



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0415562-9 B1



(22) Data do Depósito: 15/09/2004

(45) Data de Concessão: 04/02/2020

(54) Título: MÉTODO IN VITRO PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE CARCINOMA DE OVÁRIO EM UM PACIENTE, E, KIT DE IMUNOENSAIO

(51) Int.Cl.: G01N 33/574.

(30) Prioridade Unionista: 21/10/2003 JP 2003-360638.

(73) Titular(es): SUNTORY HOLDINGS LIMITED.

(72) Inventor(es): SHIGEHICO MIZUTANI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2004013883 de 15/09/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/038462 de 28/04/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/04/2006

(57) Resumo: "REAGENTE PARA AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA E/OU PROGNÓSTICA DE CARCINOMA, MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE P-LAP QUE É UM FATOR PROGNÓSTICO EM CARCINOMA, E PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE CARCINOMA, E, KIT DE IMUNOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE P-LAP PRESENTE EM TECIDOS DE CARCINOMA". A presente invenção proporciona um reagente para avaliação prognóstica de pacientes com carcinoma, compreendendo um anticorpo anti-P-LAP como um ingrediente ativo. Também, a presente invenção proporciona um método para a determinação de P-LAP que é um fator prognóstico em pacientes com carcinoma compreendendo (a) uma etapa de contatar tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma por operação cirúrgica com um anticorpo anti-P-LAP e (b) uma etapa de medir a intensidade da reação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP presente nos tecidos de carcinoma e o anticorpo anti-P-LAP.

“MÉTODO IN VITRO PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE CARCINOMA DE OVÁRIO EM UM PACIENTE, E, KIT DE IMUNOENSAIO”

Campo técnico

A presente invenção refere-se a um reagente para avaliação diagnóstica e/ou prognóstica de carcinoma, compreendendo a determinação de leucina-amino-peptidase placentar (P-LAP) que é um fator diagnóstico e/ou prognóstico em carcinoma, a um método para a determinação de P-LAP em tecidos de carcinoma, e a um método para avaliação prognóstica de carcinoma.

Técnica anterior

O número de pacientes com carcinoma tem sido crescente nestes dias. Por exemplo, adenocarcinoma endometrióide endometrial, incluindo carcinoma endometrial e adenocarcinoma endometrióide, é uma malignidade ginecológica comum nos Estados Unidos. Recentemente, a incidência desta doença está aumentando no Japão. Também, é sabido que um número significativo de pacientes com adenocarcinoma endometrióide endometrial de estágio inicial desenvolvem tanto recorrência localizada quanto metástase distante (literatura de não-patente 1).

Por enquanto, para pacientes com carcinoma que têm sofrido operação cirúrgica, avaliação prognóstica acurada em estágio inicial é extremamente importante para tratamento pós-operativo apropriado. Por exemplo, uma quimioterapia possuindo um risco de efeito colateral deve ser evitada para pacientes com prognóstico bom que não necessitam de quimioterapia. Por outro lado, tratamento apropriado incluindo quimioterapia deve ser proporcionado aos pacientes que estão sob risco alto de recorrência

de carcinoma ou de reoperação com o objetivo de prevenir a recorrência de carcinoma ou de evitar a reoperação. Portanto, várias pesquisas têm sido conduzidas para encontrar fatores prognósticos, contudo, um fator prognóstico crível ainda não tem sido descoberto.

5 Com relação ao adenocarcinoma endometrióide endometrial, por exemplo, vários indicadores clinicopatológicos são correntemente usados para prognóstico, tais como o estágio cirúrgico da doença, o envolvimento de linfonodos, a infiltração miométrica, os tipos histológicos de células, o grau de diferenciação de carcinoma, o espalhamento intraperitoneal, a extensão
10 cervical, a invasão vascular e semelhantes (literatura de não-patente 2). Contudo, não pode ser dito que os indicadores clinicopatológicos descritos na literatura são indicadores completamente confiáveis para prognóstico de adenocarcinoma endometrióide endometrial.

