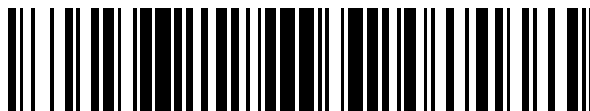


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 973**

21 Número de solicitud: 201930559

51 Int. Cl.:

G01N 33/52 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.06.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.12.2020

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (51.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada ES;
UNIVERSIDAD DE JAÉN (5.0%);
FUNDACIÓN MEDINA (26.0%) y
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (18.0%)**

72 Inventor/es:

**CABA PÉREZ, Octavio;
PRADOS SALAZAR, Jose Carlos;
MELGUIZO ALONSO, Consolación;
ORTIZ QUESADA, Raúl;
CABEZA MONTILLA, Laura;
PERAZZOLI, Gloria;
JIMÉNEZ LUNA, Cristina;
ROJAS RUIZ, Ignacio;
HERRERA MALDONADO, Luis Javier;
RAMA BALLESTEROS, Ana Rosa;
VICENTE PÉREZ, María Francisca;
PEREZ DEL PALACIO, José;
DÍAZ NAVARRO, Caridad;
MARTÍN BLÁZQUEZ, Ariadna;
MARTÍNEZ GALÁN, Joaquina;
MARTÍN RUIZ, José Luis y
DIEGUEZ CASTILLO, Carmelo**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **PANEL DE METABOLITOS COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PÁNCREAS**

57 Resumen:

La presente invención se encuentra dentro de los campos de la Medicina, Farmacología, Química, Bioquímica, Biotecnología, y se refiere a diferentes paneles de metabolitos presentes en suero capaces de diferenciar entre pacientes sanos de aquellos con cáncer de páncreas (CP). La invención tiene aplicación en el diagnóstico clínico de patología como es el CP.

ES 2 799 973 A1

DESCRIPCIÓN**PANEL DE METABOLITOS COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE PÁNCREAS****Campo de la invención**

5 La presente invención se encuentra dentro de los campos de la Medicina, Farmacología, Química, Bioquímica, Biotecnología, y se refiere a diferentes paneles de metabolitos presentes en suero capaces de diferenciar entre pacientes sanos de aquellos con cáncer de páncreas (CP). La invención tiene aplicación en el diagnóstico clínico de patología como es el CP.

10 Antecedentes de la invención

El diagnóstico precoz del CP representa en la actualidad una prioridad sanitaria ya que su tasa de supervivencia en el primer año tras el diagnóstico es de un 19%, llegando a tan sólo un 5% cuando se consideran los cinco primeros años (Zhang *et al.*, 2016). Su diagnóstico tardío se debe a varios hechos: 1) una sintomatología difusa y con pocos
15 signos específicos y visibles de una enfermedad y 2) la no existencia de marcadores fiables para su detección en las primeras fases de una enfermedad que hace que tan sólo el 8% de los casos de CP sean detectados en estadios precoces, fases en las que dado su tamaño, aún pueden ser resecables (15-20% de los casos) (Giovannetti *et al.*, 2012). Este diagnóstico tardío es un factor esencial para su pobre pronóstico, ya que la principal causa de muerte en esta patología es la infiltración a tejidos vecinos y/o la presencia de metástasis a distancia (Kamisawa *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2011).

En la actualidad, el tratamiento del CP incluye quimioterapia que, aun no siendo totalmente efectiva, permite una reducción de la masa tumoral lo suficientemente importante para realizar un abordaje quirúrgico, aumentando de forma significativa la supervivencia especialmente en los estadios localizados (Lee y Park, 2016). La resección
25 quirúrgica con márgenes negativos es el tratamiento ideal para estos pacientes aunque es infrecuente por su diagnóstico tardío (Erkan *et al.*, 2012). Por tanto, es esencial para la mejora del pronóstico del CP, no sólo la identificación de nuevos biomarcadores de enfermedad sino el desarrollo de sistemas que hagan fiable su detección y aplicable a la práctica.

30 Biomarcadores y cáncer de páncreas. En la actualidad no hay ningún biomarcador fiable para el diagnóstico del CP. No obstante, el advenimiento de las tecnologías genéticas, proteómica de alto rendimiento y metabolómica, está facilitando el descubrimiento de nuevos biomarcadores especialmente en cáncer (Le *et al.*, 2016). El desarrollo de un sistema diagnóstico para el CP requiere de: 1) una alta sensibilidad para identificar la totalidad o la mayoría de los pacientes; 2) basarse en una determinación con baja invasividad para el paciente y c) poseer el menor coste
35 posible para la sanidad pública (Rückert *et al.*, 2010).

Hoy por hoy, el único marcador aprobado por la FDA para su uso como elemento de aproximación diagnóstica a esta patología es CA19-9 (Winter *et al.*, 2013). Sin embargo, este marcador presenta graves limitaciones: 1) una baja sensibilidad (aproximadamente 80%) y 2) una falta de especificidad (73%, respectivamente) lo que le impide
40 diferenciar CP de otras patologías en las que también se observan niveles elevados (Goggins *et al.*, 2005). De hecho, CA19-9 se eleva en sólo en el 65% de las personas con CP resecable y puede no discernir entre pacientes con CP y con PC y/u otras lesiones malignas. Existen, pues, evidencias que justifican las dudas del uso de este marcador en CP que ha sido considerado por la comunidad científica como poco fiable (Duffy *et al.*, 2010). Es por ello que en los últimos años, numerosos estudios han centrado su objetivo en encontrar moléculas que puedan

comportase como biomarcadores de esta patología ya sea en los tejidos (MUC4, MUC1, CECAM1) o en la sangre periférica (MIC-1, NGAL, la telomerasa y los microARNs) (Liang *et al.*, 2009).

5 Los marcadores génicos clásicos de otros tumores como *KRAS* mutado y *p53* han sido ampliamente ensayados en CP y conocemos sus limitaciones, incluyendo una baja sensibilidad, alto número de falsos positivos y bajo rendimiento en el caso de la obstrucción del conducto pancreático (Teich y Mossner, 2004). Los estudios de genes alterados en CP registran una gran cantidad de moléculas sobreexpresadas tanto en lesiones tempranas como tardías incluyendo S100P, MMP7, MUC4, FSCN1, y MUC5AC (Harsha *et al.*, 2009). Utilizando como muestra la saliva de pacientes con CP y haciendo estudios de transcriptoma, se han identificado una combinación de cuatro biomarcadores de ARN mensajero (*KRAS*, *MBD3L2*, *ACRV1*, y *DPM1*) que parecen diferenciar entre pacientes CP y sujetos sanos con una sensibilidad y especificidad alta (90 y 95%). Sin embargo, será necesario un análisis a mayor escala de las secreciones salivales para su validación (Zhang *et al.*, 2010). Más recientemente, estudios basados en miARN han demostrado que mientras que miR-21 y miR-155 se sobreexpresan, miR-216 disminuye su expresión en tejidos de CP, jugo pancreático y heces en comparación con sus controles, lo que podría representar una asociación de biomarcadores para el diagnóstico de luna enfermedad (Yang *et al.*, 2014).

En este contexto, la búsqueda de la expresión diferencial de genes ha sido una herramienta para detectar biomarcadores en diferentes tipos de tumores incluyendo CP (Caba *et al.*, 2012). La alteración del perfil de expresión génica en células de sangre periférica ha sido vista como una oportunidad de detección precoz y de determinación de la evolución de luna enfermedad (Honda *et al.*, 2012). Los autores de la presente invención ya demostraron la existencia de un patrón específico de expresión génica en sangre periférica de pacientes con CP que los diferencia de las personas sanas (Patente WO2014/076342 A1) (Caba *et al.*, 2014; Irigoyen *et al.*, 2016). Otros autores también han encontrado diferencias significativas de expresión de genes entre ambos grupos aunque el bajo número de muestras usadas hace necesario un estudio más amplio para la validación (Yan *et al.*, 2011).

