el valor de salida, indicando dicho valor si el paciente tiene o está en riesgo de tener un cáncer de páncreas. Preferiblemente, los métodos de la presente invención utilizan un dispositivo de estado sólido para determinar el nivel de los biomarcadores en la muestra aislada del paciente.

El dispositivo de estado sólido comprende un sustrato que tiene una sonda o múltiples sondas diferentes inmovilizadas sobre él que se unen específicamente a un biomarcador. Las interacciones entre un biomarcador y su sonda respectiva se pueden monitorizar y cuantificar utilizando varias técnicas que son bien conocidas en la técnica. El término "sonda" se refiere a una molécula que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana de manera que la molécula diana se pueda detectar como una consecuencia de dicha unión específica. Las sondas que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo, anticuerpos, aptámeros, fagos y oligonucleótidos. En una realización preferida de la presente invención la sonda es un anticuerpo.

El "nivel" de un biomarcador se refiere a la cantidad, nivel de expresión o concentración del biomarcador dentro la muestra. Este nivel puede ser un nivel relativo en comparación con otro biomarcador o con una muestra previa.

El término "anticuerpo" se refiere a una inmunoglobulina que reconoce específicamente un epítipo en un objetivo determinado por las características de unión de los dominios variables de inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera (VHS y VLS), más específicamente las regiones que determinan la complementariedad (CDRs). Se conocen en la técnica muchas formas de anticuerpos potenciales, que pueden incluir, pero no limitado a, una pluralidad de anticuerpos monoclonales intactos o mezclas policlonales que comprenden anticuerpos monoclonales intactos, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo Fab, Fab', y fragmentos Fv, anticuerpos lineales anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos que comprenden fragmentos de anticuerpos), fragmentos variables monocatenarios (scFvs), anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y proteínas de fusión que comprenden los dominios necesarios para el reconocimiento de un epítipo dado en un objetivo.

Preferiblemente, las referencias a anticuerpos en el contexto de la presente invención se refieren a anticuerpos policlonales o monoclonales. Los anticuerpos también se pueden conjugar con diversos restos indicadores para un efecto de diagnóstico, incluyendo pero no limitado a radionúclidos, fluoróforos, colorantes o enzimas incluyendo, por ejemplo peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Tales anticuerpos se pueden inmovilizar en áreas discretas de una superficie activada del sustrato. El dispositivo de estado sólido puede realizar ensayos de múltiples analitos de modo que el nivel de un biomarcador en una muestra aislada del paciente se pueda determinar simultáneamente con el nivel de un biomarcador adicional de interés en la muestra. En este aspecto, el dispositivo de estado sólido tiene una multiplicidad de sitios de reacción discretos que llevan cada uno un anticuerpo deseado unido covalentemente al sustrato, y en el que la superficie del sustrato entre los sitios de reacción es inerte con respecto al biomarcador objetivo. El dispositivo multianalito de estado sólido puede exhibir por tanto poca o ninguna unión no específica. La combinación de biomarcadores puede denominarse también como un panel de biomarcadores.

El sustrato puede ser cualquier superficie que pueda soportar una o más sondas, pero preferiblemente es un biochip. Un biochip es un sustrato plano que puede estar, por ejemplo, basado en un mineral o en un polímero, pero es preferiblemente de cerámica. Cuando se identifican los diversos biomarcadores/proteínas de la invención será evidente para una persona experta que además de identificar la proteína de longitud completa, es posible la identificación de un fragmento o varios fragmentos de una proteína, siempre que esto permita una identificación precisa de la proteína. Similarmente, aunque una sonda preferida de la invención es un anticuerpo policlonal o monoclonal, se pueden utilizar otras sondas tales como aptámeros, polímeros de impresión molecular, fagos, fragmentos de anticuerpo de cadena corta y otras sondas basadas en anticuerpos.

Un dispositivo de estado sólido que puede utilizarse en la invención se puede preparar activando la superficie de un sustrato adecuado y aplicando una matriz de anticuerpos sobre los sitios discretos en la superficie. Si se desea, las otras áreas pueden estar bloqueadas. Los ligandos se pueden unir al sustrato mediante un enlazador. En particular, se prefiere que la superficie activada se haga reaccionar sucesivamente con un organosilano, un enlazador bifuncional y el anticuerpo. El dispositivo de estado sólido utilizado en los métodos de la presente invención se puede fabricar de acuerdo con el método descrito en, por ejemplo, el documento de Patente GB-A-2324866 cuyos contenidos se incorporan aquí en su totalidad. El dispositivo de estado sólido puede ser cualquier sustrato al que se puedan unir sondas de la presente invención por ejemplo una placa de microtitulación o perlas. Preferiblemente, el dispositivo de estado sólido utilizado en los métodos de la presente invención es un biochip. El biochip puede ser un biochip que se incorpora al Biochip Array Technology System (BAT) disponible de Randox Laboratories Limited (Crumlin, UK).