Por outro lado, P-LAP é uma amino-peptidase de superfície
15 celular, e é um sinônimo de oxitocinase (literatura de não-patente 3). P-LAP também é referida a uma amino-peptidase de membrana regulada por insulina associada com vesículas contendo transportador 4 de glicose (GLUT4) (literatura de não-patente 4). Recentemente, foi mostrado que P-LAP está presente tanto em tecidos quanto em células de adenocarcinoma
20 endometrióide endometrial, e que funciona como um regulador de crescimento de célula de carcinoma (literatura de não-patente 5). Também, têm sido relatadas as mudanças intrigantes de P-LAP em endométrio normal durante o ciclo menstrual (literatura de não-patente 6). Contudo, não tem sido mostrado que P-LAP pode ser um fator prognóstico em carcinoma.

25 (Literatura de não-patente 1) Am. J. Obstet. Gynecol., 1983;
146: 141-144

(Literatura de não-patente 2) Gynecol. Oncol., 1991; 40: 55-65

(Literatura de não-patente 3) Arch. Biochem. Biophys., 1992;

292: 388-392

(Literatura de não-patente 4) J. Biol. Chem., 1995; 270: 23612-23618

(Literatura de não-patente 5) Clin. Cancer Res., 2003; 9(4): 1528-1534

5 (Literatura de não-patente 6) J. Clin. Endocrinol. Metab., 2002; 87: 1384-1389

Descrição da invenção

Um objetivo da presente invenção é proporcionar um reagente para avaliação diagnóstica e/ou prognóstica de carcinoma. Outro objetivo da presente invenção é proporcionar uma método para determinação de fatores prognósticos em carcinoma. Ainda outro objetivo da presente invenção é proporcionar um método para avaliação prognóstica de carcinoma.

Os presentes inventores conduziram vários estudos para solucionar os problemas acima mencionados. Como um resultado, verificaram que P-LAP pode ser um fator prognóstico em carcinoma, incluindo carcinoma ginecológico tal como adenocarcinoma endometrióide endometrial, carcinoma cervical, carcinoma ovariano etc., e assim completaram a presente invenção.

A saber, a presente invenção refere-se a:

20 (1) Um reagente para avaliação diagnóstica e/ou prognóstica de carcinoma, que compreende um anticorpo anti-P-LAP como um ingrediente ativo;

(2) O reagente de acordo com (1) acima, no qual o carcinoma é carcinoma ginecológico;

25 (3) O reagente de acordo com (2) acima, no qual o carcinoma ginecológico é adenocarcinoma endometrióide endometrial, carcinoma cervical ou carcinoma ovariano;

(4) O reagente de acordo com qualquer um de (1) a (3) acima, no qual o anticorpo anti-P-LAP é um anticorpo anti-P-LAP de humano;

(5) O reagente de acordo com qualquer um de (1) a (3) acima, no qual o anticorpo anti-P-LAP é um anticorpo policlonal anti-P-LAP de humano;

5 (6) Um método para determinação de P-LAP que é um fator prognóstico em carcinoma, que compreende:

(a) uma etapa de contatar tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma com um anticorpo anti-P-LAP e

10 (b) uma etapa de medir a intensidade da reação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP presente nos tecidos de carcinoma e o anticorpo anti-P-LAP;

(7) O método de acordo com (6) acima, no qual o carcinoma é carcinoma ginecológico;

15 (8) O método de acordo com (7) acima, no qual o carcinoma ginecológico é adenocarcinoma endometrióide endometrial, carcinoma cervical ou carcinoma ovariano;

(9) O método de acordo com qualquer um de (6) a (8) acima, no qual o anticorpo anti-P-LAP é um anticorpo anti-P-LAP de humano;

20 (10) O método de acordo com qualquer um de (6) a (8) acima, no qual o anticorpo anti-P-LAP é um anticorpo policlonal anti-P-LAP de humano;

(11) Um método para avaliação prognóstica de carcinoma, que compreende:

(a) uma etapa de contatar tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma com um anticorpo anti-P-LAP;