25 Por otra parte, la determinación de niveles de expresión de proteínas ya sea en tejido o en suero ha sido explorada con objeto de obtener biomarcadores de CP. Estudios preliminares con el anticuerpo monoclonal anti-MUC (PAM4) han demostrado que posee una mayor sensibilidad diagnóstica que CA19-9 (91%, 86% y 62% para el estadio 3/4, etapa 2, y luna enfermedad en estadio 1, respectivamente) aunque necesita una validación clínica más extensa (Gold *et al.*, 2010). Hoy sabemos que el estroma juega un papel crucial en el apoyo al crecimiento, la angiogénesis y la resistencia a las drogas del CD. Algunas proteínas como SPARC, implicada en las interacciones de la matriz celular (Hwang *et al.*, 2008), podrían comportarse como biomarcadores de mal pronóstico para estos pacientes. Recientemente se ha analizado la posibilidad de combinar marcadores estromales de CP con CA19-9 para aumentar su sensibilidad (Franklin *et al.* 2015).

35 Además, el desarrollo de CP implica un proceso inflamatorio agresivo (Amedei *et al.*, 2013) que puede, por una parte, influir en la efectividad del tratamiento con agentes citotóxicos y por otra, liberar señales de tipo citocinas y quimiocinas (Jiménez-Luna C *et al.*, 2016), que no sólo modulan la respuesta de las propias células inflamatorias sino de los procesos de crecimiento, angiogénesis y metástasis, procesos esenciales para el desarrollo del tumor y, por tanto, el pronóstico del paciente (Neese *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012).

También debemos destacar que en este tipo de estudios la muestra usada es el suero de los pacientes, un aspecto no poco importante desde el punto de vista de la aplicación clínica. Su obtención supone, en el caso del CP, una enorme ventaja dada la dificultad para acceder a este tipo de tumor (Bournet *et al.*, 2012). La posibilidad de detectar

biomarcadores ya sea en elementos formes de la sangre, como células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o en el suero de los pacientes, ha abierto la posibilidad al desarrollo de nuevos métodos diagnósticos de más fácil aplicación (Caba *et al.*, 2012).

5 Por último, es importante señalar que no todas las vías de investigación para la determinación de biomarcadores en CP han obtenido éxito, como se ha podido constatar con los resultados de la búsqueda de autoanticuerpos en suero de pacientes que demostraron una baja sensibilidad. El intento de usar múltiples autoanticuerpos en suero ha tenido un bajo rendimiento diagnóstico, aunque está pendiente de validación (Dumstrei *et al.*, 2016).

10 Metabolitos como biomarcadores séricos mediante LC/MS. Un nuevo paso en esta dirección ha sido el análisis masivo de metabolitos (metabolómica) para detectar nuevos marcadores de patología tumoral. Este análisis es un nuevo enfoque útil para la búsqueda de marcadores tumorales como demuestra el creciente número de estudios con estas tecnologías (Nishiumi *et al.*, 2014). El análisis metabólico global y no dirigido de tejidos y biofluidos (metabolic fingerprinting), tiene como objetivo cuantificar metabolitos y sus cambios, a fin de descubrir nuevos biomarcadores
15 potenciales y revelar información acerca de la condición metabólica de un organismo (Nicholson *et al.*, 2002). Existe un amplio consenso en relación a la importancia de la metabolómica (perfil metabólico humano) como herramienta rápida y no invasiva para el diagnóstico temprano de muchas enfermedades. La “huellas metabólicas” se obtiene con técnicas combinadas de cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) (Dunn *et al.*, 2011) que permiten obtener gran cantidad de información en forma de variables de masa molecular a partir de
20 un número relativamente pequeño de observaciones (Ranjbar *et al.*, 2011). Estos datos requieren de herramientas holísticas, que, en contraste con las técnicas estadísticas convencionales, permiten la consideración simultanea de muchas variables con el objetivo reducir, agrupar y visualizar los datos (Tautenhahn *et al.*, 2011).

Por otra parte, la metabolómica permite determinar los cambios de los marcadores según el estado metabólico de la
25 célula, con la ventaja de que estos cambios pueden ocurrir incluso antes de que se produzcan variaciones significativas en los niveles de proteínas (Medina *et al.*, 2014). Es por ello que la metabolómica está siendo aplicada al desarrollo de equipos en campos biomédicos tan diversos como la medición de la actividad antitrombótica de antiinflamatorios no esteroideos a través de la detección del metabolito de tromboxano A2 metabolitos (US 8168400 B2), o la aplicación de la detección de metabolitos que permiten identificar la presencia de drogas (US 6180414 B1).
30 Además, la detección de metabolitos también está siendo ya aplicada para un diagnóstico precoz en áreas de investigación tan importantes como la neurología, como demuestran las recientes patentes que determinan metabolitos oxidados de la dopamina en el plasma de pacientes con Parkinson (WO 2011152699 A2).

Metabolómica en cáncer. En el área de cáncer, la metabolómica cobra cada vez más importancia. Cambios en el
35 metabolismo celular, entre ellos los que ocurren en la transformación procesos tumorales, resultan en alteraciones de los niveles de diferentes metabolitos que ahora podemos detectar de forma altamente fiable. La identificación de estos patrones de cambios entre personas sanas y pacientes con cáncer, incluyendo el CP, proporciona una valiosa información que nos permite no sólo comprender mejor una enfermedad (Pirman *et al.*, 2013) sino poder detectarla de forma precoz. Así, recientemente se ha propuesto la determinación mediante espectrometría de masas (MALDI-
40 TOF/ MS) de tres metabolitos (m/z 1465, 1206 y 1020) para discriminar entre los pacientes con CP y aquellos en los que existe una asociación a la diabetes (Kim 2015). Este método está pendiente de validación clínica. En cáncer gástrico, la determinación en diferentes fluidos de un grupo de metabolitos ha sido recientemente patentada como método diagnóstico (Patente WO/2015/093800). Zhu *et al.* han realizado un análisis de espectrometría de masas y cromatografía líquida usando suero de pacientes de cáncer de colon que le ha permitido diferenciar, con tan sólo 13

metabolitos, entre pacientes con cáncer de colon y controles sanos, y con 14 metabolitos, entre pacientes con cáncer de colon y pacientes con pólipos, con una alta sensibilidad (entre el 96 y 89%) y especificidad (80 y 88%) (Zhu *et al.*, 2014; 2015).

5 **Breve descripción de la invención**

Los resultados aquí propuestos demuestran que la determinación de un grupo de metabolitos es decisiva para el diagnóstico del CP ya que presentan diferencias entre sujetos sanos y enfermos con una alta sensibilidad y especificidad.

10 1.- El diagnóstico precoz del CP representa en la actualidad una prioridad sanitaria debido a las bajas tasas de supervivencia que presenta tras el diagnóstico.

15 2.- El diagnóstico tardío del CP es el factor esencial para su pobre pronóstico, ya que la principal causa de muerte es la infiltración de tejidos vecinos y/o la presencia de metástasis a distancia.

20 3.- Debido a que el tratamiento ideal para estos pacientes es la resección quirúrgica con márgenes negativos es esencial, para la mejora del pronóstico del CP, la identificación de nuevos biomarcadores de esta enfermedad y el desarrollo de sistemas que hagan fiable su detección y aplicable a la práctica.

25 4.- CA19-9, el único marcador aprobado por la FDA para su uso como elemento de aproximación diagnóstica a esta patología, presenta graves limitaciones como son una baja sensibilidad y una falta de especificidad. Existiendo evidencias que justifican las dudas del uso de este marcador en cáncer de páncreas, que ha sido considerado por la comunidad científica como poco fiable.

