

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 733**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2014 PCT/KR2014/008242**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2015 WO15174585**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2014 E 14892029 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019 EP 3144676**

54 Título: **Kit que comprende un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del factor B del complemento y un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del antígeno carbohidrato 19-9 para el diagnóstico del cáncer pancreático**

30 Prioridad:

12.05.2014 KR 20140056585

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

31.07.2020

73 Titular/es:

**JW HOLDINGS CORPORATION (100.0%)
(Secho-dong) 2477, Nambusunhwan-ro, Seocho-gu
Seoul 06725, KR**

72 Inventor/es:

**PAIK, YOUNG-KI y
LEE, MIN JUNG**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 776 733 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

Kit que comprende un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del factor B del complemento y un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del antígeno carbohidrato 19-9 para el diagnóstico del cáncer pancreático

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere a un kit de diagnóstico para el cáncer de páncreas que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína del factor B del complemento y un anticuerpo que se une específicamente a una proteína del antígeno carbohidrato 19-9, un método para proporcionar información para diagnosticar el cáncer de páncreas utilizando el mismo y un método para diagnosticar el cáncer pancreático utilizando el mismo.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer pancreático es el noveno cáncer con una mayor aparición en el mundo, cuya tasa de mortalidad es el cuarto tumor maligno más alto (Lowenfels, AB, et al., *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 197-209, 2006). En la mayoría de los países, la proporción de cáncer pancreático que representa el desarrollo de todos los tumores malignos es solo de 2-3%, pero la proporción del número de muertes representa hasta 6% del total de muertes relacionadas con el cáncer. La razón es que el pronóstico es tan malo que la tasa de supervivencia a 2 años del cáncer de páncreas es lo suficientemente baja como para ser solamente de 10% y la tasa de supervivencia a 5 años no supera 5% (Lee, CN, et al., *Pancreas*, 94-94, 2012).

La mayoría de los cánceres de páncreas no muestra los síntomas hasta que progresa significativamente y, por lo tanto, una vez que se ha diagnosticado el cáncer de páncreas, ya está bien desarrollado, por lo que la cirugía a menudo es imposible. Además, incluso si la cirugía es posible, 80-90% de los pacientes con operación quirúrgica sufre una recaída y acaba falleciendo. Para tratar el cáncer de páncreas, se aplica radioterapia, quimioterapia, etc., además de la terapia quirúrgica, pero la mayoría de los casos muestran un efecto limitado sobre el tiempo de supervivencia del paciente. Por lo tanto, es muy importante diagnosticar el cáncer de páncreas en un estadio temprano.

Un método para diagnosticar el cáncer de páncreas incluye la biopsia utilizando la tomografía computarizada (CT) o un dispositivo de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), y recientemente, se determina midiendo el análisis de proteínas en los fluidos corporales, tales como el plasma sanguíneo, como muestras clínicas que pueden diagnosticar el cáncer de páncreas, al mismo tiempo que la presencia o el riesgo de cáncer de páncreas. Actualmente, el marcador tumoral más común asociado con el cáncer de páncreas es el antígeno carbohidrato 19-9 (CA 19-9), pero se sabe que CA 19-9 está elevado en el plasma sanguíneo de todos los pacientes con cánceres del sistema digestivo, incluyendo cáncer del tracto biliar además del cáncer de páncreas, y también en casos de colangitis sin tumor maligno y obstrucción biliar, y por lo tanto hay un problema en cuanto a la baja especificidad (fuente: Korea National Health Information Portal). Además, no se puede utilizar en el diagnóstico precoz, ya que, en muchos casos, en el cáncer temprano, aparecen niveles sanguíneos normales del marcador CA 19-9.

Mientras tanto, el factor B del complemento (CFB) también es una proteína conocida como CFB, que es uno de los ingredientes clave en las rutas alternativas de activación del complemento. Las rutas alternativas son activadas por estructuras de azúcares sobre las superficies celulares de los patógenos, independientemente de la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Primero, la activación se induce combinando una pequeña cantidad de C3b presente en la sangre con las superficies de los microorganismos. Cuando C3b se combina con el factor B del complemento en la sangre, éste es degradado por el factor D del complemento a C3bBb y Ba, en los que C3bBb es estabilizado por la properidina para generar la convertasa C3 de la ruta alternativa y entrar en la fase de amplificación que crea más C3b. Como resultado, se genera más convertasa C3, y la convertasa C3 resultante y C3b se combinan con las superficies celulares de los microorganismos para formar el complejo C3bBb3b. El complejo C3bBb3b formado representa la acción de la convertasa C5 de la ruta alternativa, y degrada C5 a C5a y C5b y finalmente forma MAC sobre las superficies bacterianas. Como resultado, la bacteria muere y se elimina el antígeno. El factor B del complemento se conoce como una proteína secretada que juega un papel importante en la generación de c5 combinando la proteína c3b en la fase inicial de esta ruta alternativa, y se encuentran presentes 5 sitios glicano como glicoproteína.

El documento WO 2004/055519 proporciona polipéptidos que están regulados por incremento o por disminución en el cáncer de páncreas y que se pueden utilizar como marcadores para el diagnóstico de cáncer de páncreas.

K. E. Poruk et al.: "The Clinical Utility of CA 19-9 in Pancreatic Adenocarcinoma: Diagnostic and Prognostic Updates", *Current Molecular Medicine*, 2013, pág. 340-351, proporcionan una actualización de la evaluación de la precisión de CA 19-9 y CEA y, a diferencia de las revisiones anteriores, se centran en la discriminación entre enfermedades malignas y benignas en lugar de los controles normales.

El documento WO 2012/120288 se refiere a un método para determinar la presencia de cáncer de páncreas.

El documento KR 2013 0116433 proporciona marcadores para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas.

Pang, Wei Wei et al.: "Can the acute-phase reactant proteins be used as cancer biomarkers?", The International Journal of Biological Markers, vol. 25, núm. 1, 2010, págs. 1-11, presentan en esta revisión algunas indicaciones de que las huellas dactilares de proteínas reaccionantes de fase aguda (APRP) se pueden utilizar como biomarcadores complementarios del cáncer.

Se sabe que el factor B del complemento se secreta en sueros de varios pacientes que padecen cáncer de ovario (Wu. J., et al., JPR, 4541-52, 2012), cáncer de epifaringe (Seriramalu R., et al., *Electrophoresis*, 2388-95, 2010), cáncer de mama (Doustjalali, SR, et al., *Electrophoresis*, tal como, 2392-401, 2004). Sin embargo, hasta la fecha no se ha intentado diagnosticar el cáncer de páncreas con una combinación de factor B del complemento y carbohidratos.

Descripción detallada de la invención

Por consiguiente, la presente solicitud está destinada a proporcionar un kit para diagnosticar el cáncer de páncreas que comprende un anticuerpo que se une específicamente a una proteína del factor B del complemento, que es un nuevo biomarcador para diagnosticar cáncer de páncreas que tiene una especificidad y sensibilidad excelentes, y un anticuerpo que se une específicamente a una proteína del antígeno carbohidrato 19-9, un método para proporcionar información para diagnosticar el cáncer de páncreas utilizando el mismo y un método para diagnosticar el cáncer de páncreas utilizando el mismo.