Preferiblemente, el dispositivo de estado sólido se puede utilizar para determinar los niveles de dos o más biomarcadores seleccionados de la lista que comprende S100A11, M-CSF, C3adesArg, CD26, CA 19-9, CEA, IL-8, VEGF y CRP en la muestra aislada del paciente. En un aspecto adicional uno de los dos o más biomarcadores es S100A11. En una realización la combinación de biomarcadores comprende S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26. En otro aspecto el dispositivo de estado sólido comprende un sustrato que tiene una superficie activada en la que se aplican anticuerpos específicos para cada uno de los dos o más biomarcadores a áreas discretas de la superficie activada. Por lo tanto, el dispositivo de estado sólido puede realizar ensayos de multianalitos de modo que los niveles de biomarcadores, por ejemplo S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26, en una muestra se puedan determinar simultáneamente. En este aspecto, el dispositivo de estado sólido tiene una multiplicidad de sitios de reacción discretos que llevan cada uno un anticuerpo deseado unido covalentemente al sustrato, y en el que la superficie del sustrato entre los sitios de reacción es inerte con respecto a los biomarcadores objetivo. Cada sonda, ya sea individualmente o en multiples, es específica para un analito objetivo. Por ejemplo una sonda para S100A11 mostrará solo una unión específica a este analito y no tendrá una reactividad cruzada significativa con M-CSF, C3adesArg, CD26, CA 19-9, CEA, IL-8, VEGF o CRP, o en realidad cualquier otra sustancia que interfiera potencialmente que pudiera comprometer el ensayo. El dispositivo de estado sólido no solo tiene potencial en diagnóstico sino también en el control de la progresión y recurrencia del cáncer de páncreas así como en la determinación del éxito de cualquier tratamiento.

En una realización preferida de la presente invención, cada uno de los valores de concentración del biomarcador se introduce en una metodología estadística para producir un valor de salida que se correlaciona con las posibilidades de que el paciente tenga o esté en riesgo de desarrollar un cáncer de páncreas.

Preferiblemente, la metodología estadística utilizada es la regresión logística, árboles de decisión, máquinas de vectores de soporte, redes neuronales, bosque aleatorio u otro algoritmo de aprendizaje automático. El rendimiento de los resultados de los métodos estadísticos aplicados utilizados de acuerdo con la presente invención se puede describir mejor por sus características de funcionamiento del receptor (ROC). La curva ROC aborda tanto la sensibilidad (el número de verdaderos positivos) como la especificidad (número de verdaderos negativos) del ensayo. Por lo tanto, los valores de sensibilidad y especificidad para una combinación dada de biomarcadores son una indicación del rendimiento del ensayo. Por ejemplo, si una combinación de biomarcadores tiene un valor de sensibilidad y especificidad del 80%, de cada 100 pacientes, 80 se identificarán correctamente a partir de la determinación de la presencia de la combinación particular de biomarcadores como positivos para la enfermedad, mientras que de cada 100 pacientes que no tienen la enfermedad 80 darán un ensayo con precisión negativa para la enfermedad.

Un modelo de clasificación estadística adecuado, como la regresión logística, se puede derivar para una combinación de biomarcadores. Además, la ecuación de regresión logística se puede extender para incluir otras variables (clínicas) tales como la edad y el sexo del paciente también. De la misma manera que se describió anteriormente, la curva ROC se puede utilizar para acceder al rendimiento de la discriminación entre pacientes y controles mediante el modelo de regresión logística. Por lo tanto, la ecuación de regresión logística se puede utilizar separada o combinada con otras características clínicas para ayudar en la toma de decisiones clínicas. Aunque una ecuación de regresión logística es un procedimiento estadístico común utilizado en dichos casos y se prefiere en el contexto de la presente invención, también pueden utilizarse otros procedimientos matemáticos/estadísticos, árboles de decisión o aprendizaje automático.

Un objetivo conveniente para cuantificar la precisión de diagnóstico de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento en un solo número. La medida global más común es el área bajo la curva (AUC) del gráfico ROC. El área bajo la curva ROC es una medida de la probabilidad de que la medición percibida permitirá la identificación correcta de una afección. Los valores oscilan típicamente entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente entre los dos grupos de valores de ensayo), cualquier resultado por debajo de 0,5 se considera peor que una estimación aleatoria. El área no depende solo de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad con un 90% de especificidad, si no del gráfico entero. Esta es una expresión cuantitativa y descriptiva de cuán cerca está el gráfico ROC del perfecto (área = 1,0). En el contexto de la presente invención, las dos condiciones diferentes pueden ser si un paciente tiene o no cáncer.

Materiales y métodos

Grupo de estudio

Este estudio comprendió 201 muestras de suero que fueron parte de un total de 3.500 muestras de suero recogidas en University Medical Center Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Alemania, entre 2007 y 2012. Esta colección de suero es parte del Interdisciplinary Center for Biobanking-Lübeck (ICB-L) de biobancos centralizados integrados en el hospital, del Surgical Center for Translational Oncology-Lübeck (SCTO-L), University of Lübeck, y de la red financiada North German Tumorbank of Colorectal Cancer (ColoNet, #108446) del German Cancer Aid (KDH e.V.). Las muestras de suero se recogieron siguiendo las directrices de la junta de revisión ética local (Medical University of Lübeck, #07-124) y de acuerdo con los procedimientos de operación estándar estrictos (véase a continuación). Las muestras de suero se obtuvieron antes de la resección oncológica. Para los pacientes de control, se obtuvieron muestras de sangre antes de una colonoscopia completa, lo que confirmó que no había signos de lesiones intestinales premalignas o malignas presentes en esta cohorte. Para pacientes de cáncer, las muestras de sangre se obtuvieron antes de la quimioterapia o radioterapia neoadyuvante y/o cirugía. El grupo de estudio comprendió 84 pacientes con cáncer de páncreas (46 hombres y 38 mujeres, edad media 64 años). Además, 15 pacientes con adenoma pancreático (7 hombres y 8 mujeres, edad media 59 años) y 102 pacientes de control sanos (40 hombres y 62 mujeres, edad media 62 años) se incluyeron en este estudio. Datos clínicos detallados del grupo de estudio se resumen en las Tablas 1 y 4.

Muestreo

Todas las muestras de sangre venosa se obtuvieron utilizando monovettes de gel de suero (#01,1602, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Germany) y se centrifugaron a 1.550 x g durante 10 min a 4°C para separar el suero. Las alícuotas de las muestras de suero se almacenaron a -70°C dentro de los 30 min después de la punción venosa. Las muestras se descongelaron en hielo antes de la evaluación múltiple en los biochips.