30 5.- Cambios en el metabolismo celular, entre ellos los que ocurren en la transformación procesos tumorales, resultan en alteraciones de los niveles de diferentes metabolitos que por metabolómica podemos detectar de forma altamente fiable. La identificación de estos patrones de cambios entre personas sanas y pacientes con cáncer, incluyendo el CP, proporciona una valiosa información que nos permite poder detectar esta patología de forma precoz.

La presente invención describe la existencia de un panel de metabolitos en suero capaz de diferenciar entre sujetos sanos de aquellos con CP. Estos paneles pretenden aplicarse en clínica para el diagnóstico temprano de dicha patología.

35 **Breve descripción de las figuras**

Figura 1 Curva ROC para los biomarcadores combinados

40 **Descripción detallada de la invención**

Métodos diagnósticos de la invención

Antes de que se describan los métodos presentes, se entiende que esta invención no se limita a métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, métodos y condiciones pueden variar. También se entiende

que la terminología usada en el presente documento es para el propósito de describir realizaciones particulares únicamente, y no pretende ser limitativo, ya que el alcance de la presente invención solo se limitará en las reivindicaciones adjuntas.

5 Los autores de la presente invención han identificado una serie de marcadores metabólicos presentes en muestras de suero, plasma o sangre recogidas de pacientes diagnosticados de cáncer de páncreas y controles sanos (HC). Estos marcadores metabólicos seleccionados se diferencian significativamente entre controles sanos (HC) y pacientes diagnosticados de cáncer de páncreas. Estos marcadores metabólicos pueden por tanto utilizarse en un método diagnóstico no invasivo para la identificación y la clasificación de pacientes. En particular, la invención se refiere a un método de diagnóstico para distinguir entre pacientes con cáncer de páncreas frente a HC basado en los diferentes perfiles de biomarcadores de suero, plasma o sangre. Cada uno de estos perfiles de biomarcadores se identifica y se explica a continuación.

15 **Perfil de biomarcador de suero, plasma o sangre para identificar y clasificar pacientes con cáncer de páncreas frente a HC**

Los autores de la presente invención han determinado que usando los diferentes subconjuntos de metabolitos identificados a continuación, y aplicando preferiblemente PLS-DA, se obtuvieron los resultados de discriminación ilustrados en la tabla 2 para pacientes con cáncer de páncreas frente a HC.

20 Por tanto, un primer aspecto la invención, se refiere a un método *in vitro* para clasificar un sujeto que lo necesitan, entre pacientes que padecen o que tienen cáncer de páncreas, esto es que padecen preferiblemente la sintomatología de una enfermedad, frente a HC (controles sanos y/o sujetos que no tienen cáncer de páncreas M.) (de a continuación en el presente documento "primer método de clasificación de la invención"), que comprende la determinación *in vitro* de los niveles de al menos uno cualquiera de los siguientes marcadores: ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato, fenilalanina-fenilalanina, ácido adrenal, sulfato de deshidroepiandrosterona, sulfato de androsterona, triacilglicerol (22:2), lisofosfatidiletanolamina (18:1), lisofosfatidiletanolamina (18:2), ácido 13-hidroxiocadecadienoico, ácido 3-oxo-octadecanoico o 4-oxo-retinoico, o cualquier combinación de los mismos, en una muestra de suero, plasma o sangre tomada del sujeto. Preferiblemente, el método de clasificación *in vitro* se basa en la determinación *in vitro* de los niveles de todos de los siguientes marcadores: ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato, fenilalanina-fenilalanina, ácido adrenal, sulfato de deshidroepiandrosterona, sulfato de androsterona, triacilglicerol (22:2), lisofosfatidiletanolamina (18:1), lisofosfatidiletanolamina (18:2), ácido 13-hidroxiocadecadienoico, ácido 3-oxo-octadecanoico y 4-oxo-retinoico, en una muestra de suero, plasma o sangre tomada del sujeto.

35 Una realización preferida del primer aspecto la invención, se refiere a un método para clasificar un sujeto que lo necesita, entre pacientes de cáncer de páncreas frente a sujetos HC que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre del sujeto los niveles de al menos ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato, fenilalanina-fenilalanina, ácido adrenal, sulfato de deshidroepiandrosterona, sulfato de androsterona, triacilglicerol (22:2), lisofosfatidiletanolamina (18:1), lisofosfatidiletanolamina (18:2), ácido 13-hidroxiocadecadienoico, ácido 3-oxo-octadecanoico o 4-oxo-retinoico, o cualquier combinación de los mismos, y comparar los niveles de dichos marcadores con respecto a los niveles de los mismos marcadores en un HC o con respecto a los intervalos de valores de referencia para los biomarcadores para un HC, en el que el sujeto se clasifica como que padece cáncer de páncreas si diferentes niveles de los biomarcadores, en comparación con los intervalos de valores de referencia

para los biomarcadores para un HC, indican que el sujeto tiene cáncer de páncreas.

Se observa que el primer método de clasificación de la invención ayuda en el diagnóstico del sujeto y por tanto, en una realización preferida, el primer método de clasificación de la invención ayuda en el diagnóstico de un sujeto que lo necesita, en particular ayuda a determinar si un sujeto padece o no cáncer de páncreas (de a continuación en el presente documento “primer método de diagnóstico de la invención). El término “diagnóstico”, tal como se usa en el presente documento, se refiere tanto al procedimiento de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir el procedimiento diagnóstico, como a la opinión alcanzada por este procedimiento, es decir la opinión diagnóstica. Como tal, también se puede considerar como un intento de clasificación de un estado del individuo en categorías separadas y distintas (tal como predecir el “riesgo creciente” de padecer una enfermedad, significando “riesgo creciente” una oportunidad creciente de desarrollar o adquirir una enfermedad en comparación con un individuo normal) que permite realizar decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico. Se entiende que el método, en una realización preferida, es un método llevado a cabo *in vitro*, es decir no practicado en el cuerpo humano o animal. En particular, el diagnóstico para determinar pacientes con cáncer de páncreas, se refiere a la capacidad para identificar y clasificar pacientes con cáncer de páncreas. Este diagnóstico, como lo entiende un experto en la técnica, no reivindica ser correcto en el 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas se clasifiquen correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede establecerse por un experto en la técnica por medio del uso de diferentes herramientas estadísticas; ejemplos ilustrativos y no limitativos de dichas herramientas estadísticas incluyen determinar intervalos de confianza, determinar el valor de p, la prueba de “ji cuadrado” para discriminar funciones, etc. Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 90%, al menos del 97%, al menos del 98%, al menos del 99%. Los valores de p son, preferiblemente menos de 0,1, menos de 0,05, menos de 0,01, menos de 0,005 o menos de 0,0001. Las enseñanzas de la presente invención permiten preferiblemente diagnosticar correctamente en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un grupo determinante o población analizada.

El primer método diagnóstico de la invención comprende comparar el/los nivel(es) del/de los marcador(es) metabólico(s) identificado(s) anteriormente, con un valor de referencia. El término “valor de referencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un criterio predeterminado usado como una referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, una mediana de valores, un valor medio, o un valor en comparación con un control particular o valor de referencia. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual o puede basarse en un gran número de muestras, tales como de la población de sujetos del grupo de edad cronológica coincidente, o basado en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra que va a someterse a prueba.