La presente solicitud proporciona un método para diagnosticar cáncer de páncreas y un método para proporcionar información para diagnosticar cáncer de páncreas, que comprende medir el nivel de expresión de proteína del factor B del complemento en la muestra de sangre separada de un sujeto.

La presente solicitud proporciona la utilización como marcador de diagnóstico para el cáncer de páncreas del factor B del complemento (CFB). Más específicamente, la presente solicitud proporciona un kit para diagnosticar el cáncer de páncreas que comprende un anticuerpo que se une específicamente a la proteína del factor B del complemento.

En una realización, la proteína del factor B del complemento puede ser una que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1:

MGSNLSPQLCLMPFILGLLSGGVTTTPWSLARPQGSCSLEGVEIKGGSFRLQEGQAL
 EYVCPSPGFYPYPVQTRTCRSTGSWSTLKTQDQKTVRKAECRAIHCPRPHDFENGEY
 WPRSPYYNVSDEISFHCYDGYTLRGSANRTCQVNGRWSGQTAICDNGAGYCSNPGIP
 IGTRKVGVSQYRLEDSVTYHCSRGLTLRGSQRRTCQEGGSWSGTEPSCQDSFMYDTPQ
 EVAEAFSLSTETIEGVDAEDGHGPGEQQRKIVLDPSGSMNIYLVLDGSDSIGASNFT
 GAKKCLVNLIEKVASYGVKPRYGLVTYATYPKIWVKVSEADSSNADWVTKQLNEIN
 YEDHKLKSGTNTKKALQAVYSMMSWPDDVPPEGWNRTRHVILMTDGLHNMGGDP
 ITVIDEIRDLLYIGKDRKNPREDYLDVYVFGVGPLVNQVNINALASKKDNEQHVFKV
 KDMENLEDVFYQMIDESQSLSLCGMVWEHRKGTDYHKQPWQAKISVIRPSKGHESC
 MGAVVSEYFVLTAACHFTVDDKEHSIKVSVGGEKRDLEIEVVLPHPNYNINGKKEAG
 IPEFYDYDVALIKLKNLKYGQTIRPICLPCTEGTTRALRLPPTTTCQQQKEELLPAQDI
 KALFVSEEEKLTRKEVYIKNGDKKGCERDAQYAPGYDKVKDISEVVTPRFLCTGG
 VSPYADPNTCRGDSGGPLIVHKRSRFIQVGVISWGVVDVCKNQKRQKQVPAHARDF
 HINLFQVLPWLKEKLQDEDLGFL

En una realización, el sujeto puede ser un paciente del que se sospecha que tiene cáncer de páncreas.

En una realización, puede comprender adicionalmente una etapa de comparación del nivel de expresión de proteína del factor B del complemento en la muestra de sangre separada de un sujeto con el nivel de expresión de proteína del factor B del complemento dentro del grupo de control normal. En la presente memoria descriptiva, el grupo de control normal se refiere a una muestra de sangre separada de un sujeto sano sin cáncer de páncreas y otras enfermedades. Si al comparar las dos muestras, los niveles de expresión de proteínas del factor B del complemento en la muestra del paciente que se sospecha que tiene cáncer de páncreas es mayor que el nivel de expresión de

proteínas del factor B del complemento en la muestra del grupo de control normal, el paciente candidato anterior puede ser clasificado como paciente con cáncer de páncreas. Por ejemplo, si el nivel de proteína del factor B del complemento en la muestra del paciente candidato con cáncer de páncreas es dos veces superior o más que el nivel de proteína del factor B del complemento en la muestra del grupo de control normal, el paciente candidato anterior se puede clasificar como el paciente con cáncer de páncreas

5

En una realización, la muestra de sangre puede ser una muestra de sangre completa, plasma o suero.

En la presente solicitud, el término "diagnóstico" significa la determinación de la presencia o características de la patología. En vista del propósito de esta solicitud, el diagnóstico consiste en determinar si es la generación y la recurrencia son de cáncer de páncreas.

10 En la presente solicitud, el término "marcador para el diagnóstico" o "marcador de diagnóstico" es una sustancia que puede permitir diagnosticar o determinar la presencia de células cancerosas al distinguir las células cancerosas de las células normales. El marcador que incluye biomoléculas orgánicas, tales como polipéptidos o ácidos nucleicos (por ejemplo: ARNm, etc.), lípidos, glicolípidos, glucoproteínas o azúcares (monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, etc.), aumentaron o disminuyeron en las células cancerosas por encima de las células normales. En
15 vista de los propósitos de esta solicitud, los marcadores de diagnóstico de cáncer de páncreas son los genes de CA 19-9 y/o de la proteína B del complemento B y las proteínas que codifican para mostrar específicamente un alto nivel de expresión en células de cáncer de páncreas sobre células de tejido pancreático normales.

En la presente solicitud, el término "medir el nivel de expresión de una proteína" es un procedimiento para determinar la presencia de la proteína expresada por genes marcadores de cáncer y la cantidad de proteínas expresadas en la muestra biológica, en el que la cantidad de proteína se confirma utilizando el anticuerpo que se une específicamente a las proteínas de los genes anteriores. El método de análisis para esto incluye, pero no se limita a, transferencia Western, ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzima ligada), radioinmunoensayo (RIA), radioinmudifusión, inmunodifusión de Ouchterlony, inmunoelectroforesis en cohete, inmunotinción de tejido, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo de fijación de complemento, FACS y chip de proteínas, y similares.

20 Por "se une específicamente" en la presente invención, se quiere significar que la fuerza de unión a una sustancia elegida como diana es lo suficientemente excelente como para ser capaz de detectar la presencia de la sustancia elegida como diana por mediante la unión sobre otras sustancias.

En la presente solicitud, "anticuerpo" representa el péptido o polipéptido sustancialmente encriptado derivado de un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o los fragmentos de los mismos o elaborados siguiendo el patrón de los mismos, que son capaces de unirse específicamente al antígeno o epítipo. En la presente solicitud, el anticuerpo incluye un anticuerpo completo y fragmentos de anticuerpo e incluye varios tipos de estructuras de anticuerpos sin estar limitado a estos. El fragmento de anticuerpo comprende partes del anticuerpo completo, dominios variables del anticuerpo, o al menos sitios de unión a antígeno del anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen un diacuerpo, una molécula de anticuerpo de cadena sencilla y un anticuerpo multiespecífico
35 formado a partir de los fragmentos de anticuerpo.