Determinación de los niveles de suero del biomarcador

Un diseño de plataforma de biochip múltiple establecido para la detección cuantitativa simultánea de los marcadores de suero IL-8, CEA, VEGF, M-CSF, S100A11, C3adesArg, CD26 y CRP se diseñó y fabricó como se describió anteriormente [8, 9, 11]. De este modo, un biochip (CRCSI) comprendió C3desArg, CD26 y CRP, y el otro chip (CRCSII) incorporó IL-8, CEA, VEGF, M-CSF, S100A11 y NNMT. Los biochips se basaron en inmunoensayos sándwich quimioluminiscentes simultáneos utilizando el analizador Evidence Investigator analyser (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK). Este sistema permite el manejo de hasta 54 muestras (6 x 9 pocillos) en un portador de biochips. Las muestras se descongelaron en hielo antes de la evaluación múltiple. El biochip se somete a una evaluación de control de calidad del 100% después de la fabricación, evitando la necesidad de réplicas técnicas para muestras de pacientes. La inclusión de calibradores y controles proporciona confianza en los resultados entre ensayos recogidos. La concentración de analito presente en la muestra se calculó automáticamente utilizando las curvas de calibración generadas (Evidence Investigator Software version 1.4). El analizador evalúa de forma rutinaria la calidad del rendimiento del ensayo como describieron FitzGerald y colaboradores [5]. El protocolo detallado para la incubación del chip y el procesamiento, así como los intervalos de ensayo y la precisión se describieron anteriormente [9].

Análisis estadístico

Utilizando SPSS Statistics version 19 (IBM Corporation, Somers, NY) y SAS version 9.1 (SAS Institute Inc., Cary,

North Carolina, USA), se describieron los niveles de suero de los marcadores individuales en casos de cáncer de páncreas, casos de adenoma pancreático y controles sanos con respecto a niveles medios, rangos intercuartílicos y rangos generales. Se aplicaron ensayos no paramétricos para comparar los niveles de suero medios entre diferentes grupos de pacientes. La correlación entre los marcadores individuales se evaluó mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

Análisis estadísticos adicionales con respecto al rendimiento clínico de los biomarcadores se realizaron utilizando R version 2.12.2, paquetes bootStepAIC, pROC y MASS de la siguiente manera: la relación entre la enfermedad y los ocho marcadores de diagnóstico se analizó por separado mediante modelos de regresión logística y se ilustraron mediante las curvas características operativas del receptor (ROC). Como resultó que las variables continuas arrojaron una no linealidad en la escala logística, todos los marcadores se clasificaron en cuartiles para un modelado posterior. Un modelo predictivo se construyó mediante una selección hacia atrás de acuerdo con los criterios AIC. Además, excluimos IL-8 del modelo predictivo, porque no había monotonía en los cuartiles con respecto al estado de la enfermedad detectable. La estabilidad de la selección del marcador se validó mediante métodos Bootstrap para desarrollar los modelos predictivos de Austin y Tu [9].

Para conseguir estimadores robustos de odds ratio (OR) con intervalos de confianza apropiados (CI) del modelo final se utilizaron los percentiles 50°, 2,5° y 97,5° de los parámetros de regresión estimados de 10.000 modelos de regresión logística de muestras Bootstrap del conjunto de datos original. Los valores P se calcularon a partir de la inversión de las regiones de confianza de dos lados, que se asocian con el ensayo de la hipótesis nula de dos lados donde el OR es igual a cero. Todos los resultados Bootstrap del modelo final se compararon con los resultados de la teoría asintótica.

La validación interna del modelo final se realizó mediante un método Bootstrap mejorado [10]. El optimismo en el rendimiento aparente se evaluó promediando 1.000 diferencias de dos áreas bajo los valores de la curva característica operativa (AUC) del receptor: los valores AUC calculados cuando se aplicó el mismo muestreo Bootstrap (rendimiento aparente) y cuando se aplicó el conjunto original al modelo estimado a partir de los datos del Bootstrap (rendimiento del ensayo).

Ejemplos

Los biochips y las dianas se evaluaron simultáneamente en una colección de sueros altamente estandarizados de cáncer, muestras pre-tumores malignos y de control almacenadas a -70°C dentro de los 30 minutos después de la flebotomía siguiendo procedimientos de operación estándar estrictos.

Ejemplo 1 – Evaluación de marcadores individuales

La distribución de los niveles de suero de los ocho marcadores se describe en la Tabla 2. Los niveles de suero de CEA, VEGF, M-CSF, S100A11, CD26 y CRP mostraron diferencias significativas entre los casos de cáncer de páncreas y los controles ($P < 0,05$). Los correspondientes gráficos de puntos y ROCs individuales de los cuatro marcadores individuales superiores se muestran en la Figura 1. Las AUCs con los rendimientos de diagnóstico para los ocho marcadores se enumeran en la Tabla 3a: se observó la AUC más grande para S100A11 (0,799). S100A11 fue también el marcador con más alta sensibilidad del 49% a niveles de especificidad que normalmente se requieren en una configuración de detección ($\geq 90\%$).