En el contexto de la presente invención, los términos “sujeto”, “paciente” o “individuo” se usan en el presente documento indistintamente para referirse a todos los animales clasificados como mamíferos, e incluye pero no se limita a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

En el contexto de la presente invención, el término “marcador metabólico” o “metabolito” o “biomarcador”, se usan en el presente documento indistintamente para referirse a compuestos de moléculas pequeñas, tales como sustratos

para enzimas de rutas metabólicas, intermedios de tales rutas o los productos obtenidos por una ruta metabólica, la aparición o cantidad de la que es característica para una situación específica, por ejemplo cáncer de páncreas. Los marcadores metabólicos útiles para el primer método diagnóstico de la invención son aquellos definidos en la tabla 1 y la tabla 2. La tabla 2 contiene los nombres comunes de los metabolitos. Los marcadores metabólicos de la tabla 2 pretenden referirse a cualquier isómero de los mismos, incluyendo isómeros estructurales y geométricos. El término "isómero estructural", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualesquiera de dos o más compuestos químicos, que tienen la misma fórmula molecular pero fórmulas estructurales diferentes. El término "isómero geométrico" o "estereoisómero" tal como se usa en el presente documento se refiere a dos o más compuestos que contienen el mismo número y tipos de átomos, y enlaces (es decir, la conectividad entre átomos es la misma), pero que tienen diferentes disposiciones espaciales de los átomos, por ejemplo isómeros cis y trans de un doble enlace, enantiómeros y diastereómeros. El nombre común del aminoácido o proteína corresponde al nombre del aminoácido o proteína al cual pertenecen seguido de un número de acceso descrito en la base de datos de metaboloma humano HMDB (<http://www.hmdb.ca>).

En una realización preferida, el primer método diagnóstico de la invención comprende además confirmar el diagnóstico de cáncer de páncreas por medio de la exploración clínica del paciente.

En el contexto de la presente invención, el término "nivel" o "presencia", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un biomarcador detectable en una muestra. Las técnicas para analizar los niveles de biomarcadores individuales de las muestras probadas son bien conocidas por el experto en la técnica, y la invención no se limita a los medios por los que se evalúan los componentes. En una realización, los niveles de los componentes individuales del perfil metabolómico incluyen, sin limitación, espectroscopía de índice de refracción (RI), espectroscopía ultravioleta (UV), análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de dispersión de luz (LS), espectrometría de masas, espectrometría de masas de pirólisis, nefelometría, espectroscopía Raman dispersiva, cromatografía de gases combinada con espectroscopía de masas, cromatografía líquida combinada con espectroscopía de masas, cromatografía de fluidos supercríticos combinada con espectroscopía de masas, MALDI combinada con espectroscopía de masas, espectroscopía de ión-espray combinada con espectroscopía de masas, electroforesis capilar combinada con espectrometría de masas, RMN combinada con espectrometría de masas e IR combinada con espectrometría de masas. Preferiblemente, los niveles de los componentes individuales del perfil del biomarcador se evalúan utilizando un espectro de RMN de protón.

Por tanto, una realización adicional preferida del primer aspecto de la invención, el método se lleva a cabo mediante la determinación de una medida de cualquiera de los subconjuntos de biomarcadores identificados en el primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas, en una muestra biológica de suero, plasma o sangre, utilizando +/- 0,02 ppm, las regiones de picos del biomarcador identificadas en la tabla 1 de un espectro de RMN de protón a campo alto para cada biomarcador.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el método se lleva a cabo determinando una medición de cualquiera de los subconjuntos de biomarcadores identificados en el primer aspecto de la invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas, en una muestra biológica de suero, plasma o sangre, utilizando +/- 0,02 ppm, las regiones de picos del biomarcador identificadas en la tabla 5 de un espectro de RMN de protón a campo bajo para cada biomarcador.

Se aprecia también en el contexto de la presente invención que la evaluación de los niveles de los componentes individuales puede expresarse como valores absoluto o relativo y puede o no expresarse en relación a otro componente, un patrón, un patrón interno u otra molécula de compuesto conocido presente en la muestra. Si los niveles se evalúan en relación a un patrón o patrón interno, el patrón puede añadirse a la muestra de prueba previo a, durante o después de, el procesado de la muestra. En el contexto de la presente invención, para evaluar los niveles de los componentes individuales del sujeto, una muestra de suero, plasma o sangre se toma del sujeto. La muestra puede procesarse o no de forma previa a evaluar los niveles de los componentes del perfil metabólico. La muestra puede almacenarse o no, por ejemplo, congelarse, previo al procesado o análisis. Una vez que la muestra se ha procesado, el primer método de la invención implica la determinación de los niveles del biomarcador en la muestra. La expresión “determinar los niveles del biomarcador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a obtener la cantidad absoluta o relativa o concentración del biomarcador en la muestra. Hay muchas formas de recoger datos cuantitativos o relacionales en biomarcadores o metabolitos, y la metodología analítica no afecta a la utilidad de concentraciones de metabolito en la evaluación de un diagnóstico. Los métodos adecuados para determinar los niveles de un metabolito dado ya se indicaron anteriormente.

Método para determinar la eficacia de una terapia para el cáncer de páncreas

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para determinar la eficacia de una terapia para el cáncer de páncreas, que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre de un sujeto que padece cáncer de páncreas y que se ha tratado con dicha terapia, el/los nivel(es) de los perfiles de biomarcadores de suero, plasma o sangre del primer aspecto de la invención, en el que dicho(s) nivel(es) con respecto a un HC o con respecto a un valor de referencia son indicativos de que dicha terapia es eficaz o no contra el cáncer de páncreas.

El término “terapia para el cáncer de páncreas” tal como se usa en el presente documento, se refiere a la remediación intentada de un problema de salud, habitualmente seguida de un diagnóstico, o la prevención de la aparición de un problema de salud. Como tal, no es necesariamente una cura, es decir, una completa reversión de una enfermedad. Dicha terapia puede o no ser conocida de tener un efecto positivo sobre una enfermedad particular. Este término incluye tanto tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en los que el objeto es prevenir o parar (reducir) un cambio o trastorno fisiológico no deseado. Para el propósito de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin limitación, aliviar los síntomas, estabilizar el estado patológico (específicamente no empeorar), disminuir o parar la progresión de la enfermedad, mejorar o mitigar el estado patológico y remisión (tanto parcial como completa), tanto detectable como no detectable. También puede implicar la prolongación de la supervivencia, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia libre de síntomas, en comparación con la supervivencia prevista si el tratamiento no se recibe. Aquellos sujetos que necesitan tratamiento incluyen aquellos sujetos que ya padecen el estado o trastorno, así como aquellos con tendencia a padecer el estado o trastorno o aquellos en los que el estado o trastorno se debe prevenir.

En una realización particular, la determinación del nivel del uno o más marcadores metabólicos se lleva a cabo mediante espectrometría de masas o utilizando un espectro de RMN de protón.

Método para monitorizar el progreso del cáncer de páncreas

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un método para monitorizar el progreso de un sujeto que padece cáncer de páncreas, que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre de un sujeto que padece

esta enfermedad, sobre el transcurso o no de una terapia, el/los nivel(es) de los perfiles de biomarcadores de suero, plasma o sangre del primer aspecto de la invención, en el que dicho(s) nivel(es) con respecto a un valor de referencia determinado en una muestra de orina del mismo sujeto en un momento de tiempo anterior es indicativo de que el estado/enfermedad de cáncer de páncreas está progresando.

5 El término “monitorizar el progreso”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la determinación de la evolución de la enfermedad en un sujeto diagnosticado con cáncer de páncreas, es decir, si el cáncer de páncreas está empeorando o si está mejorando.

El término “progreso en el cáncer de páncreas”, tal como se usa en el presente documento, se entiende como un empeoramiento de la enfermedad, es decir, que la enfermedad está progresando a una etapa posterior con respecto a una etapa en un momento de tiempo anterior medido.

Kit diagnóstico

En un aspecto final de la invención, la determinación del nivel del uno o más marcadores metabólicos, para practicar cualquiera de los aspectos de la presente invención, puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado, tal como espectroscopía de índice de refracción (RI), espectroscopía ultravioleta (UV), análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de dispersión de luz (LS), espectrometría de masas, espectrometría de masas de pirólisis, nefelometría, espectroscopía Raman dispersiva, cromatografía de gases combinada con espectroscopía de masas, cromatografía líquida combinada con espectroscopía de masas, cromatografía de fluidos supercríticos combinada con espectroscopía de masas, MALDI combinada con espectroscopía de masas, espectroscopía de ión-espray combinada con espectroscopía de masas, electroforesis capilar combinada con espectrometría de masas, RMN combinada con espectrometría de masas e IR combinada con espectrometría de masas. Preferiblemente, los niveles de los componentes individuales del perfil del biomarcador se evalúan utilizando un espectro de RMN de protón.