En una realización, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos para la proteína del factor B del complemento se pueden preparar mediante métodos que generalmente se llevan a cabo en la técnica, por ejemplo, métodos de fusión (Kohler y Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos Núm. 4.816.56) o métodos de bibliotecas de anticuerpos en fagos (Clackson e al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597 (1991)). Los procedimientos generales para la preparación del anticuerpo son descritos en detalle por Harlow, E. y Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; y Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991. Por ejemplo, las células de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales se preparan por fusión de líneas celulares inmortales con los linfocitos productores de anticuerpos, y la técnica requerida para este procedimiento es bien conocida por un experto en la técnica, que se puede implementar fácilmente. Los anticuerpos policlonales se pueden obtener inyectando el antígeno de la proteína del factor B del complemento al animal apropiado y recolectando antiseros de este animal, y a continuación, separando los anticuerpos de los antiseros utilizando la técnica de afinidad conocida.

50 En la presente solicitud, el término "sensibilidad" representa la probabilidad de que el resultado de la prueba de diagnóstico sea positivo al haber sufrido la enfermedad correspondiente, mientras que "especificidad" representa el grado de posibilidad de que el resultado de la prueba sea negativo sin haber sufrido la enfermedad.

Las proteínas del factor B del complemento se seleccionaron como sustancias candidatas para el marcador de diagnóstico de cáncer de páncreas para confirmar la presencia de la proteína del factor B del complemento de los plasmas de personas normales y pacientes con cáncer de páncreas, y observar el cambio. Como resultado, se confirmó que el nivel de expresión de proteína del factor B del complemento en el plasma de los pacientes con cáncer de páncreas era muy alto en comparación con el grupo de control normal (Ejemplos 1 y 2). Además, cuando se comparó con el CA 19-9 conocido como marcador de diagnóstico de cáncer de páncreas existente, se realizaron
55

- un ELISA y un análisis de la curva ROC (Característica Operativa del Receptor) para verificar la eficacia como marcador de diagnóstico para el cáncer de páncreas del CFB, y se analizaron la sensibilidad y la especificidad de CFB y CA 19-9 en función de sus valores de corte óptimos (Ejemplos 3 a 6). Como resultado, se pudo observar que la expresión de CA 19-9 también aumenta en el cáncer de hígado, cáncer de vías biliares y cáncer de estómago, incluido el cáncer de páncreas, y por lo tanto se reduce la especificidad. Es decir, esto significa que el CA 19-9 solo no es adecuado para su uso como marcador de diagnóstico de cáncer de páncreas. Sin embargo, dado que la expresión del CFB se incrementó solo en el cáncer de páncreas y tiene una excelente sensibilidad y especificidad, significa que el CFB es adecuado como marcador para el diagnóstico del cáncer de páncreas.
- Mientras tanto, existe el problema de que el CA 19-9 solo ha reducido la especificidad como marcador de diagnóstico de cáncer de páncreas, pero cuando se utiliza el CA 19-9 con el CFB, se puede ver que representa la sensibilidad y especificidad más excelentes. Esto significa que si el CA 19-9 solo, no es adecuado para su uso como marcador para diagnosticar el cáncer de páncreas, si se utiliza el CA 19-9 junto con el CFB, se puede diagnosticar el cáncer de páncreas con mayor precisión.
- Por lo tanto, en una realización, el kit puede comprender adicionalmente un anticuerpo que se une específicamente al antígeno carbohidrato 19-9.
- La presente solicitud también proporciona un método para diagnosticar cáncer de páncreas y un método para proporcionar información para diagnosticar cáncer de páncreas, que comprende medir los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento y el antígeno carbohidrato 19-9 en la muestra de sangre separada de un sujeto.
- En una realización, el sujeto puede ser un grupo de pacientes que se sospecha que tiene cáncer de páncreas.
- En una realización, puede comprender adicionalmente una etapa de comparación de los niveles de expresión de proteínas del factor B del complemento y CA 19-9 en las muestras de sangre aisladas de un sujeto que se sospecha que tiene cáncer de páncreas con los niveles de expresión de proteínas del factor B del complemento y CA 19-9 en el grupo de control normal. Si al comparar las dos muestras, todos los niveles de expresión de proteínas del factor B del complemento y CA 19-9 en la muestra del sujeto que se sospecha que tiene cáncer de páncreas son mayores que los niveles de expresión de proteínas del factor B del complemento y CA 19-9 en la muestra del grupo de control normal, el sujeto anterior se puede clasificar como paciente con cáncer de páncreas. Por ejemplo, si el nivel de proteína del factor B del complemento en la muestra de un sujeto que se sospecha que tiene cáncer de páncreas es dos veces superior o más que el nivel de proteína del factor B del complemento en la muestra del grupo de control normal y el nivel de CA 19-9 en la muestra del sujeto que se sospecha que tiene cáncer de páncreas es de 37 U/ml o más, el sujeto anterior que se sospecha que tiene cáncer de páncreas se puede clasificar como un paciente con cáncer de páncreas.
- En una realización, la muestra de sangre puede ser una muestra de sangre completa, plasma o suero.
- En un método para el diagnóstico del cáncer de páncreas que comprende medir los niveles de expresión de proteínas del factor B del complemento y el antígeno carbohidrato 19-9 como un biomarcador para diagnosticar cáncer de páncreas, la presente solicitud también proporciona un método para el diagnóstico del cáncer de páncreas que comprende las siguientes etapas:
- una primera etapa de recogida de una muestra de sangre de un sujeto;
 - una segunda etapa contacto de la muestra de sangre con el anticuerpo marcado de manera detectable que se une específicamente a un biomarcador para formar un complejo del anticuerpo y el biomarcador;
 - una tercera etapa de separación del complejo formado en la segunda etapa del anticuerpo marcado que no contiene el complejo;
 - una cuarta etapa de cuantificación de una señal de la marca detectable del anticuerpo que contiene el complejo formado en la segunda etapa para medir la cantidad del biomarcador en la muestra de sangre;
 - una quinta etapa de comparación de la cantidad del biomarcador medido en la cuarta etapa y la cantidad del biomarcador en un grupo de control; y
 - una sexta etapa de diagnóstico como cáncer de páncreas, cuando la cantidad del biomarcador en la muestra es mayor que la cantidad del biomarcador en el grupo de control en la quinta etapa.
- Aquí, el biomarcador se refiere al factor B del complemento o al carbohidrato 19-9.
- En la cuarta etapa, dado que la señal de la marca detectable del complejo biomarcador-anticuerpo es proporcional a la cantidad del biomarcador en la muestra de sangre, se puede observar la cantidad de biomarcador a partir de ésta.
- En una realización, la cantidad del biomarcador en el grupo de control se refiere a la cantidad del biomarcador en la muestra de sangre del sujeto sin cáncer pancreático.

En una realización, la muestra de sangre puede ser una muestra de sangre completa, plasma o suero.

En una realización, puede comprender adicionalmente una etapa de separación del biomarcador y las proteínas además del biomarcador en la muestra de sangre mediante inmunoprecipitación entre la primera etapa y la segunda etapa.

5 En una realización, la etapa de separación del biomarcador y las proteínas además del biomarcador puede comprender las siguientes etapas:

i) una etapa de contacto de la muestra de sangre separada del sujeto con el anticuerpo que se une específicamente al biomarcador para formar un complejo entre el anticuerpo y el biomarcador;

ii) una etapa de precipitación del complejo formado en la etapa i);

10 iii) una etapa de separación del complejo precipitado del sobrenadante de la muestra que contiene otras proteínas además del biomarcador y el anticuerpo que no forma el complejo.