25 (b) uma etapa de medir a intensidade da reação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP presente nos tecidos de carcinoma e o anticorpo anti-P-LAP;

(c) uma etapa de correlacionar a intensidade de reação específica de antígeno-anticorpo com prognóstico de carcinoma;

(12) O método de acordo com (11) acima, no qual o carcinoma é carcinoma ginecológico;

(13) O método de acordo com (12) acima, no qual o carcinoma ginecológico é adenocarcinoma endometrióide endometrial, carcinoma cervical ou carcinoma ovariano;

(14) O método de acordo com qualquer um de (11) a (13) acima, no qual o anticorpo anti-P-LAP é um anticorpo anti-P-LAP de humano;

(15) O método de acordo com qualquer um de (11) a (13) acima, no qual o anticorpo anti-P-LAP é um anticorpo policlonal anti-P-LAP de humano; e

(16) Um kit de imunoenensaio para determinação da quantidade de P-LAP presente em tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma, que compreende um anticorpo anti-P-LAP e uma enzima marcadora para determinação da quantidade de P-LAP ligada no anticorpo anti-P-LAP.

É usada uma avaliação prognóstica acurada de carcinoma pode ser realizada quando a presente invenção é usada e é determinada a quantidade de P-LAP presente em tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma, incluindo carcinoma ginecológico tal como adenocarcinoma endometrióide endometrial. Isto possibilita a provisão de tratamento apropriado aos pacientes pós-operativos.

Breve descrição dos desenhos

Fig. 1 mostra a superexpressão preferencial de P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide endometrial de humano.

Fig. 2 mostra a correlação entre a imunorreatividade de P-LAP e o intervalo livre de doença em pacientes com adenocarcinoma endometrióide endometrial.

Fig. 3 mostra a correlação entre a imunorreatividade de P-LAP

e o intervalo livre de doença em pacientes com adenocarcinoma endometrióide endometrial no estágio inicial.

Fig. 4 mostra a correlação entre a imunorreatividade de P-LAP e o intervalo livre de doença em pacientes com adenocarcinoma endometrióide endometrial no estágio avançado.

Na Fig. 1:

símbolo A mostra imunorreatividade negativa para P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide de grau 1;

símbolo B mostra imunorreatividade negativa para P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide de grau 2;

símbolo C mostra imunorreatividade fracamente positiva para P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide de grau 1;

símbolo D mostra imunorreatividade fortemente positiva para P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide de grau 1;

símbolo E mostra imunorreatividade fortemente positiva para P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide de grau 2; e

símbolo F mostra imunorreatividade fortemente positiva para P-LAP em tecidos de adenocarcinoma endometrióide de grau 3.

Melhor modo de realizar a invenção

Anticorpo anti-P-LAP que é um ingrediente ativo do reagente da presente invenção é preferivelmente um anticorpo anti-P-LAP de humano. Também, o anticorpo anti-P-LAP de humano pode ser um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal. Aqueles anticorpos podem ser produzidos usando P-LAP como antígeno de acordo com métodos convencionais. Por exemplo, é possível produzir um anticorpo policlonal anti-P-LAP pelo método descrito em PLACENTA, Nakanishi *et al.*, 2000, vol. 21, p. 628-634.

Tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma são usados para avaliação prognóstica de carcinoma utilizando o reagente da

presente invenção. Embora não haja limitação sobre os tipos de carcinoma, exemplos de carcinoma preferivelmente incluem carcinoma ginecológico tal como adenocarcinoma endometrióide endometrial (incluindo adenocarcinoma endometrióide e adenocarcinoma endometrial), carcinoma ovariano, carcinoma cervical etc.; carcinoma pancreático, carcinoma de próstata e semelhantes, mais preferivelmente carcinoma ginecológico tais como adenocarcinoma endometrióide endometrial, carcinoma cervical, carcinoma ovariano etc.