En particular, utilizando un kit adecuado para la preparación del ensayo de espectrometría de masas o la preparación del ensayo de espectro de RMN de protón, tal kit debe proporcionar preferiblemente el más amplio intervalo de información metabólica disponible a partir de un ensayo único objetivo, que cubre un gran número de metabolitos clave de las principales rutas metabólicas. Este kit debe por tanto analizar cuantitativamente un gran número de metabolitos que ya se han identificado en el presente documento como parte de rutas bioquímicas clave, que proporciona datos fundamentales para relacionar cambios en el metaboloma para eventos biológicos. Preferiblemente, tal kit debe preferiblemente comprender al menos uno, preferiblemente todos, de los siguientes componentes; una placa de kit, una cubierta de estera de silicona para la placa, disolventes preferiblemente en ampollas de vidrio selladas, controles de calidad, patrones, una placa de captura de pocillo profundo, una tarjeta de memoria que tenga un software para relacionar cambios en el metaboloma para eventos biológicos y un manual de usuario.

Todavía otro aspecto de la presente invención incluye un kit para ayudar en el diagnóstico de cáncer de páncreas, que comprende: biomarcador que detecta reactivos para determinar un nivel de expresión diferencial de las combinaciones específicas de biomarcadores identificados en cualquiera de los aspectos de la presente invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit comprende además instrucciones para su uso en riesgo diagnóstico para cáncer de páncreas, en el que las instrucciones comprenden directrices etapa por etapa para comparar el nivel de expresión de las combinaciones específicas de biomarcadores identificados en cualquiera

de los aspectos de la presente invención, cuando se mide la expresión de una muestra de suero, plasma o sangre obtenida de un sujeto sospechoso de tener cáncer de páncreas con el nivel de expresión de una muestra obtenida de un sujeto normal, en el que el sujeto normal es un sujeto sano que no padece cáncer de páncreas, o con un valor de referencia. En otro aspecto, el kit comprende además herramientas, recipientes y reactivos necesarios para obtener muestras de orina de un sujeto.

Todavía otro aspecto de la presente invención, incluye un programa de ordenador adecuado para implementar cualquiera de los métodos de la presente invención. Además, un dispositivo que comprende el programa de ordenador mencionado anteriormente también forma parte de la presente invención así como su uso para el diagnóstico de cáncer de páncreas en un sujeto humano. En este sentido, la asignación de un paciente a un grupo específico de pacientes, tales como pacientes con cáncer de páncreas, por cualquiera de los métodos de la invención se puede hacer mediante un programa de ordenador, preferiblemente, tras introducir los datos en dicho programa. Por tanto, en otra realización preferida, la etapa de asignar un paciente a un grupo específico de pacientes, tales como pacientes con cáncer de páncreas, según cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria descriptiva, es una etapa implementada de ordenador en la que los datos obtenidos en las etapas previas del método se introducen en un programa de ordenador y el programa asigna al paciente a uno de los grupos de pacientes.

La presente invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos, los cuales simplemente ilustran la invención y no se limitan la misma.

Ejemplos

1.- Metodología

Pacientes y muestras

Para este estudio se reclutaron un total de 119 muestras: 59 de pacientes con CP y 60 de controles sanos. Los sueros de pacientes con CP se obtuvieron en el Hospital Universitario Virgen de las Nieves y los controles sanos fueron obtenidos a través del Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía.

La obtención de las muestras de sangre de todos los pacientes se realizó antes del inicio de cualquier terapia específica. El diagnóstico de CP se basó en la evaluación clínica y estudios de imagen, los cuales fueron posteriormente confirmados histológicamente por cirugía o biopsia. Los controles sanos no mostraron evidencia de enfermedad real ni historia oncológica. Todas las muestras de suero tras recogerse se almacenaron a -80°C utilizando técnicas y protocolos estandarizados.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y todas las investigaciones clínicas se han realizado de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los pacientes y controles antes de su inscripción en el estudio.

Obtención de metabolitos

Todas las muestras de suero se mantuvieron a 4°C durante todo el proceso analítico. Las proteínas se retiraron de muestras de suero usando acetonitrilo (AcN) ([1: 3] [suero: AcN]) y se agitaron durante 60 segundos. Posteriormente se centrifugaron a 13.300 rpm durante 15 minutos.

5 Condiciones de LC-HRMS

Los sobrenadantes se evaporaron entonces y los restos secos se reconstituyeron en 50% (agua: AcN). Estas disoluciones se transfirieron a los viales analíticos, se almacenaron en el inyector automático a 4°C y se analizaron por LC-HRMS. A continuación, la separación cromatográfica se realizó mediante el sistema Agilent Series 1290 LC
10 utilizando una columna Waters XBridge BEH Amida (2,1 mm x 150 mm) a 25°C en ESI (+) y a 45°C en ESI (-). La detección de masa se logró utilizando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuádruple AB TOEO SCIEX Triple 600 (Q-TOF-MS) en ESI (+) y ESI (-). El volumen de la muestra inyectada fue de 3 µl. La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0,1% [agua: AcN] [90: 10] (eluyente A) y ácido fórmico al 0,1% [AcN: agua] [90: 10] (eluyente B). La elución en gradiente se realizó como sigue: 0-0,1 min 99% eluyente B; 0,1-7 min 30% de eluyente B; 7-7,10 min,
15 eluyente B y 7,10-10 min 99% eluyente B. El caudal de elución fue de 0,4 ml/min.

El TOF 5600 fue operado utilizando un método de adquisición dependiente de la información para recopilar la información completa de HRMS y MS/MS de exploración simultáneamente. La calibración exacta de la masa se realiza automáticamente cada diez inyecciones. Debe observarse que la secuencia en las muestras de las muestras
20 se inyecta aleatoriamente para evitar cualquier posible agregación artificial de la muestra de debida a la deriva analítica.

Creación del conjunto de datos

25 Antes de ir a la creación del conjunto de datos, se evaluó la reproducibilidad tanto de la masa/carga (m/z) como del tiempo de retención (RT), ya que desempeña un papel importante en el procesamiento exitoso de los datos metabolómicos, especialmente en la etapa de alineación de picos. Aunque la minimización de la fluctuación de los valores m/z se aseguró mediante la calibración regular del espectrómetro de masas, se debe examinar la estabilidad en lotes de RT y m/z. Para este propósito, la variabilidad de RT y m/z de tres picos eluyendo a RT de 1,26, 4,75 y
30 8,59 min (con m/z 830,5657, 200,0392 y 537,3933 respectivamente) para HILIC ESI (+), RT de 1,37, 3,37 y 5,35 min (con m/z 178,8807, 796,4157 y 434,87026 respectivamente) para HILIC ESI (-). Además de la obtención de espectros de masas de exploración completa, se realizó la adquisición automática simultánea de los espectros de masas de disociación inducida por colisión (CID) para iones que exceden el umbral de intensidad, permitiendo obtener información adicional sobre los marcadores respectivos. Se utilizó el software MarkerView (versión 1,2.1)
35 para procesar los datos brutos de LC-HRMS. Este es un paquete de software de procesamiento adaptativo diseñado para datos de LC-HRMS que realiza la detección de picos, alineación y filtrado de datos generando una tabla de características donde se definen la intensidad de iones m/z, RT medida y la intensidad de iones integrada. La minería de datos se realizó mediante un algoritmo automatizado en el intervalo RT de 0,75-9,5 min en HILIC. A continuación, se utilizaron tolerancias de RT y m/z de 0,1 min y 15 ppm para la alineación de los respectivos picos.
40 El ruido de fondo (50 cps) fue eliminado por la herramienta del software MarkerView. Para identificar las verdaderas características moleculares, el algoritmo utiliza la precisión de la medición de masa para agrupar iones relacionados con el estado de carga y la distribución isotópica.