De acuerdo con la presente solicitud, se puede proporcionar el marcador de diagnóstico de cáncer de páncreas con sensibilidad y especificidad mejoradas.

Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1a muestra una imagen de electroforesis bidimensional del plasma de una persona normal, y la Figura 1b muestra una imagen de electroforesis bidimensional del plasma de un paciente con cáncer de páncreas. Las manchas indicadas por las flechas se refieren a las proteínas del factor B del complemento.

20 La Figura 2 representa la diferencia de expresión del factor B del complemento en el plasma de la persona normal y el plasma del paciente con cáncer de páncreas, que muestra imágenes de electroforesis vertical bidimensional de las partes con manchas (punto negro) en las Figuras 1a y 1b.

La Figura 3a muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento en plasmas de pacientes con cáncer de páncreas y normales mediante transferencia Western (N: normal, C: cáncer de páncreas).

La Figura 3b es un gráfico que muestra la intensidad de la banda de transferencia Western en la Figura 3a.

25 La Figura 4a muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento en líneas celulares normales (HPDE) y líneas celulares de cáncer de páncreas (HPAC1, BXPC3, PANC1) por medio de transferencia Western.

30 La Figura 4b muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento en líneas celulares normales (HPDE) y líneas celulares de cáncer de páncreas (HPAC1, BXPC3, PANC1) por medio de RT-PCR.

La Figura 4c es un gráfico que muestra la intensidad de la banda en la Figura 1b.

La Figura 5a es el resultado del análisis de los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento (CFB) por medio de transferencia Western. HD representa normal, CP pancreatitis y PC cáncer de páncreas.

35 La Figura 5b es un gráfico que muestra la intensidad de la banda de transferencia Western en la Figura 5a. HD representa, CP pancreatitis, PC cáncer de páncreas.

La Figura 6 muestra los resultados del análisis de los niveles de expresión de CFB y CA 19-9 en varios tipos de cáncer por medio de ELISA (a: CFB, b: CA 19-9). HD representa normal, CP pancreatitis, PC cáncer de páncreas, HCC cáncer de hígado, CC cáncer de conducto biliar y GC cáncer de estómago.

La Figura 7 muestra las curvas ROC de CA 19-9, CFB y CFB + CA 19-9.

40 EJEMPLOS

En lo sucesivo, la presente solicitud se explica en detalle a través de ejemplos. Los siguientes ejemplos están destinados simplemente a ilustrar la presente solicitud, a los cuales no está restringido el alcance de la presente solicitud.

[Ejemplo 1] Análisis de los niveles de expresión de proteína del factor B de complemento (CFB)

45 **Ejemplo 1-1. Detección de la proteína CFB en plasma mediante electroforesis en gel y espectrometría de masas**

Para detectar la presencia y la cantidad de CFB en plasma de personas normales y pacientes con cáncer de

páncreas, se realizaron electroforesis y espectrometrías de masas.

Los plasmas se obtuvieron de Gene Bank and Department of Gastroenterology in Severance Hospital de acuerdo con las regulaciones de Institutional Review Board (IRB). Se utilizaron muestras de plasma dispensándolas en 200 µl y manteniéndolas antes del experimento a -70°C. Debido a que el factor B del complemento es una proteína secretada y las proteínas de alta abundancia conocidas están presentes en los plasmas, las proteínas además del factor B del complemento se eliminaron con Hu-14 (Agilent), y a continuación se realizó una electroforesis bidimensional. Para la electroforesis bidimensional, se marcaron 50 µg de cada muestra analítica y la muestra de referencia correspondiente con 400 pmoles de Cy3, Cy5, Cy2 (GE Healthcare) como un colorante fluorescente en condiciones de oscuridad durante 30 minutos, y la reacción se detuvo con 1 µL de lisina 10 mM. Para alcanzar 450 µL finalmente mezclando tres muestras, cada una marcada con el colorante fluorescente, entre sí, se añadió la solución tampón de muestra [urea 6 M, tiourea 2 M, Chaps al 4%, ditiotreitól (DTT) 60 mM, Tris 30 mM, pH 8,5] y se rehidrató junto con una solución tampón IPG 4-7NL al 2% a temperatura ambiente durante 16 horas. El isoelectroenfoco (IEF) se realizó utilizando Immobiline DryStrip pH 4-7NL (GE Healthcare) en el sistema de electroforesis MultiPhor II (GE Healthcare) hasta 95.000 V como requisito óptimo, y se llevaron a cabo la reducción y la alquilación en una sola etapa con una solución tampón de tributilfosfina [urea 6 M, dodecil sulfato de sodio al 2% (SDS), Tris 30 mM, glicerol al 20%, solución de acrilamida al 2,5%, tributilfosfina 5 mM] durante 25 minutos.

Los resultados de la electroforesis bidimensional para plasmas de personas normales se representaron en la Figura 1a, y los resultados de la electroforesis bidimensional para plasmas de pacientes con cáncer de páncreas se representaron en la Figura 1b. Las flechas en las Figuras indican CFB. Como resultado, se pudo observar que aumentaba la expresión de CFB.

Además, en los plasmas de personas normales y pacientes con cáncer de páncreas, se realizó la electroforesis vertical secundaria para investigar la diferencia en la expresión de CFB. Este separó utilizando el sistema de electroforesis Ettan Dalttwelve (GE Healthcare) para la electroforesis vertical secundaria y utilizando gel de poliacrilamida al 9% ~ 16%, y se digitalizó por medio del escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) con longitudes de onda correspondientes a Cy2, Cy3, Cy5, después de completar la electroforesis. Cada imagen de gel se analizó utilizando el soporte lógico de análisis DeCyder 2-D (GE Healthcare).

Como resultado, al igual que los resultados de la electroforesis bidimensional, se pudo observar en pacientes con cáncer de páncreas que aumentaba la expresión de CFB (Figura 2).

Después de analizar las imágenes, se realizó la espectrometría de masas en las manchas indicadas por las flechas en las Figuras 1a y 1b para investigar la presencia del CFB. Se recogieron manchas de proteína del gel teñido con colorante azul Coomassie, se decoloraron y se digirieron con tripsina, y a continuación los péptidos digeridos se desalaron utilizando una mezcla de resinas Poros R2 y Oligo R3. La identificación de proteínas se analizó mediante Q-TOF (Agilent), y el espectro obtenido mediante Q-TOF-MS se identificó utilizando la base de datos MASCOT.

Como resultado, se pudo confirmar, como se muestra en la Tabla 1 a continuación, que las manchas indicadas por las flechas en las Figuras 1a y 1b son CFB.