Ejemplo 2 – Desarrollo de un modelo de regresión predictivo

Para optimizar el rendimiento clínico de la detección del cáncer de páncreas, probamos si una combinación de marcadores sería superior al uso de marcadores individuales. Después de la selección hacia atrás, el modelo final comprendió cuatro biomarcadores M-CSF, S100A11, C3desArg y CD26 (Tabla 3b). Los resultados asintóticos (no mostrados) fueron casi muy similares pero en algunos casos menos conservadores que los de los métodos Bootstrap. La verificación de la selección de variables en las muestras Bootstrap demuestra que se distingue claramente entre marcadores predictivos importantes y no importantes en el modelo final. Por lo tanto, el modelo Bootstrap confirma, que nuestro modelo se basa en esos cuatro marcadores de suero con el impacto más alto. La correspondiente AUC de 0,9015 (95%CI: 0,8595 – 0,9435) obtuvo, por ejemplo, 70% de sensibilidad con un 90% de especificidad. De este modo, se detectó el mayor impacto para los niveles de suero de S100A11 $> 18,81$ ng/mL (OR 286,7) y para los niveles de suero de CD26 > 795 ng/mL (OR 21,6, Tabla 3b).

Para la validación adicional, el optimismo de nuestro modelo se realizó como se describió anteriormente. Se hizo el promedio del AUC de la misma muestra del modelo fue 0,911 (95%CI: 0,86 - 0,912), mientras que para una nueva muestra Bootstrap el promedio del AUC fue 0,89 (95%CI: 0,852 - 0,901). La media del optimismo es 0,02 (95%CI: - 0,025 – 0,059). Con una selección de modelo incluida, se realizan cambios insignificantes. Esto confirma la estabilidad de nuestro modelo de regresión para la detección del cáncer de páncreas.

Además, desarrollamos una fórmula correspondiente para la aplicación clínica del modelo predictivo. Se calculó una combinación lineal (LC) que incluye factores de regresión para todos los cuartiles de los marcadores que forman parte del modelo predictivo: $LC = -1,4 - 1,2 \times I_{M-CSFq1} - 2,7 \times I_{M-CSFq2} - 1,8 \times I_{M-CSFq4} + 1,5 \times I_{S100A11q1} + 2,2 \times I_{S100A11q2} + 5,3 \times I_{S100A11q3} - 1,7 \times I_{C3adesArgq3} + 2,9 \times I_{CD26q3}$. Para cada marcador los valores de suero individuales

del paciente deben verificarse y convertirse en 0 si el nivel de suero no está en el cuartil correspondiente, de lo contrario se debería insertar 1 si los rangos del nivel del suero están en el cuartil correspondiente. En consecuencia, para cada $I_{\text{Marcador}X_{qX}}$ se inserta 0 o 1 en la fórmula. Posteriormente, el valor de LC se procesa después en la fórmula $P_{PC} = 1/(1 + \exp(-LC))$ dando como resultado la probabilidad de verse afectado por el cáncer de páncreas.

- 5 Por ejemplo, observamos un paciente (#912) con los siguientes niveles de suero para los cuatro marcadores incluidos en el modelo predictivo: M-CSF = 8,29 ng/mL (cuartil 2), S100A11 = 14,89 ng/mL (cuartil 2), C3adesArg = 914 ng/mL (cuartil 0) y CD26 = 786 ng/mL (cuartil 0). El cálculo de la LC consecuentemente es $-1,4 - (1,2 \times 0) - (2,7 \times 1) - (1,8 \times 0) + (1,5 \times 0) + (2,2 \times 1) + (5,3 \times 0) - (1,7 \times 0) + (2,9 \times 0) = -1,033$ y, por lo tanto, la probabilidad podría calcularse con $P_{PC} = 1/(1 + \exp(1,033)) = 0,27$ y, por lo tanto, un 27% de tener cáncer de páncreas.

10 Ejemplo 3 – Niveles de suero y rendimiento del ensayo para carcinomas en estadio temprano

Quando se comparan los niveles de suero entre todos los carcinomas pancreáticos de estadios tempranos (estadios I y II de UICC, n=13) y de estadios tardíos (estadios III y IV de UICC, n=69), los niveles de suero medios para CEA fue 0,44 ng/mL en los carcinomas en estadios tempranos y 1,06 ng/mL en carcinomas en estadios tardíos ($P = 0,028$). Los niveles de suero para todos los otros marcadores no mostraron diferencias significativas entre los

15 carcinomas en estadios tempranos y tardíos (Tabla 2). Aplicando el modelo predictivo previamente descrito a 13 carcinomas en estadios tempranos, la sensibilidad fue del 69% con una especificidad del 90% ($AUC = 0,937$, 95%CI: 0,892 – 0,983, Figura 3a). Por lo tanto, alcanzando la misma sensibilidad que para los 69 carcinomas en un estadio tardío (69% de sensibilidad con una especificidad del 90%, $AUC = 0,892$, 95%CI: 0,845 – 0,938, Figura 3a).

Ejemplo 4 – Niveles de suero y rendimiento del ensayo para adenomas

- 20 Los 15 casos de adenoma pancreático consistieron histológicamente en cinco quiste-adenomas, cuatro neoplasmas mucinosos papilares intraductales (IPMNs), otros cuatro (quistico, papilar, mucinoso, tipo endocrino) y dos adenomas de histología desconocida (para datos clínicos detallados véase Tabla 4). Para IL-8 el nivel de suero medio para pacientes con adenomas fue significativamente más bajo que el nivel observado en todos los controles sanos (9,32 pg/mL versus 19,12 pg/mL, $P = 0,002$). Resultados similares se mostraron para los niveles de suero de
- 25 M-CSF que fueron más bajos en el adenoma en comparación con pacientes sanos (5,71 ng/mL versus 7,66 ng/mL, $P = 0,009$). Por el contrario, S100A11 mostró un nivel medio superior para el adenoma que para los pacientes sanos (15,65 ng/mL versus 10,69 ng/mL, $P < 0,0001$). Todos los demás marcadores no difirieron significativamente entre el adenoma y los pacientes sanos. Los resultados del biochip para todos los adenomas se incluyen en la Tabla 2. Para muestras de adenoma, nuestro panel múltiple de S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26 alcanzaron una sensibilidad del 27% con una especificidad del 90% ($AUC = 0,687$, 95%CI: 0,554 – 0,820, Figura 3b).
- 30