Identificación de los compuestos marcadores

Para evaluar los datos de LC-HRMS obtenidos en LC-QTOF-MS y para estimar las fórmulas elementales de los marcadores preseleccionados se usó el software PeakView (versión 1,0). La estimación de la fórmula elemental se logró a partir de espectros de masas de HRMS simple y MS/MS, que fue seguido por una búsqueda en base de datos espectrales para la identificación estructural. La estimación automática de la fórmula elemental se llevó a cabo con el uso de: (i) una sola masa exacta de HRMS del ion de origen, (ii) un perfil isotópico del ion de origen, y (iii) fragmentos de fragmentos MS/MS precisos. Para los cálculos se consideraron los siguientes átomos: C (n>50), H (n>100), N (n>10), O (n>20), P (n>15) y S (n>5). El software de búsqueda de fórmulas (AB SCIEX,) utilizado en este estudio permitió clasificar las fórmulas propuestas según "MS rank" y "MS/MS rank", reflejando las diferencias entre los valores m/z calculados y medidos para los iones de origen como los fragmentos, y la coincidencia del patrón isotópico experimental y teórico en términos de espaciado isotópico e intensidades relativas. En el siguiente paso, se realizó una búsqueda por etapas de la fórmula molecular de los candidatos utilizando varias bases de datos en línea (MassBank, Metlin, Base de Datos de Metaboloma Humano, Mapas Lípidos, PubChem, ChemSpider) y MS/MS. De todos los compuestos obtenidos, sólo se examinaron los candidatos, cuya presencia era probable en seres humanos, comparando los espectros de masa de fragmentación experimental con los suministrados ya sea en bases de datos (MassBank, Metabolome Database, Metlin, NIST 2012 MS / MS library) y/ o en la literatura científica.

Análisis metabolómico por LC-HRMS

A pesar de los numerosos avances en la instrumentación, la complejidad de las muestras biológicas sigue siendo un reto importante en los experimentos de metabolómica, lo que refleja tanto el gran número de metabolitos como el amplio rango de sus niveles de expresión. Para la metabolómica no dirigida de muestras biológicas, a menudo se lleva a cabo la desproteinización con un disolvente orgánico. Se ha demostrado que los métodos de extracción basados en AcN proporcionan la información más rica para las especies lipídicas de bajo peso molecular y también son eficaces para metabolitos tales como el ciclo TCA, la glucólisis, el metabolismo de los aminoácidos, el metabolismo de los ácidos grasos, el metabolismo de la glutamina. Estas fracciones se analizan habitualmente por separado usando LC-HRMS.

Bajo nuestras condiciones experimentales, se podrían hacer varias observaciones a partir de los cromatogramas de corriente de iones totales (TIC) de una muestra QC. Los cromatogramas HILIC TIC mostraron un perfil de pico diferencial claro en función del modo de ionización. Específicamente, los iones más intensos en este modo de separación se observaron en ESI (+) entre 1 y 2 min de RT, correspondientes a compuestos mal retenidos (Figura 1A). En la cromatografía HILIC de muestras de suero, las clases de compuestos eluidas a tal tiempo de retención se han relacionado con clases de compuestos fosfatidilglicerol. En contraste, observamos señales más intensas en el rango de tiempo de retención de 2,1 a 4,7 min para el modo HILIC ESI (-) (la figura 1B). Se ha informado de que en condiciones de ácido débil se favorece la ionización negativa de moléculas tales como ácidos orgánicos con grupos funcionales -COOH y grupos fosfato, y por lo tanto se esperan señales de masa intensas para tales clases de compuestos.

Basándose en los datos de los picos cromatográficos seleccionados, se encontró que la ventana típica de RT y la tolerancia de masa eran inferiores a 3 seg y 10 ppm respectivamente que pueden considerarse como valores aceptables. Como resultado de los procedimientos de selección y alineación de pico, se obtuvo una matriz de datos que contiene la intensidad de las señales de masa para cada modo cromatográfico y de ionización.

2.- Resultados

Los metabolitos más discriminantes para la identificación entre ambos grupos fue el panel compuesto por:

5 Ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato, fenilalanina-fenilalanina, ácido adrénico, dehidroepiandrosterona sulfato, androsterona sulfato, triacilglicerol (22:2), lisofosfatidiletanolamina (18:1), lisofosfatidiletanolamina (18:2), ácido 13-hidroxiocadecadienoico, ácido 3-oxo-octadecanoico y ácido 4-oxo-retinoico.

Los valores m/z de los mismos eran los identificados en la tabla 1.

Tabla 1. Valores m/z de los metabolitos más discriminantes.

10

Identificación	m/z
Ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato	263,6289
Fenilalanina-fenilalanina	311,1396
Ácido adrénico	331,2658
Deshidroepiandrosterona sulfato	367,1583
Androsterona sulfato	369,1747
Triacilglicerol (22:2)	446,3760
Lisofosfatidiletanolamina(18:1)	478,2946
Lisofosfatidiletanolamina (18:2)	476,2792
Ácido 13-hidroxiocadecadienoico	591,4610
Ácido 3-oxo-octadecanoico	595,4906
Ácido 4-oxo-retinoico	627,3741

Los valores de cambios de expresión (FD), área debajo de la curva (AUC), p.valor y FDR alcanzados por los diferentes marcadores fueron los ilustrados en la tabla 2.

15 **Tabla 2. Valores de cambios de expresión (FD), área debajo de la curva (AUC), p.valor y FDR alcanzados por los metabolitos más discriminantes.**

Identificación	FC (HC/PDAC)	AUC	p.valor	FDR
Ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato	0,0799	0,84006	3,52E-10	4,71E-09
Fenilalanina-fenilalanina	2,5797	0,85351	1,03E-17	9,18E-16
Ácido adrénico	0,4521	0,82573	5,54E-10	6,74E-09
Deshidroepiandrosterona sulfato	2,4381	0,8462	1,20E-12	2,30E-11
Androsterona sulfato	3,2221	0,87544	1,54E-15	6,86E-14
Triacilglicerol (22:2)	2,3074	0,90058	1,01E-14	3,38E-13
Lisofosfatidiletanolamina(18:1)	1,593019293	0,81287	3,09E-10	4,60E-09
Lisofosfatidiletanolamina (18:2)	1,681960241	0,87047	2,30E-14	6,18E-13
Ácido 13-hidroxiocadecadienoico	1,929249561	0,80439	1,75E-07	1,23E-06
Ácido 3-oxo-octadecanoico	2,004793851	0,80906	1,59E-09	1,77E-08
Ácido 4-oxo-retinoico	0,096417427	0,90936	2,93E-14	6,55E-13

Cuando el panel propuesto fue utilizado de manera conjunta, el valor bajo la curva (AUC) alcanzado para poder discriminar entre ambos grupos de sujetos alcanzó el 97,5%.