[Tabla 1]

Número	Nombre de la proteína	Valor de pI	Puntuación	Razón de Consultas Coincidentes		Cobertura de secuencia
gi 291922	Factor B del complemento	6,55	171	25	1,5	11%

Ejemplo 1-2. Análisis de los niveles de expresión de proteína CFB en plasmas

Para analizar los niveles de expresión de la proteína CFB en plasmas de pacientes con cáncer de páncreas, se realizó la inmunotransferencia. La transferencia Western se realizó usando anticuerpos de las mismas cantidades de proteína en plasmas de 10 personas normales y plasmas de 10 pacientes con cáncer de páncreas. Después del análisis de SDS-PAGE al 10% de aproximadamente 10 µg de la proteína plasmática, el gel se transfirió a la membrana de nitrocelulosa (NC) para la transferencia Western y después se bloqueó con una solución tampón TBS-T que contenía leche desnatada al 5% [Tris 20 mM, cloruro de sodio 137 mM, Tween-20 al 0,1%, pH 7,6] durante 1 hora. El anticuerpo anti-factor B del complemento (CFB, Abcam) se trató primero diluyéndolo en la solución tampón de TBS-T que contenía leche desnatada al 5% 1:1000 veces, y el anti-IgG-HRP de ratón (Santa Cruz) se trató de forma secundaria 1:10000 veces. La membrana NC final se hizo reaccionar con reactivo de transferencia Western ECL Plus (GE Healthcare) durante 1 minuto, y se analizó digitalizándolo un escáner Typhoon 9400.

Como resultado, como se muestra en la Figura 3a, se pudo observar que la expresión de CFB aumentaba en el grupo de pacientes con cáncer de páncreas.

Al analizar el resultado de la Figura 3a a través de la intensidad de la banda en torno a las razones de multiplicidad,

se confirmó que CFB es altamente expresado en los plasmas de los pacientes con cáncer de páncreas sobre el grupo normal (Figura 3b).

Ejemplo 1-3. Análisis de los niveles de expresión de CFB en células de cáncer de páncreas

5 Se realizaron transferencias Western y RT-PCR para determinar los niveles de expresión de CFB en las líneas celulares de cáncer de páncreas. Se utilizó HPDE (célula epitelial del conducto pancreático humano) como líneas celulares normales, y se utilizaron HPAC1, BXPC3 (célula epitelial de adenocarcinoma de páncreas humano) y PANC1 (carcinoma epitelioide de páncreas humano) como líneas celulares pancreáticas. Se inmunoprecipitaron juntos 2 µg de anticuerpo anti-factor B del complemento y 10 µl de proteína G - agarosa en un tubo de 1 ml durante 2 horas, utilizando 1 mg de cada producto lisado celular, y a continuación se determinaron los niveles de expresión de CFB en las células normales y las células de cáncer de páncreas mediante transferencia Western. Como resultado, se confirmó que no se detectaba CFB en las células normales, sino que solo se detecta en las células de cáncer de páncreas (Figura 4a).

10 A continuación, se determinó el nivel de expresión de ARNm de CFB utilizando RT-PCR. El ARN total se extrajo utilizando easy-BLUE (iNtRON, Gyeonggi, Corea), y se sintetizó el ADNc utilizando el kit omniscrypt RT (Qiagen, Hilden, Alemania). Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Cebador CFB (SEQ ID NO: 2): 5'-CAACAGAAGCGGAAGATCGTC-3' (directo)

Cebador CFB (SEQ ID NO: 3): 5'-TATCTCCAGGTCCCGCTTCTC-3' (inverso)

Cebador GAPDH (SEQ ID NO: 4): 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (directo)

Cebador GAPDH (SEQ ID NO: 5): 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (inverso)

20 Las condiciones de PCR fueron 35 ciclos, desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, reasociación a 59°C durante 1 minuto y extensión del cebador a 72°C durante 1 minuto. Como resultado, se confirmó, como en los datos de la transferencia Western, que el CFB no se detecta en las células normales, sino que se detecta solamente en las células de cáncer de páncreas (Figura 4b). Al analizar el resultado de la Figura 1a a través de la intensidad de la banda en torno a las razones de multiplicidad, se confirmó que CFB es altamente expresado en las líneas celulares de cáncer de páncreas sobre las líneas celulares normales (Figura 4c).

[Ejemplo 2] Análisis del nivel de expresión de proteína del factor B del complemento (CFB) con una pluralidad de muestras

Para averiguar una posibilidad definitiva como candidato a biomarcador sobre CFB, se realizó el experimento de confirmación independiente adicional utilizando grandes cohortes de pacientes.

30 La transferencia Western se realizó de la misma manera que en los Ejemplos 1 a 3, utilizando plasmas de 44 personas normales, 12 pacientes con pancreatitis y 40 pacientes con cáncer de páncreas y después utilizando los plasmas agrupados de las personas normales como patrón. Como resultado, se pudo confirmar que CFB es altamente expresado en PC sobre HD y CP (Figura 5a), y se demostró que CFB es altamente expresado en PC sobre HD y CP, siendo $p < 0,05$ al indicar la intensidad de las bandas de transferencia Western como puntos (Figura 5b). Por lo tanto, se podría confirmar que CFB se expresa dos veces más en PC que en HD y CP, como valores significativos, incluso al realizar el experimento independiente utilizando las grandes cohortes de pacientes.

[Ejemplo 3] Análisis de los niveles de expresión de proteína de CFB y CA 19-9 en varios pacientes con cáncer mediante ELISA

40 Para comparar los niveles de expresión de CA 19-9 y CFB, ahora conocidos como biomarcadores de cáncer de páncreas, se realizaron pruebas ELISA utilizando plasmas de HD, CP, PC, HCC, CC y GC. Se utilizaron los productos de USCN y Panomics como KITs ELISA de CFB y CA 19-9, respectivamente, y los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con cada protocolo para cada producto.

Primero, en el caso del ELISA de CFB, cada plasma se diluyó en 1:10.000, y después se introdujeron alrededor de 100 µl en los pocillos recubiertos con anticuerpo contra CFB. Se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. 45 A continuación, después de retirar los plasmas de los pocillos e introducir 100 µl de una solución de trabajo de reactivo de detección A en ellos, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la solución se retiró de los pocillos, y después se lavaron tres veces repetidamente añadiendo a estos 350 µl de la solución de lavado. A continuación, se introdujeron 100 µl de la solución de trabajo de reactivo de detección B en cada pocillo y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se lavaron cinco veces con la solución de lavado. 50 A continuación, se introdujeron 90 µl de la solución sustrato en cada pocillo, y después se hicieron reaccionar en condiciones de oscuridad durante 15 minutos, seguido de cuantificación a 450 nm utilizando un lector de microplacas después de introducir 50 µl de la solución de parada. Los niveles de expresión de CFB en estos grupos parecían ser 34,0 (intervalo: 26,1 a 41,3), 73,5 (intervalo: 62,3 a 77,1), 92,0 (intervalo: 75,2 a 121,6), 37,0 (intervalo: 28,8 a 47,5), 41,5 (intervalo: 29,1- 52,1), 63,0 (intervalo: 56,3 a 72,9) ng/ml (Figura 6a).