Ejemplo 5 – Correlación entre niveles de biomarcadores y características clinicopatológicas

El sexo y la edad se distribuyeron equitativamente entre los individuos de todos los grupos ($P = 0,107$ y 0,250, respectivamente). Con el fin de explorar si los niveles de suero de los cuatro marcadores de suero del panel múltiple mostraban una correlación con la edad o el sexo, se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman. M-CSF

35 y CD26 mostraron una correlación con la edad (coeficiente de correlación de Spearman $\rho = 0,261$, $P < 0,001$ y $\rho = -0,192$, $P = 0,009$, respectivamente), mientras S100A11 se correlacionó con el sexo ($\rho = -0,238$, $P = 0,001$). No hubo una correlación significativa entre todos los demás biomarcadores y la edad o el sexo. Tampoco hubo correlaciones de los niveles de los biomarcadores con el estado T, N o M ni con la clasificación del carcinoma (Correlación de Spearman y ensayo de Mann-Whitney).

- 40 Con respecto a M-CSF, S100A11, C3adesArg y CD26 no se pudo detectar una correlación relevante entre ellos aplicando el coeficiente de correlación de Spearman (todos $p < 0,300$, Tabla 5).

Tabla 1 – Datos clínicos del grupo de estudio

a) Compendio de los datos clínicos del grupo de estudio que consiste en pacientes con cáncer de páncreas, pacientes con adenoma pancreático y pacientes de control sanos.

Parámetro	Valor	Pacientes con cáncer de páncreas (n=84)	Pacientes con adenoma pancreático (n=15)	Pacientes de control sanos (n=102)*	Valor de P
Sexo	Femenino	38 (45%)	8 (47%)	62 (61%)	0,107
	Masculino	46 (55%)	7 (53%)	40 (39%)	
Edad (años)	Intervalo	64	59	62	0,250
	Media	37 – 83	42 – 72	20 – 91	

- 45 • Todos los pacientes sanos recibieron una colonoscopia completa

b) Compendio de los datos clínicos de pacientes con cáncer de páncreas. n.a.: no disponible, porque el carcinoma fue inoperable.

Parámetro	Valor	Pacientes con cáncer de páncreas n (%)	Pacientes con adenoma pancreático n (%)
Localización del tumor	cabeza	56 (66,7%)	2 (13,3%)
	cuerpo	13 (15,5%)	2 (13,3%)
	cola	4 (4,8%)	0 (0,0%)
	n.a.	11 (13,1%)	11 (73,3%)
Estadio UICC	1	4 (4,8%)	
	2	9 (10,7%)	
	3	42 (50%)	
	4	27 (32,1%)	
	n.a.	2 (2,4%)	
Estadio T	1	4 (4,8%)	
	2	12 (14,3%)	
	3	37 (44%)	
	4	17 (20,2%)	
	n.a.	14 (16,7%)	
Estadio linfático	0	14 (16,7%)	
	1	44 (52,4%)	
	2	2 (2,2%)	
	n.a.	24 (18,6%)	
Estadio de metástasis	0	18 (21,4%)	
	1	14 (16,7%)	
	n.a.	52 (61,9%)	
Clasificación del tumor	G1/2	25 (29,8%)	
	G3	26 (31%)	
	n.a.	33 (39,3%)	

Tabla 2 – Nivel de suero de ocho biomarcadores de suero

- 5 Niveles de suero medios de ocho biomarcadores en pacientes sanos, pacientes con adenoma y pacientes con carcinoma pancreático (temprano y tardío). ns: no significativo ($p > 0,05$), *Límite de detección, ·comparación entre pacientes sanos y con adenoma

ES 2 686 736 T3

	Pacientes Sanos n = 102	Pacientes con cáncer n = 84	Pacientes con adenoma n = 15	Estadio UICC	
				I + II n = 13	III + IV n = 69
CEA (ng/mL)					
Media	0,55	1,01	0,65	0,44	1,06
Rango intercuartil	0,36 - 1,13	0,53 - 1,96	0,29 - 1,63	0,375 - 1,2	0,58 - 2,06
Rango	0,14 - 6,05	0,14 - 52,39	0,2 - 3,79	0,26 - 3	0,14 - 52,39
Valor p	< 0,0001		ns	0,028	
IL-8 (pg/mL)					
Media	19,12	20,12	9,32	17,89	20,16
Rango intercuartil	15,73 - 25,41	12,24 - 38,45	8,01 - 14,02	12,49 - 12,49	11,93 - 34,81
Rango	0 - 221,15	0 - 465,33	3,1 - 27,86	8,3 - 313,35	0 - 465,33
Valor p	ns		0,002	ns	
VEGF (pg/mL)					
Media	57,04	103,78	81,36	105,75	99,58
Rango intercuartil	33,99 - 98,45	50,07 - 154,82	54,5 - 129,64	45,99-129,62	52,48-165,86
Rango	7,54 - 427,56	21,22 - 530*	28,05 - 170,25	34,11 - 238,84	21,22 - 530*
Valor p	< 0,0001		ns	ns	
M-CSF (ng/mL)					
Media	7,66	5,58	5,71	7,49	5,56
Rango intercuartil	5,33 - 10,33	4,73 - 9,15	3,26 - 8,08	5,36 - 14,02	4,7 - 8,28
Rango	2,99 - 72,86	2,47 - 60,69	2,64 - 10,28	4,43 - 32,09	2,47 - 60,90
Valor p	0,015		0,009	ns	
S100A11 (ng/mL)					
Media	10,69	16,72	15,65	15,34	16,61
Rango intercuartil	7,67 - 14,22	13,19 - 24,31	13,06 - 18,41	12,87 - 29,71	13,37 - 24,26
Rango	3,99 - 105,25	6,52 - 250*	10,65 - 34,66	9,8 - 250	6,52 - 250*
Valor p	< 0,0001		< 0,0001	ns	
C3adesArg (ng/mL)					
Media	845	692	640	528	690
Rango intercuartil	575,5 - 1.146,5	498 - 1.021	574 - 966	440 - 1.152	504 - 1.020
Rango	300 - 3.316	0 - 4.392	0 - 3.060	0 - 2.860	0 - 4.392
Valor p	ns		ns	ns	
CD26 (ng/mL)					
Media	550	667	618	840	646