- 5
- Bibliografía**
- Amedei A, Prisco D, D' Elios MM. The use of cytokines and chemokines in the cancer immunotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2013;8:126Y142.
- 10
- Bathe O, Shaykhutdinov R, Kopciuk K, Weljie AM, McKay A, Sutherland FR, Dixon E, Dunse N, Sotiropoulos D, Vogel HJ . Feasibility of Identifying Pancreatic Cancer Based on Serum Metabolomics. *Cancer Epidemiol.,Biomark.Preven.* 2011;20,140-147.
- 15
- Bournet B, Pointreau A, Souque A, Oumouhou N, Muscari F, Lepage B, Senesse P, Barthet M, Lesavre N, Hammel P, Levy P, Ruzsniwski P, Cordelier P, Buscail L. Gene expression signature of advanced pancreatic ductal adenocarcinoma using low densityarray on endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration samples. *Pancreatology* 2012;12, 27-34.
- 20
- Caba O, Ortiz R, Alvarez P, Prados J, Melguizo C, Hita F, Rojas I, Perez-Florido J, Prieto A, Aranega A. Patented Biomarkers of Peripheral Blood for the Early Detection of Cancer. *Recent Patents on Biomarkers* 2012;2,17-28.
- 25
- Caba O, Ortiz R, Alvarez P, Prados J, Melguizo C, Hita F, Rojas I, Perez-Florido J, Prieto A, Aranega A. Transcriptional Profiling of Peripheral Blood in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Digestive diseases and sciences* 2014;59,2714-20.
- Duffy MJ, Sturgeon C, Lamerz R, Haglund C, Holubec VL, Klapdor R, Nicolini A, Topolcan O, Heinemann V. Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report. *Ann Oncol.* 2010;21:441Y447.
- 30
- Dunn, W. B., Broadhurst, D., Begley, P., Zelena, E.,Francis-McIntyre, S., Anderson, N., Brown,M., Knowles, J. D., Halsall, A., Haselden, J. N., Nicholls, A.W., Wilson, I. D., Kell, D. B., Goodacre, R., Consortium, H. S. M. H., *Nat. Protoc.* 2011, 6: 1060–1083.
- 35
- Dumstrei K, Chen H, Brenner H. A systematic review of serum autoantibodies as biomarkers for pancreatic cancer detection. *Oncotarget.* 2016;7:11151-64.
- Erkan M, Hausmann S, Michalski CW, Fingerle AA, Dobritz M, Kleeff J, Friess H. The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2012;9,454-67.
- 40
- Franklin O., Öhlund D, Lundin C, Öman M, Naredi P, Wang W, Sund M. Combining conventional and stroma-derived tumour markers in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biomarkers.* 2015; 15, 1–10.
- Giovannetti E, van der Velde A, Funel N, Vasile E, Perrone V, Leon LG, De Lio N, Avan A, Caponi S, Pollina LE,

- Gallá V, Sudo H, Falcone A, Campani D, Boggi U, Peters GJ. High-Throughput MicroRNA (miRNAs) Arrays Unravel the Prognostic Role of MiR-211 in Pancreatic Cancer. *PLoS One* 2012;7:e49145.
- Goggins M. Molecular markers of early pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2005;23(20):4524-31.
- 5 Harsha HC, Kandasamy K, Ranganathan P, Rani S, Ramabadran S, Gollapudi S, *et al.* A Compendium of Potential Biomarkers of Pancreatic Cancer. *PLoS Med.* 2009;6:e1000046.
- Gold DV., Goggins M, Modrak DE, Newsome G, Liu M, Shi C, Hruban RH, Goldenberg DM. Detection of early-stage pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2010; 19, 2786–2794.
- 10 - Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;40, 7-15.
- 15 - Hwang R.F., Moore T, Arumugam T, Ramachandran V, Amos KD, Rivera A, Ji B, Evans DB, Logsdon CD. Cancer-associated stromal fibroblasts promote pancreatic tumour progression. *Cancer Research*, 2008; 68, 918–926.
- Irigoyen A, Caba O, Benavides M, Jiménez-Luna C, Gallego J, Ortuño FM, Guillen-Ponce C, Rojas I, Aranda E, Torres C, Prados J. Integrative multi-platform meta-analysis of gene expression profiles in pancreatic ductal adenocarcinoma patients for identifying novel diagnostic biomarkers. *BMC Genomics* (Submitted).
- 20 - Jiménez-Luna C, J. Prados, Caba O, Ortiz R., Melguizo C, Torres C, Caba O. Current status of immunotherapy treatments for pancreatic cáncer. *J. Clin. Gastroenterol* (Accepted for publication)
- Kamisawa T, Wood LD, Itoi T, Takaori K. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2016. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00141-0.
- 25 - Kim K.. Detection of PDAC biomarkers using mass spectrometry. *Cancer Informatics*, 2015; 13, 45–53.
- Le N, Sund M, Vinci A, GEMS collaborating group of Pancreas 2000. Prognostic and predictive markers in pancreatic adenocarcinoma. *Dig Liver Dis.* 2016;48,223-30.
- 30 - Lee Has and Park SW. Systemic Chemotherapy in Advanced Pancreatic Cancer. *Gut Liver.* 2016;10, 340-7.
- Liang JJ, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Tan D.. Diagnostic and prognostic biomarkers in pancreatic carcinoma. *Source. Int J Clin Exp Pathol.* 2009;2,1-10.
- 35 - Liu X, Wang J, Sun G. Identification of key genes and pathways in renal cell carcinoma through expression profiling data. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40,288-97.
- Luo G, Long J, Zhang B, Liu C, Xu J, Ni Q, Yu X. Stroma and pancreatic ductal adenocarcinoma: an interaction loop. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826,170Y178.
- 40 - Neesse A, Algül H, Tuveson DA, Gress TM. Stromal biology and therapy in pancreatic cancer: a changing paradigm.. *Gut.* 2015, 64,1476-84.

- Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C., Holmes, E., Nat. Rev. Drug Discov. 2002, 1:153–161.
- Nishiumi S, Suzuki M, Kobayashi T, Matsubara A, Azuma T, Yoshida M. Metabolomics for Biomarker Discovery in Gastroenterological Cancer. *Metabolites*.201, 4, 547-571.
- 5
- Ranjbar, M. R. N., Yue, W., Ransom, H. W., Bioinformatics and Biomedicine Workshops (BIBMW), 2011 IEEE International Conference on 2011, pp. 1034–1036.
- Ríos S, Díaz C, Márquez C, Caba O, Jiménez-Luna C, Melguizo C, Prados J, Genilloud O, de Vicente F, Pérez del Palacio J. Untargeted LC-MS/MS-based metabolomics for searching new biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma: a pilot study. *J B S* (Accepted for publication).
- 10
- Rückert F, Pilarsky C, Grützmann R. Serum Tumor Markers in Pancreatic Cancer-Recent Discoveries. *Cancers* 2010;2,1107-1124.
- 15
- Sarkar FH, Banerjee S, Li Y. Pancreatic cancer: pathogenesis, prevention and treatment. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;224:326Y336.
- Sharma NK, Regine WF. Radiation Therapy in Resectable/Resected Pancreatic Adenocarcinomas: Clearing Up the Fog. *Oncology* 2011;25, 715-21.
- 20
- Tautenhahn, R., Patti, G. J., Kalisiak, E., Miyamoto, T., Schmidt, M., Lo, F. Y., McBee, J., Baliga, N. S., Siuzdak, G., *Anal. Chem.* 2011, 83: 696–700.
- Teich N and Mossner J. Molecular analysis of pancreatic a helpful tool to differentiate benign and malignant pancreatic tumours? *Digestive Diseases*. 2004;22, 235–239.
- 25
- Torres C, Linares A, Alejandre MJ, Palomino-Morales RJ, Caba O, Prados J, Aránega A, Delgado JR, Irigoyen A, Martínez-Galán J, Ortuño FM, Rojas I, Perales S. Serum cytokine profile in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. 2005, 43, 1042-9.
- 30
- Torres C, Linares A, Alejandre MJ, Palomino-Morales RJ, Caba O, Prados J, Aránega A, Delgado JR, Irigoyen A, Martínez-Galán J, Ortuño FM, Rojas I, Perales S. Prognosis Relevance of Serum Cytokines in Pancreatic Cancer. *Biomed Res Int*. 2015;2015,518284.
- 35
- Yan H, Lu D, Xu L, Xie Q, Dong X, Wu Y. Increased expression level of Olfactomedin4 in peripheral blood mononuclear cells of pancreatic adenocarcinoma patients. *Hepatogastroenterology* 2011;58,1354-9.
- Yang J.Y, Sun YW, Liu DJ, Zhang JF, Li J, Hua R. MicroRNAs in stool samples as potential screening biomarkers for pancreatic ductal adenocarcinoma cancer *American Journal of Cancer Research*.2014; 4, 663–673.
- 40
- Winter J, M Yeo CJ, Brody JR. Diagnostic, prognostic, and predictive markers in pancreatic cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 107 (2013), 15–22.