En el caso de CA 19-9 ELISA, cada plasma se introdujo a 10 µl en la placa recubierta con anticuerpo para CFB 19-9, y se introdujeron 100 µl de tampón de ensayo CA 19-9. A continuación se mezclaron bien durante 30 segundos, y después se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos. A continuación, el tampón se retiró de los pocillos, que se lavaron cuatro veces repetidamente utilizando el tampón de lavado. A continuación, se introdujeron cuidadosamente 100 µl del reactivo de producto conjugado de trabajo en cada pocillo, y después se incubaron a temperatura ambiente durante 90 minutos después de mezclarlos bien durante 30 segundos. El reactivo se retiró de los pocillos, que se lavaron cuatro veces repetidamente utilizando el tampón de lavado. A continuación, se introdujo TMB en cada pocillo y se hizo reaccionar durante 20 minutos en condiciones de oscuridad después de mezclarlos durante 10 segundos. A continuación, se introdujeron 100 µl de la solución de parada y se mezclaron durante 30 segundos, seguido de cuantificación a 450 nm utilizando el lector de microplacas. Los niveles de CA 19-9 en estos grupos parecían ser 4,6 (intervalo: 2,8 a 7,2), 10,2 (intervalo: 6,0 a 21,4), 298,8 (intervalo: 111,4 a 832,6), 50,5 (intervalo: 18,1 a 159,5), 137,5 (intervalo: 53,8 a 537,9) y 10,0 (intervalo: 9,4 a 16,7) U/ml (Figura 6b). Los niveles de expresión de CFB en los plasmas se expresaron concretamente como CA 19-9 en el grupo de PC sobre el grupo sin PC (HD, CP, HCC, CC y GC) como CA 19-9 ($p < 0,002$). Asimismo, en el caso de CFB, en comparación con CA 19-9, se demostró que distingue mejor entre el paciente con PC y el paciente sin PC ($P < 0,0001$).

Esto significa que CA 19-9 solo no es adecuado para su uso como marcador de diagnóstico para el cáncer de páncreas, mientras que CFB que aumenta específicamente su expresión en cáncer de páncreas, solo es adecuado como marcador para diagnosticar el cáncer de páncreas.

[Ejemplo 4] Análisis de sensibilidad y especificidad de CFB y CA 19-9 con la curva ROC (Característica Operativa del Receptor), en el diagnóstico de cáncer de páncreas

Para determinar hasta qué punto distinguen CFB y CA 19-9 entre los pacientes con cáncer de páncreas y las personas sin cáncer de páncreas (HD, CP, HCC, CC y GC), se realizó el análisis de la curva ROC utilizando el programa de prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. CFB se comparó con CA 19-9 a través del valor de AUC. Como resultado, el valor de AUC de CFB de 0,958 (IC 95%: 0,956-0,959) parecía ser más alto que el valor de AUC de CA 19-9 de 0,833 (IC 95%: 0,829-0,837). El valor de AUC de 0,986 (0,985-0,986) al combinar los dos (CFB + CA 19-9) mostró un valor de AUC significativamente mayor que aquellos ($p < 0,01$) al utilizar CFB y CA 19-9 solos (Figura 7).

Esto significa que es posible diagnosticar el cáncer de páncreas solo con CFB o una combinación de CFB y CA 19-9.

[Ejemplo 5] Diagnóstico de cáncer de páncreas basado en valores de corte ópticos de CFB y CA 19-9

Para cada grupo (HD; normal, CP; pancreatitis, PC; cáncer de páncreas, HCC; cáncer de hígado, CC; cáncer de vías biliares, GC; cáncer de estómago), se confirmaron las eficacias diagnósticas de CA 19-9 y CFB. Como resultado, como se muestra en la Tabla 2 a continuación, tanto CA 19-9 como CFB mostraron una eficacia diagnóstica similar en la PC (CA 19-9: 80,5%, CFB: 73,2%). Sin embargo, CA 19-9 mostró una alta eficacia de diagnóstico (HCC: 61,3%, CC: 77,2%, GC: 17,1%) para otros tipos de cáncer (HCC, CC, GC), mientras que CFB mostró una baja eficacia de diagnóstico para otros tipos de cáncer (HCC: 0%, CC: 0%, GC: 8,6%). Esto significa que CFB es más específico para PC que CA 19-9 en comparación con otros tipos de cáncer.

[Tabla 2]

	CA 19-9 \geq 37U/ml	CFB \geq 78,4 ng/ml
HD	0%	0 %
CP	8,3 %	8,3 %
PC	80,5 %	73,2 %
HCC	61,3 %	0 %
CC	77,2 %	0 %
GC	17,1 %	8,6 %

[Ejemplo 6] Identificación de la sensibilidad y especificidad de CFB y CA 19-9

Para evaluar la precisión como indicador de diagnóstico de cáncer de páncreas de CFB, CA 19-9 y CFB + CA 19-9, se identificaron la sensibilidad y especificidad (%) de CA 19-9, CFB y CFB + CA 19-9 en el diagnóstico de cáncer de páncreas en comparación con otras enfermedades de acuerdo con los valores de corte ópticos pronosticados por el índice máximo de Youden. Como resultado, como se muestra en la Tabla 3 a continuación, cuando se comparó PC con otros grupos (HD, CP, HCC, CC y GC), la sensibilidad de CA 19-9 parecía ser de 80,4%, siendo la especificidad de 70,0 %, y la sensibilidad de CFB parecía ser 73,1%, siendo la especificidad de 97,9%. Y cuando se combinaron

ES 2 776 733 T3

CFB y CA 19-9, la sensibilidad parecía ser de 90,1%, siendo la especificidad de 97,2%. Esto significa que aparece una mejor eficacia de diagnóstico al combinar CA 19-9 y CFB sobre la de los casos en los que se utilizan CA 19-9 y CFB solos.

[Tabla 3]

	CA 19-9 (U/ml)	CFB (ng/ml)	CA 19-9 + CFB
PC versus otros tipos de cáncer	37	78,4 ²	-
Índice Y	50,4	71,0	87,4
Sensibilidad (%; IC 95%)	80,4 (79,8-81,0)	73,1 (72,4-73,7)	90,1 (89,7-90,6)
Especificidad (%; IC 95%)	70,0 (69,6-70,4)	97,9 (97,8-98,1)	97,2 (97,0-97,3)