Os tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma são fixados em formalina, embebidos em parafina e transformados em seções de tamanho apropriado para preparar as amostras de tecido de carcinoma, e então a quantidade de P-LAP em tecidos de carcinoma é determinada usando aquelas amostras.

A quantidade de P-LAP presente nos tecidos de pacientes com carcinoma pode ser determinada por imunoensaio, ou mais especificamente, por (a) contato de tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma com um anticorpo anti-P-LAP, seguido por (b) medição da intensidade da reação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP presente em tecidos de carcinoma e anticorpo anti-P-LAP.

Quando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase, por exemplo, é empregado para o imunoensaio acima mencionado, o método pode ser realizado como segue.

Primeiro, amostras de tecido de carcinoma desparafinadas são incubadas com peróxido de hidrogênio para bloquear peroxidase endógena, e então adicionalmente incubadas com soro de cabra normal para bloquear ligação não-específica. Um anticorpo anti-P-LAP (anticorpo primário) é adicionado na mesma para efetuar a reação de antígeno-anticorpo, seguida pela adição de estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano picante para a reação de ligação. As condições para a reação de antígeno-anticorpo e a

reação de ligação não são especificamente limitadas, e podem ser semelhantes àquelas normalmente empregadas para aqueles tipos de reações.

Um substrato cromogênico tal como 3-amino-9-etil-carbazol atua sobre o complexo obtido como acima (complexo de P-LAP, anticorpo anti-P-LAP, IgG de cabra anti-coelho biotinilada e estreptavidina conjugada em peroxidase) na presença de peróxido de hidrogênio para desenvolver cor, e contra-manchado com hematoxilina. A quantidade de P-LAP em tecidos de carcinoma pode ser determinada por análise da intensidade de coloração das amostras.

Enzimas diferentes de peroxidase podem ser usadas como um marcador para determinação da quantidade de P-LAP em tecidos de carcinoma desde que o anticorpo anti-P-LAP ligado em P-LAP possa ser detectado pelo método. Exemplos de tais enzimas incluem desidrogenase málica, nuclease estafilocócicas, desta-5-esteróide-isomerase, álcool-desidrogenase de levedura, alfa-glicerol-fosfato-desidrogenase, triose-fosfato-isomerase, fosfatase alcalina, asparaginase, glicose-oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glicose-6-fosfato-desidrogenase, glicoamilase, acetilcolina-esterase e semelhantes.

Um kit de ensaio pode ser proporcionado pela combinação da enzima marcadora acima mencionada com um anticorpo anti-P-LAP. O kit opcionalmente compreende um reagente para ligar um anticorpo anti-P-LAP com uma enzima marcadora, uma solução de reação, um substrato, um diluente de substrato e/ou uma solução de terminação de reação.

O marcador pode ser um isótopo radioativo, um material fluorescente, um material quimioluminescente, um material bioluminescente etc. diferente de enzima. Estes marcadores são ligados em moléculas desejadas por uma técnica comum convencionalmente usadas por aquelas pessoas experientes na técnica.

A seguir, a intensidade da imunorreatividade de P-LAP

(intensidade da reação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP e anticorpo anti-P-LAP) em tecidos de carcinoma medida acima está correlacionada com prognóstico de carcinoma, deste modo prognóstico de carcinoma pode ser avaliado. O processo acima mencionado é explicado
5 abaixo pelo emprego do caso de adenocarcinoma endometrióide endometrial, incluindo adenocarcinoma endometrial, como um exemplo.

A intensidade da reação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP e anticorpo anti-P-LAP, por exemplo intensidade de imunocoloração de P-LAP, determinada pelo imunoensaio acima foi classificada em uma
10 escala de três classificações tais como negativa (-), fracamente positiva (+) e fortemente positiva (++), e foi examinada a correlação entre a intensidade e o intervalo livre de doença em casos de adenocarcinoma endometrióide endometrial, incluindo adenocarcinoma endometrial. Os resultados revelaram que a taxa de sobrevivência livre de doença de pacientes que tiveram
15 intensidade negativa ou fracamente positiva foi significativamente maior do que aquela para pacientes que tiveram intensidade fortemente positiva. Em adição, outros estudos mostraram que qualquer uma das características incluindo estágio cirúrgico da doença, grau de tumor (estágio de diferenciação), invasão miométrica, infiltração vascular e envolvimento de
20 linfonodo, tiveram uma correlação positiva com a intensidade de imunocoloração de P-LAP.