Rango intercuartil	422,5 - 702,5	452,5 – 1.051,5	428 - 704	542 – 1.133	431 – 1.023
Rango	0 - 1034	160 - 2744	398 - 796	300 – 1.928	160 – 2.744
Valor p	0,001		ns*	ns	
CRP (ng/mL)					
Media	1.941	4.654	2.604	4.720	4.592
Rango intercuartil	1.136,5-5.030,5	1.984,5-15.909,5	1.398 – 6.398	2.322 – 15.846	1.705 – 16.754
Rango	746 – 59.800*	950 – 59.800*	680 – 10.590	1.036 – 59.800*	950 – 59.800*
Valor p	< 0,0001		ns*	ns	

Tabla 3 – Rendimiento de diagnóstico de ocho biomarcadores de suero y modelo predictivo

a) Área bajo las curvas de características operativas (AUC) del receptor con intervalos de confianza (CI) y rendimiento de detección (sensibilidad y especificidad) para todos los ocho biomarcadores analizados en enfoques de marcadores individuales y para el uso de una combinación de cuatro biomarcadores para la detección del cáncer de páncreas.

5

	Biomarcador	Características de rendimiento de ensayo			
		AUC (95% CI)	Sensibilidad [%] con 90% de especificidad	Sensibilidad [%] con 95% de especificidad	Sensibilidad [%] con 100% de especificidad
e marcador	S100A11	0,799 (0,74 - 0,86)	49	44	4
	VEGF	0,674 (0,59 - 0,75)	28	19	3
	CRP	0,665 (0,59 - 0,74)	25	6	0
	CEA	0,656 (0,58 - 0,74)	21	12	6
	CD26	0,647 (0,56 - 0,73)	42	33	25
	M-CSF	0,604 (0,52 - 0,69)	21	14	4
	C3adesArg	0,574 (0,49 - 0,66)	19	11	6
	IL-8	0,562 (0,48 - 0,65)	27	21	6

Panel de marcadores**	M-CSF, S100A11, C3adesArg, CD26	0,9015 (0,8595 - 0,9435)	70	55	8
-----------------------	--	-----------------------------	----	----	---

*resultados del modelo de regresión logística con cada marcador como un predictor continuo

**resultados del modelo de regresión predictiva final como se describe en la Tabla 3b

b) Resultados de Bootstrap del modelo predictivo para la detección del carcinoma pancreático. Para cada biomarcador y cada cuartil, se proporcionan odds ratios, intervalos de confianza e importancia del impacto.

Biomarcador	Cuartil	Odds ratio (95% CI)	Valor de P
M-CSF	4,98 - 6,82 ng/mL	0,295 (0,068 - 1,042)	0,0566
	6,83 - 10,18 ng/mL	0,054 (0,007 - 0,216)	< 0,001
	>10,18 ng/mL	0,136 (0,031 - 0,461)	0,0012
S100A11	9,40 - 13,51 ng/mL	4,944 (1,301 - 33,644)	0,0222
	13,52 - 18,81 ng/mL	10,361 (2,764 - 69,408)	< 0,001
	>18,81 ng/mL	286,683 (57,613 - 4.480,894)	< 0,001
C3adesArg	>1.106 ng/mL	0,167 (0,042 - 0,492)	0,0006
CD26	>795 ng/mL	21,596 (6,844 - 124,641)	< 0,001

5

Tabla 4 – Compendio de los datos clínicos del grupo de estudio que consiste en pacientes con adenoma pancreático.

N/A = no disponible, IPMN = neoplasias mucinosas papilares intraductales

Paciente #	Grado de displasia	Histología	Tamaño del adenoma (cm)	Localización del adenoma
1	N/A	Cistadenoma microquístico	11,5	Cabeza
2	Bajo	IPMN	5	Cola
3	N/A	N/A	N/A	N/A
4	Bajo	Adenoma túbulo-papilar	2	N/A
5	N/A	Adenoma pseudoquístico	2	Cabeza

6	N/A	N/A	N/A	Cola
7	N/A	IPMN	5	Cabeza
8	N/A	Cistadenoma mucinoso	9	Cola
9	Bajo	IPMN	6	Cabeza
10	N/A	Cistadenoma mucinoso multiquístico	8	Cola
11	N/A	Microadenoma endocrino	0,4	Cola
12	N/A	Cistadenoma seroso microquístico	3	Cabeza
13	N/A	Cistadenoma	1,5	N/A
14	Bajo	IPMN	N/A	Cabeza
15	N/A	Adenoma pseudoquístico	N/A	N/A

Tabla 5 – Coeficiente de correlación de Spearman ρ y valor de P para a) pacientes sanos y b) pacientes con carcinoma pancreático.

a)

	M-CSF	S100A11	C3dArg	CD26
M-CSF	n.a.	$\rho = 0,217$ P = 0,029		$\rho = -0,235$ P = 0,017
S100A11	$\rho = 0,217$ P = 0,029	n.a.	$\rho = 0,291$ P = 0,003	
C3adesArg		$\rho = 0,291$ P = 0,003	n.a.	
CD26	$\rho = -0,235$ P = 0,017			n.a.