5

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> University-Industry Foundation, Yonsei University
- 5 <120> Composición para el diagnóstico de cáncer pancreático que comprende un polipéptido o anticuerpo de unión específica al factor B del complemento
- <130> X14U16C0067
- 10 <160> 5
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- 15 <211> 764
<212> PRT
<213> factor B del complemento de homo sapiens
- <400> 1
- | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Ser | Asn | Leu | Ser | Pro | Gln | Leu | Cys | Leu | Met | Pro | Phe | Ile | Leu |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Gly | Leu | Leu | Ser | Gly | Gly | Val | Thr | Thr | Thr | Pro | Trp | Ser | Leu | Ala | Arg |
| | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Pro | Gln | Gly | Ser | Cys | Ser | Leu | Glu | Gly | Val | Glu | Ile | Lys | Gly | Gly | Ser |
| | | 35 | | | | | 40 | | | | | 45 | | | |
| Phe | Arg | Leu | Leu | Gln | Glu | Gly | Gln | Ala | Leu | Glu | Tyr | Val | Cys | Pro | Ser |
| | 50 | | | | | 55 | | | | | 60 | | | | |
| Gly | Phe | Tyr | Pro | Tyr | Pro | Val | Gln | Thr | Arg | Thr | Cys | Arg | Ser | Thr | Gly |
| 65 | | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 |
| Ser | Trp | Ser | Thr | Leu | Lys | Thr | Gln | Asp | Gln | Lys | Thr | Val | Arg | Lys | Ala |
| | | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | |
| Glu | Cys | Arg | Ala | Ile | His | Cys | Pro | Arg | Pro | His | Asp | Phe | Glu | Asn | Gly |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| Glu | Tyr | Trp | Pro | Arg | Ser | Pro | Tyr | Tyr | Asn | Val | Ser | Asp | Glu | Ile | Ser |
| | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| Phe | His | Cys | Tyr | Asp | Gly | Tyr | Thr | Leu | Arg | Gly | Ser | Ala | Asn | Arg | Thr |
| | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | |
| Cys | Gln | Val | Asn | Gly | Arg | Trp | Ser | Gly | Gln | Thr | Ala | Ile | Cys | Asp | Asn |
| 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 |
| Gly | Ala | Gly | Tyr | Cys | Ser | Asn | Pro | Gly | Ile | Pro | Ile | Gly | Thr | Arg | Lys |
| | | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | |
| Val | Gly | Ser | Gln | Tyr | Arg | Leu | Glu | Asp | Ser | Val | Thr | Tyr | His | Cys | Ser |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| Arg | Gly | Leu | Thr | Leu | Arg | Gly | Ser | Gln | Arg | Arg | Thr | Cys | Gln | Glu | Gly |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | |
| Gly | Ser | Trp | Ser | Gly | Thr | Glu | Pro | Ser | Cys | Gln | Asp | Ser | Phe | Met | Tyr |
| | | 210 | | | | 215 | | | | | 220 | | | | |
| Asp | Thr | Pro | Gln | Glu | Val | Ala | Glu | Ala | Phe | Leu | Ser | Ser | Leu | Thr | Glu |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Thr | Ile | Glu | Gly | Val | Asp | Ala | Glu | Asp | Gly | His | Gly | Pro | Gly | Glu | Gln |

ES 2 776 733 T3

<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> cebador inverso GAPDH

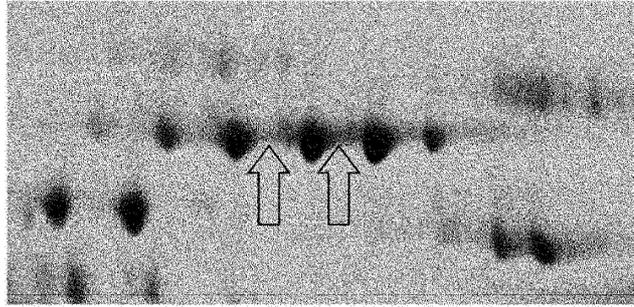
<400> 5
10 tccaccacc tggtgctgta 20

REIVINDICACIONES

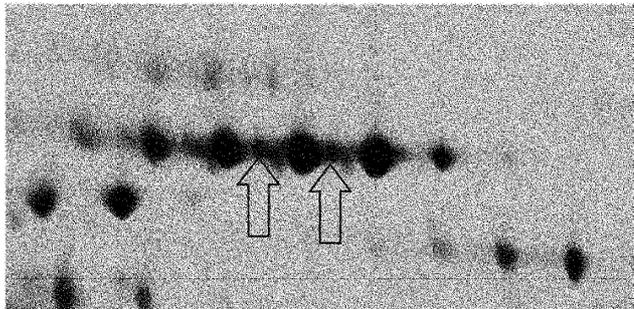
1. Un método para diagnosticar el cáncer de páncreas que comprende medir los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento y antígeno carbohidrato 19-9 en la muestra de sangre que se ha separado de un sujeto.
- 5 2. El método para diagnosticar el cáncer de páncreas según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de comparación de los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento y el antígeno carbohidrato 19-9 en la muestra de sangre separada del sujeto con los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento y antígeno carbohidrato 19-9 en el grupo de control normal, respectivamente.
3. El método para diagnosticar cáncer de páncreas según la reivindicación 1, en donde la muestra de sangre es sangre completa, plasma o suero.
- 10 4. El método para diagnosticar el cáncer de páncreas según la reivindicación 1, en donde los niveles de expresión de proteína del factor B del complemento y el antígeno carbohidrato 19-9 se miden utilizando una electroforesis de fluorescencia bidimensional, transferencia Western, ELISA, radioinmunoensayo, radioinmunodifusión, inmunoelectroforesis o espectrometría de masas.
- 15 5. Un kit para diagnosticar el cáncer de páncreas que comprende un anticuerpo que se une específicamente al factor B del complemento y un anticuerpo que se une específicamente al antígeno carbohidrato 19-9.
6. El kit para diagnosticar el cáncer de páncreas según la reivindicación 5, en donde el factor B del complemento consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
7. El kit para diagnosticar cáncer de páncreas según la reivindicación 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

20

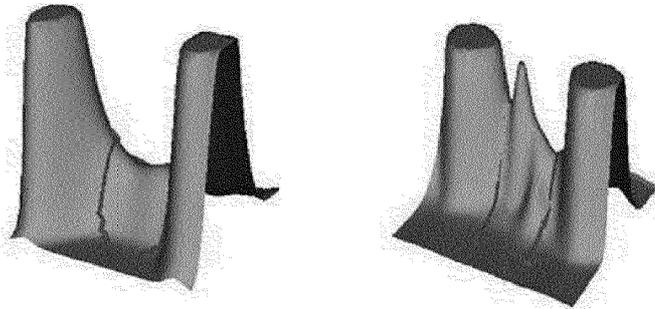
[Figura 1a]



[Figura 1b]



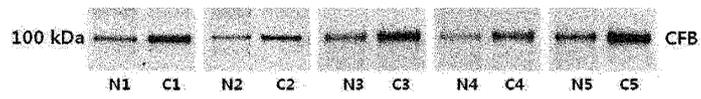
[Figura 2]



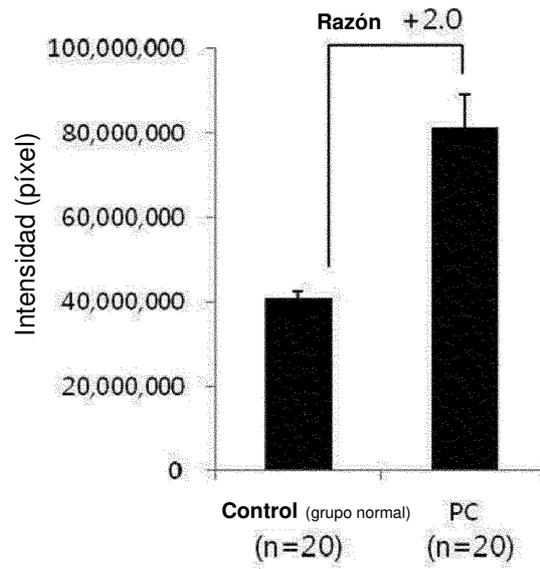
Plasma de sujeto normal

Plasma de paciente con cáncer de páncreas

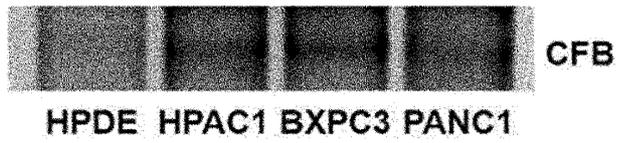
[Figura 3a]