Aqueles fatos indicam que P-LAP presente em tecidos de carcinoma é um marcador prognóstico confiável para carcinoma. Portanto, avaliação prognóstica de carcinoma pode ser realizada quando a
25 quantidade de P-LAP presente em tecidos de carcinoma obtidos de pacientes com carcinoma é determinada pelo imunoensaio acima mencionado usando um anticorpo anti-P-LAP, e então a intensidade da imunorreação entre P-LAP e anticorpo anti-P-LAP é correlacionada com o prognóstico de carcinoma.

Exemplos

A presente invenção será adicionalmente ilustrada por meio dos seguintes exemplos, embora não limitem a presente invenção.

Exemplo 1

5 (1) Pacientes:

Noventa e nove pacientes com adenocarcinoma endometrióide endometrial, incluindo carcinoma endometrial e adenocarcinoma endometrial, que haviam sido cirurgicamente tratados no Hospital da Universidade de Nagoya entre Janeiro de 1993 e Dezembro de 2000 foram incluídos neste estudo. Diagnóstico foi estabelecido em todos os casos pré-operativamente por curetagem de endométrio. Muitos pacientes foram tratados por histerectomia radial com disseções de linfonodo pélvico. Contudo, em 21 pacientes, a disseção de linfonodo não foi realizada por causa de sua idade e das complicações. Todos os pacientes foram divididos em estágios de acordo com a classificação da Federation of International Gynecology and Obstetrics (FIGO), e seus tumores foram graduados bem como diferenciados (G1, $\leq 5\%$ de componentes sólidos), moderadamente diferenciados (G2, 6-50% de componentes sólidos), ou insatisfatoriamente diferenciados (G3 $\geq 50\%$ de componentes sólidos). Neste estudo, a investigação foi limitada ao adenocarcinoma endometrióide por causa do número pequeno de outros tipos histológicos. Quimioterapia adjuvante foi administrada em pacientes no estágio I com fatores de risco tal como grau histológico alto e semelhantes, e a todos os pacientes nos estágios II, III, e IV. Duas a três semanas mais após a cirurgia, estes pacientes foram submetidos a 4-6 ciclos de quimioterapia baseada em cisplatina. Tempo de catamnésia médio dos pacientes sobreviventes foi de 55,3 meses, variando de 20 a 120 meses. Todos os indivíduos foram examinados a cada 3 meses nos primeiros 2 anos e depois a cada 6 meses.

O estado de cada estágio é como segue.

Estágio I: tecido de carcinoma está presente apenas no endométrio.

Estágio II: carcinoma se espalha para a cerviz uterina além do endométrio.

5 Estágio III: carcinoma se espalha para fora do útero, mas não para fora da pélvis pequena.

Estágio IV: carcinoma se espalha para além da pélvis pequena para outras partes do corpo, ou alcança a bexiga ou o reto.

(2) Imunocoloração de P-LAP

10 Consentimento informado foi obtido de cada paciente para uso de amostra. Todas as amostras de tecido foram fixadas em formalina 10%, embebidas em parafina, e rotineiramente manchadas com hematoxilina e eosina para exame histológico.