5

b)

	M-CSF	S100A11	C3dArg	CD26
M-CSF	n.a.	$\rho = 0,281$ P = 0,01		
S100A11	$\rho = 0,281$ P = 0,01	n.a.	$\rho = 0,250$ P = 0,022	$\rho = -0,292$ P = 0,007
C3adesArg		$\rho = 0,250$ P = 0,022	n.a.	
CD26		$\rho = -0,292$ P = 0,007		n.a.

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un paciente tiene, o está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas que comprende,
 - i) determinar el nivel de proteína de los biomarcadores S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26 en una muestra de sangre ex vivo, plasma o suero tomada del paciente y,
 - ii) establecer la significación estadística de la concentración de los biomarcadores.
2. El método de la reivindicación 1 en donde se determinan también los niveles de uno o más de los biomarcadores adicionales seleccionados de IL-8, CEA, VEGF y CRP.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en donde cada uno de los valores de concentración del biomarcador se introduce en una metodología estadística para producir un valor de salida que indica si el paciente tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer de páncreas.
4. El método de la reivindicación 3 en donde la metodología estadística utilizada es la regresión logística, árboles de decisión, máquinas de vectores de soporte, redes neuronales, bosques aleatorios u otro algoritmo de aprendizaje automático.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la muestra del paciente se pone en contacto con un dispositivo de estado sólido que comprende un sustrato que tiene una superficie activada en la que se inmoviliza, en áreas discretas de dicha superficie activada, uno o más anticuerpos específicos para S100A11, M-CSF, C3adesArg y CD26.