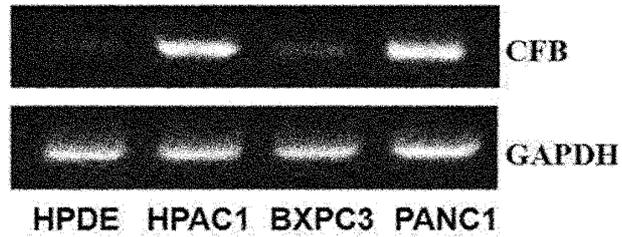
[Figura 3b]



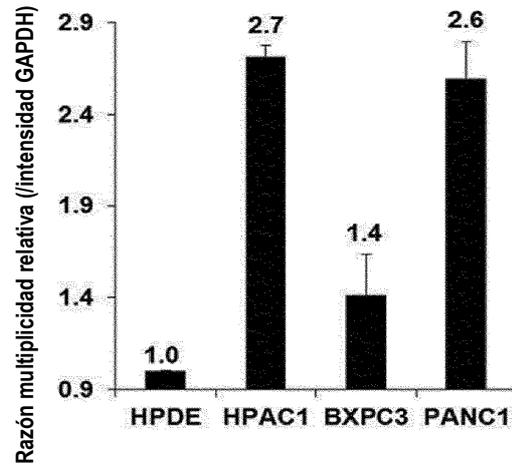
[Figura 4a]



[Figura 4b]



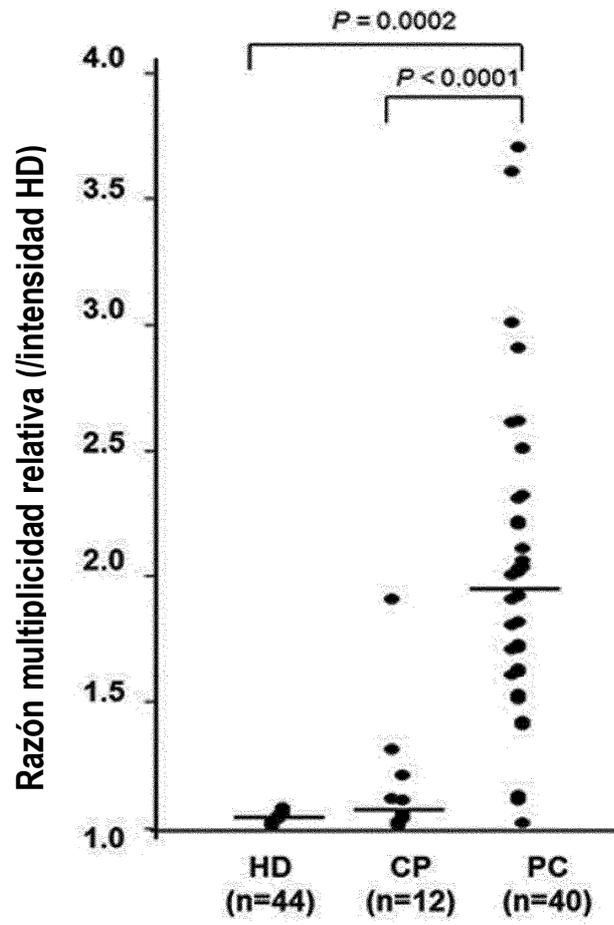
[Figura 4c]



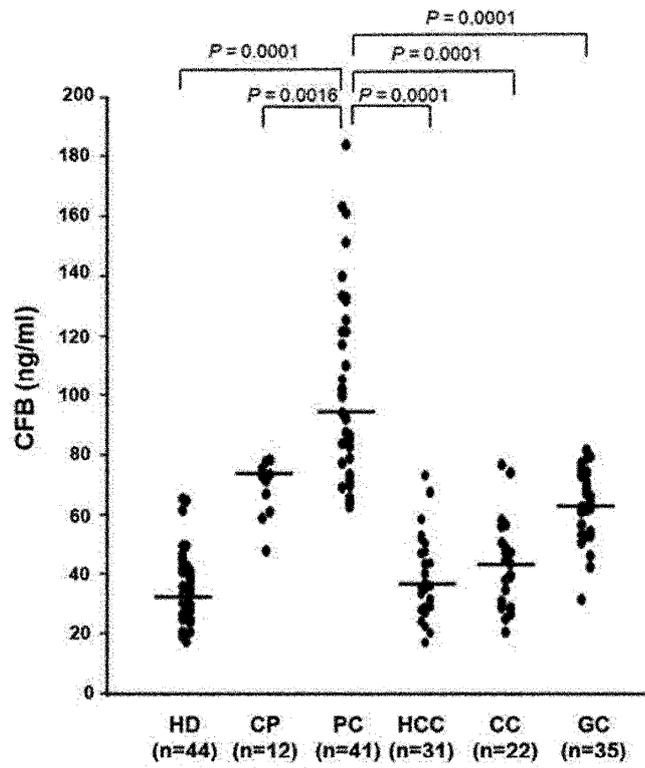
[Figura 5a]



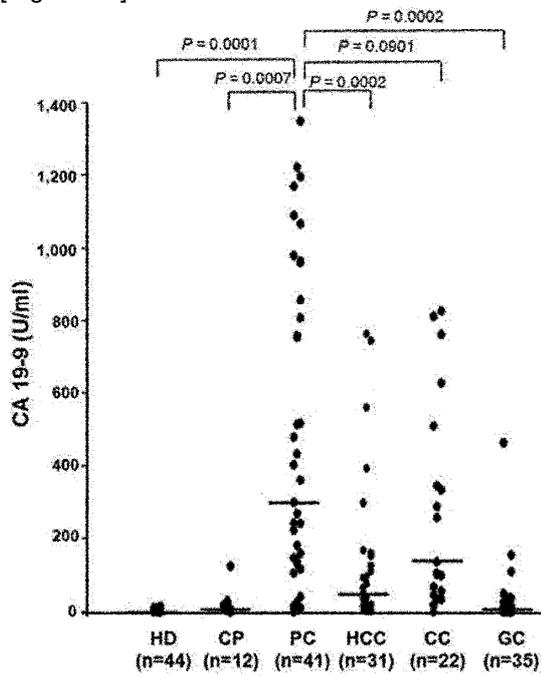
[Figura 5b]



[Figura 6a]



[Figura 6b]



[Figura 7]