Anticorpo policlonal anti-P-LAP de humano foi preparado de acordo com o método descrito em PLACENTA, 2000, vol. 21, p. 628-634. Coloração imuno-histoquímica foi realizada usando a técnica de avidina-biotina-imuno-peroxidase (Histofine SAB-PO Kit, Nichirei, Tóquio, Japão). Seções foram cortadas em uma espessura de 4 µm, e imunocoloradas pelo método de estreptavidina-biotina-imuno-peroxidase. Áreas contendo células de carcinoma viáveis foram confirmadas por patologistas e selecionadas. Seções desparafinadas em tampão citrato 0,01 M foram tratadas três vezes por 5 minutos a 90°C a 750 W com um forno de microondas H2500. Seções foram incubadas com peróxido de hidrogênio 0,3% por 20 minutos e então adicionalmente incubadas com soro de cabra normal 10%. Anticorpo policlonal anti-P-LAP de humano (0,4 µg/seção) foi adicionado nas seções de tecido e incubado por 1 hora. A ligação de anticorpos foi seguida com IgG de cabra anti-coelho biotinilada e estreptavidina conjugada em peroxidase de rábano picante (Histofine SAP-PO, Nichirei, Tóquio, Japão). Desenvolvimento cromogênico foi realizado por imersão das seções em 3-

15

20

25

amino-9-etil-carbazol (AEC, Nichirei, Tóquio, Japão). As lâminas foram contra-manchadas com hematoxilina de Mayer. Para avaliar a especificidade da reação, houve um controle negativo em todos os casos. A lâmina de controle negativo foi preparada do mesmo bloco de tecido. Intensidade de imunocoloração foi classificada semi-quantitativamente sobre uma escala de três classificações (negativa = -, fracamente positiva = +, fortemente positiva = ++) em relação aos controles positivo e negativo conhecidos. Ambas as lâminas de hematoxilina e de eosina rotineiras e a reação de P-LAP foram revistas independentemente por dois patologistas.

10 (3) Análise estatística

A associação entre a distribuição de P-LAP e as características clinicopatológicas foram avaliadas usando o teste exato de Fischer ou o teste de qui quadrado. O método de Kaplan-Meier foi utilizado para resumir as distribuições de intervalo livre de doença. Teste de classificação em log foi usado para avaliar os fatores individuais com respeito a estes resultados e o modelo de perigos proporcionais escalonados de Cox foi usado para avaliar simultaneamente fatores múltiplos. Pacientes que morreram sem evidência de recorrência de doença foram checados bem como a data da morte. Para comparação entre dois parâmetros, p menor do que 0,05 foi considerada significativo.

20 (4) Resultados

A expressão de proteína e a localização celular de P-LAP foram analisadas por coloração imuno-histoquímica de seções de tecido obtidas de pacientes com adenocarcinoma endometrióide endometrial de humano.

25 Fig 1A mostra representação de coloração de P-LAP fracamente positiva exibida em adenocarcinoma endometrióide G1. Fig. 1B mostra representação fortemente positiva em adenocarcinoma endometrióide G1. A imunorreatividade mais forte para P-LAP estava localizada na área

com invasão de célula de tumor em camada miométrica de adenocarcinoma endometrióide G2 e G3 (Fig. 1C, D). Células endometriais normais foram quer negativas quer fracamente positivas.

A idade média das pacientes foi de 58,5 anos (faixa de 36-75).

5 Dos 99 casos, 69 casos (69,7%) tiveram imunocoloração de P-LAP específica. Coloração fraca foi detectada em 38 casos (38,4%) e coloração forte em 31 casos (31,3%). Tabela 1 mostra as relações entre P-LAP e algumas características clínicas, incluindo grau histológico, estágio cirúrgico da doença, invasão miométrica, envolvimento de linfonodo e infiltração vascular etc.

Tabela 1

Características	Número total de pacientes (%)	Número de pacientes mostrando-se fortemente positivos para P-LAP (%)	P
Idade			
< 60	61 (61,6)	21 (34,4)	0,51
≥ 60	38 (38,4)	10 (26,3)	
Estágio cirúrgico			
I-II	77 (77,8)	20 (26,0)	0,02 ^a
III-IV	22 (22,2)	11 (50,0)	
Grau (estágio de diferenciação)			
1	55 (55,6)	4 (7,2)	<0,01 ^b
2	29 (29,3)	18 (62)	
3	15 (15,1)	9 (60)	
Invasão miométrica			
nenhuma	11 (11,1)	0 (0)	0,01 ^b
1/2 ou menor	53 (53,5)	11 (20,8)	
1/2 ou maior	35 (35,4)	20 (57,1)	
Infiltração vascular			
negativa	29 (29,3)	16 (55,2)	<0,01 ^a
positiva	70 (70,7)	15 (21,4)	
Envolvimento de linfonodo			
negativo	10 (10,1)	7 (70)	<0,01 ^b
positivo	68 (68,7)	18 (26,4)	