- Zhang Q, Zeng L, Chen Y, Lian G, Qian C, Chen S, Li J, Huang K. Pancreatic Cancer Epidemiology, Detection, and Management. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;8962321.
- Zhang L., Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, Chia D, Wong DT. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology*, 2010; 138, 949–957.
- Zhu J, Djukovic D, Deng L, Gu H, Himmati F, Chiorean EG, Raftery D. Colorectal cancer detection using targeted serum metabolic profiling. *J Proteome Res.* 2014; 13:4120-30.
- 10 - Zhu J, Djukovic D, Deng L, Gu H, Himmati F, Abu Zaid M, Chiorean EG, Raftery D. Targeted serum metabolite profiling and sequential metabolite ratio analysis for colorectal cancer progression monitoring. *Anal Bioanal Chem.* 2015b; 407, 7857-63.
- Zhai LL, Cai CY, Wu Y, Tang ZG. Correlation and prognostic significance of MMP-2 and TFPI-2 differential expression in pancreatic carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8,682-91.
- 15

REIVINDICACIONES

- 5
1. Método *in vitro* para clasificar un sujeto que lo necesita, entre pacientes que padecen cáncer de páncreas (PC) frente a HC (sujetos que no padecen cáncer de páncreas), que comprende la determinación *in vitro* de los niveles de, al menos, ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato, fenilalanina-fenilalanina, ácido adrenal, sulfato de deshidroepiandrosterona, sulfato de androsterona, triacilglicerol (22:2), lisofosfatidiletanolamina (18:1), lisofosfatidiletanolamina (18:2), ácido 13-hidroxiocadecadienoico, ácido 3-oxo-octadecanoico o 4-oxo-retinoico, o cualquier combinación de los mismos, en una muestra de suero, plasma o sangre tomada del sujeto.
- 10
2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, en el que el método de clasificación *in vitro* comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre del sujeto los niveles de, al menos, ácido glicoquenodesoxicólico 7-sulfato, fenilalanina-fenilalanina, ácido adrenal, sulfato de deshidroepiandrosterona, sulfato de androsterona, triacilglicerol (22:2), lisofosfatidiletanolamina (18:1),
- 15
- lisofosfatidiletanolamina (18:2), ácido 13-hidroxiocadecadienoico, ácido 3-oxo-octadecanoico o 4-oxo-retinoico, o cualquier combinación de los mismos, y comparar los niveles de dichos marcadores con respecto a los niveles de los mismos marcadores en un HC o con respecto a los intervalos de valores de referencia para los biomarcadores de un HC, en el que el sujeto se clasifica como que padece de PC si diferentes niveles de los biomarcadores en comparación con los intervalos de valores de referencia para los biomarcadores para un HC indican que el sujeto tiene PC.
- 20
3. Método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para ayudar en el diagnóstico de si un sujeto padece o no PC, y opcionalmente confirmar el diagnóstico de PC por medio de una exploración clínica del paciente.
- 25
4. Método *in vitro* de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la determinación *in vitro* de los niveles se lleva a cabo mediante el uso de cualquiera de las técnicas seleccionadas de la lista que consiste en: espectroscopía de índice de refracción (RI), espectroscopía ultravioleta (UV), análisis de fluorescencia, análisis radioquímico, espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), análisis de dispersión de luz (LS), espectrometría de masas, espectrometría de masas de pirólisis, nefelometría, espectroscopía Raman dispersiva, cromatografía de gases combinada con espectroscopía de masas, cromatografía líquida combinada con espectroscopía de masas, cromatografía de fluidos supercríticos combinada con espectroscopía de masas, MALDI combinada con espectroscopía de masas, espectroscopía de ión-espray combinada con espectroscopía de masas, electroforesis capilar combinada con espectrometría de masas, RMN combinada con espectrometría de masas e IR combinada con espectrometría de masas.
- 30
- 35
5. Método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que la determinación *in vitro* de los niveles se lleva a cabo utilizando un espectro de RMN de protón.
- 40
6. Método para determinar la eficacia de una terapia para PC, que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre de un sujeto que padece cualquiera de estas enfermedades y que ha sido tratado con dicha terapia, el/los nivel(s) de biomarcadores identificados en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho(s) nivel(s) con respecto a un HC o con respecto a un valor de referencia es indicativo de

que dicha terapia es eficaz o no contra el PC.

- 5 7. Método para monitorizar el progreso de un sujeto que padece PC, que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre de un sujeto que padece esta enfermedad, sobre el transcurso de una terapia o no, el/los nivel(s) de biomarcadores identificados en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho(s) nivel(s) con respecto a un valor de referencia determinado en una muestra de suero, plasma o sangre del mismo sujeto en un momento de tiempo anterior es indicativo de que el estado/la enfermedad de PC está progresando.
- 10 8. Programa de ordenador para asignar un paciente a un grupo específico de pacientes, tales como pacientes con PC, según cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 1 a 7, tras introducir los niveles de biomarcadores identificados en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en dicho programa.
- 15 9. Dispositivo que comprende el programa de ordenador según la reivindicación 8, y el uso de dicho dispositivo para el diagnóstico de PC en un sujeto humano.

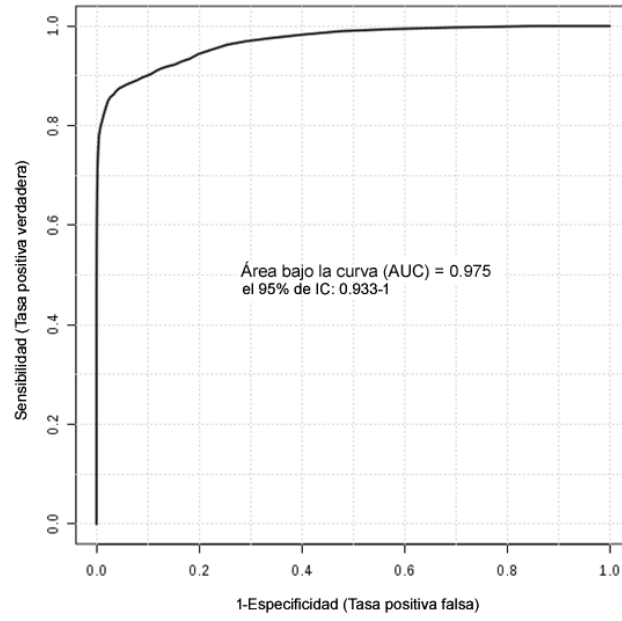


Fig. 1



- ②① N.º solicitud: 201930559
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.06.2019
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/52** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	DI GANGI I. M. et al. Analytical metabolomics-based approaches to pancreatic cancer. Trends in Analytical Chemistry, 2014, Vol. 55, Páginas 94-116, <DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.006 >, páginas 6 - 16;	1-9
X	RÍOS PECES S. et al. Untargeted LC-HRMS-Based Metabolomics for Searching New Biomarkers of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: A Pilot Study. SLAS Discovery, 2017, Vol. 22, N° 4, Páginas 348-359, <DOI: https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1087057116671490 >, todo el documento	1-9
X	WO 2011151252 A2 (METANOMICS HEALTH GMBH [DE]; UNIKLINIKUM SCHLESWIG HOLSTEIN [DE]; UNIV ERNST MORITZ ARNDT [DE] 08/12/2011, todo el documento	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
20.04.2020

Examinador
M. Cumbreño Galindo

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, EMBASE, BIOSIS