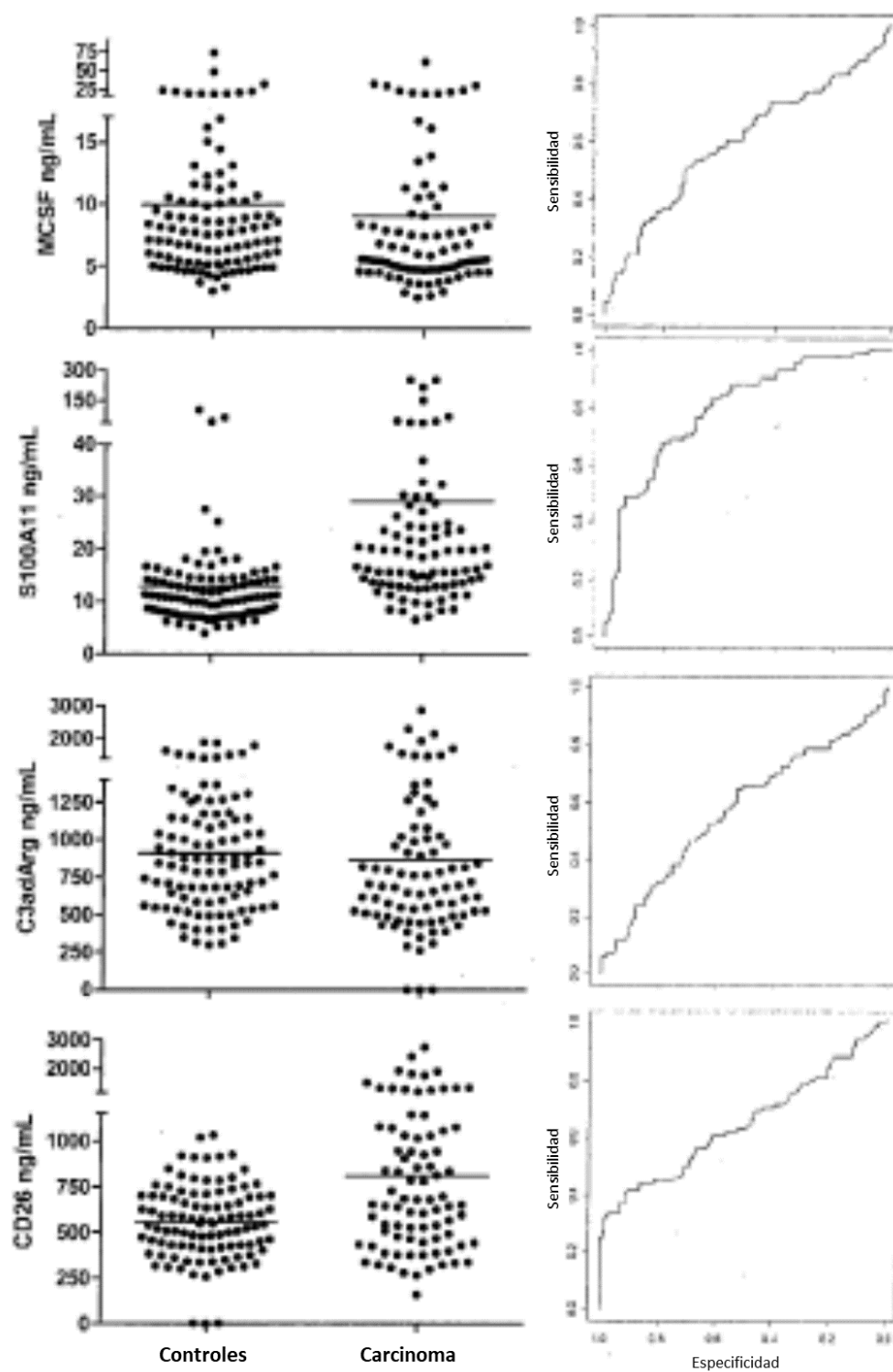


Figura 1

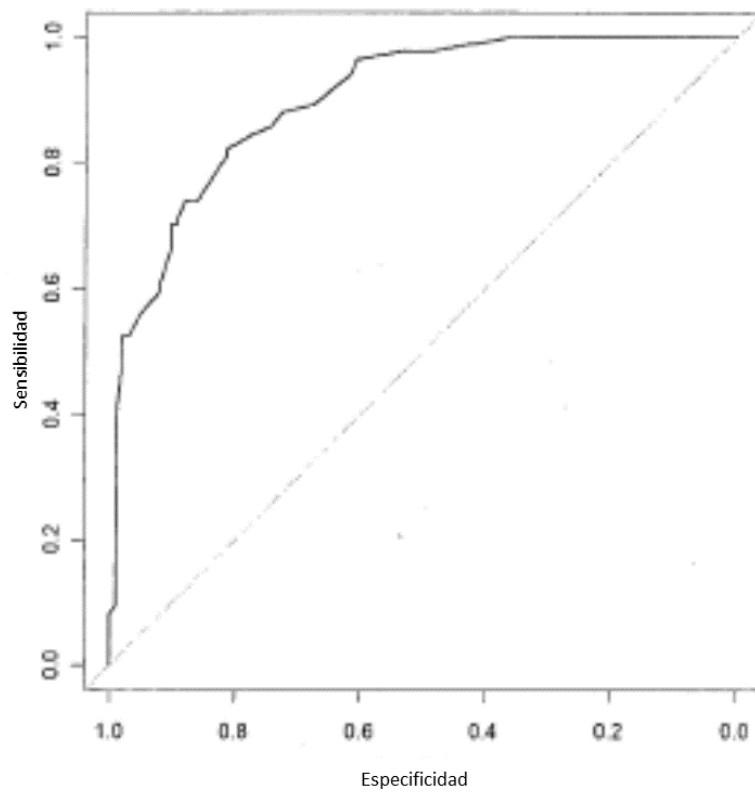


Figura 2

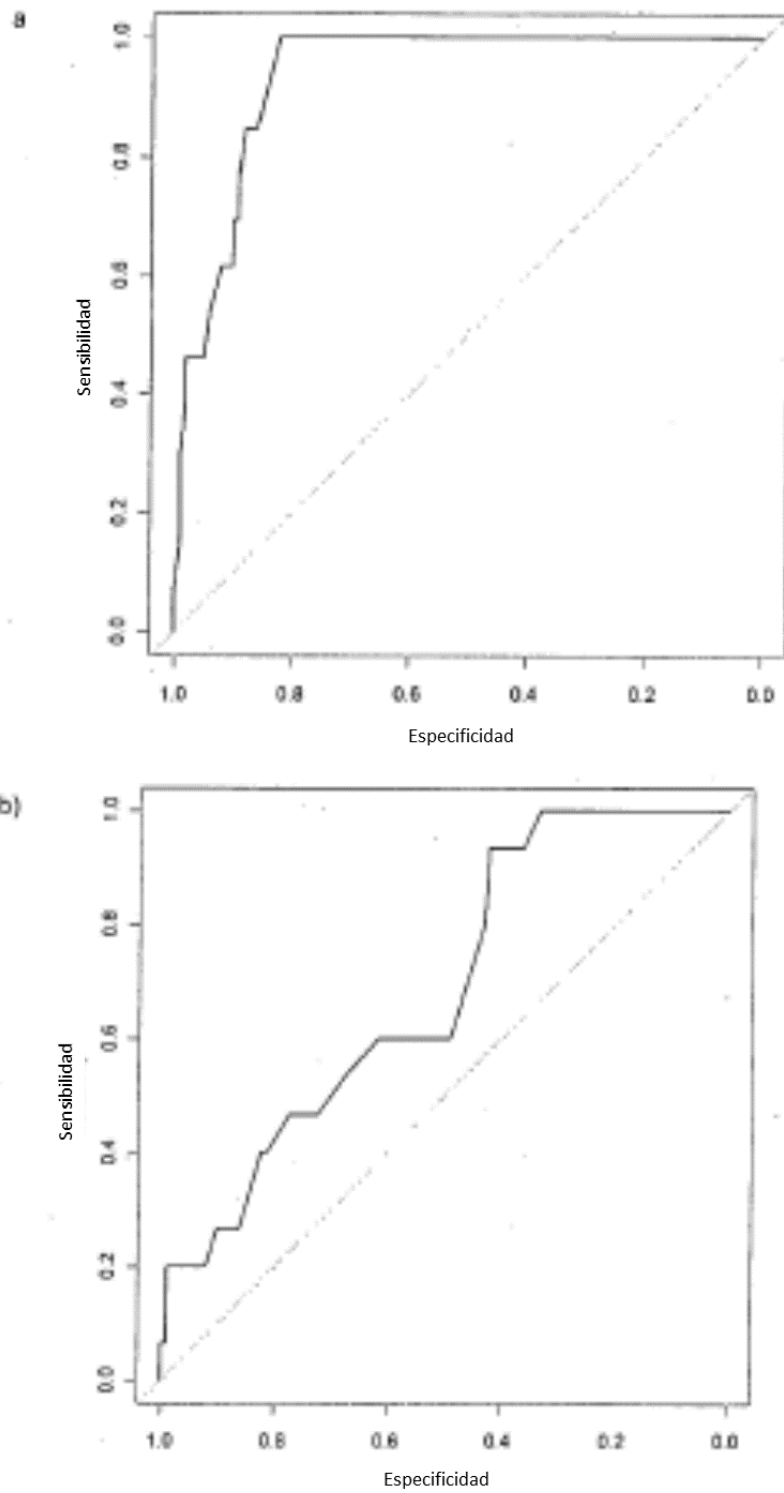


Figura 3