a: teste exato de Fischer; b: teste de qui quadrado

Os presentes inventores não verificaram correlação significativa entre P-LAP e a idade do paciente. P-LAP foi estabelecida como fortemente positiva em 7,2% dos casos G1, em 62% dos casos G2, e em 60%

dos casos G3. Os presentes inventores verificaram uma correlação positiva entre P-LAP e grau histológico ($p < 0,01$). Os presentes inventores também verificaram correlação entre P-LAP e estágio cirúrgico da doença ($p = 0,02$), invasão muscular ($p = 0,01$), envolvimento de linfonodo ($p < 0,01$), e infiltração vascular ($p < 0,01$).

Foram desenhadas curvas de intervalo livre de doença pelo método de Kaplan-Meier para avaliar o impacto prognóstico da expressão de P-LAP. As taxas de sobrevivência livre de doença (DFS) de 10 anos de pacientes que tiveram expressões para P-LAP negativas, fracamente positivas, e fortemente positivas foram de 100%, 94,7%, e 47,3%, respectivamente (Fig. 2). Pacientes com coloração de P-LAP fortemente positiva mostraram um intervalo livre de doença significativamente menor comparados com os pacientes mostrando coloração de P-LAP negativa ou fracamente positiva ($p < 0,01$). Ainda mais, a análise de intervalo livre de doença foi realizada separadamente em pacientes de estágio inicial (estágios I-II; $n = 77$) e de estágio avançado (estágios III-IV; $n = 22$). Nos pacientes de estágio inicial, a taxa de sobrevivência livre de doença de 10 anos dentre aqueles mostrando expressão de P-LAP negativa, fracamente positiva, e fortemente positiva foram de 100%, 96,6%, e 73,9% respectivamente (Fig. 3). Pacientes com coloração de P-LAP fortemente positiva também mostraram um intervalo livre de doença significativamente menor comparados com aquela de pacientes mostrando expressão de P-LAP negativa ou fracamente positiva ($p < 0,05$). No estágio avançado, apenas um paciente foi negativo para P-LAP, assim este paciente foi incluído dentre os pacientes com expressão de P-LAP fracamente positiva. As taxas de sobrevivência livre de doença de 10 anos de pacientes que tiveram expressão de P-LAP negativa ou fracamente positiva foram de 90%, e foram de 8,3% para aqueles que tiveram expressão fortemente positiva com a diferença sendo significativa ($p < 0,01$) (Fig. 4).

Tabela 2 mostra análise univariada e multivariada de intervalo

livre de doença de acordo com as características clínicas e o estado de P-LAP.

Tabela 2

Parâmetro	Categoria	Análise univariada <i>p</i>	Análise multivariada		
			razão de disparidade	CI 95%	<i>P</i>
Idade	<60	0,07	1,02	0,95 – 1,08	0,55
	≥60				
Estágio cirúrgico	I/II	<0,01	8,78	2,77 – 27,8	<0,01
	III/IV				
P-LAP	Negativo/fracamente positivo	<0,01	12,8	2,84 – 58,8	<0,01
	fortemente positivo				
Grau (estágio de diferenciação)	1/2	0,02	-	-	-
	3				
Invasão miométrica	Negativa ou 1/2 ou menor	0,14	-	-	-
	1/2 ou maior				
Invasão vascular	Positiva	0,06	-	-	-
	Negativa				

CI 95% : intervalo de confiança de 95%

Metástase de linfonodo foi excluída como um fator nestas análises porque 21 pacientes não sofreram linfodectomia. Análise univariada demonstrou que os seguintes fatores foram significativos: estágio cirúrgico, grau de tumor (estágio de diferenciação), e expressão de P-LAP. Estes fatores foram adicionalmente analisados por métodos multivariados. Análise multivariada demonstrou que a expressão de P-LAP e o estágio cirúrgico foram fatores prognósticos independentes.

Exemplo 2

O impacto prognóstico da expressão de P-LAP sobre pacientes com carcinoma ovariano que haviam sido cirurgicamente tratadas foi avaliado de acordo com o mesmo método como descrito no Exemplo 1.

De 61 pacientes (idade média: 52,5, faixa de idade: 33-78), os números de pacientes mostrando expressão de P-LAP negativa, fracamente positiva, e fortemente positiva são 12, 20, e 29, respectivamente.

As taxas de sobrevivência livre de doença de pacientes que

tiveram expressões de P-LAP negativas e de pacientes que tiveram expressões de P-LAP fracamente positivas foram ambas de 75%, enquanto que a taxa de sobrevivência livre de doença de 10 anos das pacientes que tiveram expressões de P-LAP fortemente positivas foi de 48,3%. Como mencionado acima, as pacientes mostrando coloração de P-LAP fortemente positiva mostraram uma taxa de sobrevivência livre de doença significativamente menor comparadas com aquela das pacientes mostrando coloração de P-LAP negativa ou fracamente positiva ($p < 0,05$).

Aplicabilidade industrial

10 O reagente e o método para determinação da presente invenção podem ser usados para avaliação diagnóstica de carcinoma, mas são úteis no campo de fármacos e de tratamento médico.

REIVINDICAÇÕES

1. Método *in vitro* para avaliação prognóstica de carcinoma de ovário em um paciente, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma etapa de contatar tecidos de carcinoma de ovário obtidos de pacientes com carcinoma com um anticorpo anti-P-LAP;

(b) uma etapa de medir a intensidade da ligação específica de antígeno-anticorpo entre P-LAP presente nos tecidos de carcinoma ovariano e o anticorpo anti-P-LAP;

(c) uma etapa de correlacionar o aumento da intensidade de ligação específica de antígeno-anticorpo com prognóstico ruim de carcinoma ovariano, em que o prognóstico ruim de carcinoma ovariano é a diminuição de dez anos na taxa de sobrevida livre de doença do paciente.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti P-LAP é um anticorpo anti P-LAP de humano.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti P-LAP é um anticorpo policlonal anti P-LAP de humano.

4. Kit de imunoensaio, caracterizado pelo fato de compreender o anticorpo anti P-LAP e uma enzima marcadora selecionada do grupo consistindo de peroxidase, desidrogenase málica, nuclease estafilocócica, delta-isomerase 5-esteróide, álcool desidrogenase de levedura, alfa-glicerol fosfato desidrogenase, triose fosfato isomerase, fosfatase alcalina, asparaginase, glicose oxidase, beta-galactosidase, ribonuclease, urease, catalase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicoamilase e acetilcolinesterase.

5. Kit de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti P-LAP é um anticorpo anti P-LAP de humano.

6. Kit de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti P-LAP é um anticorpo policlonal anti P-LAP de humano.

Fig. 1

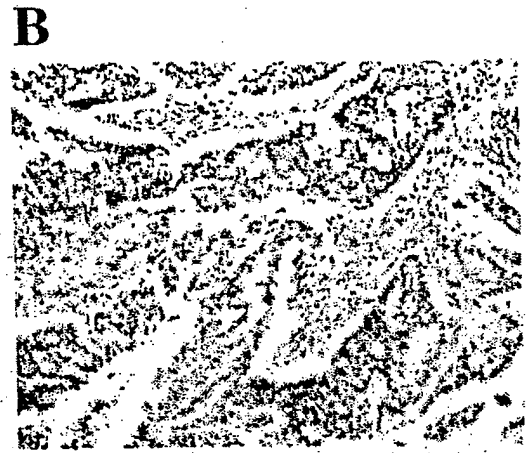


Fig. 2

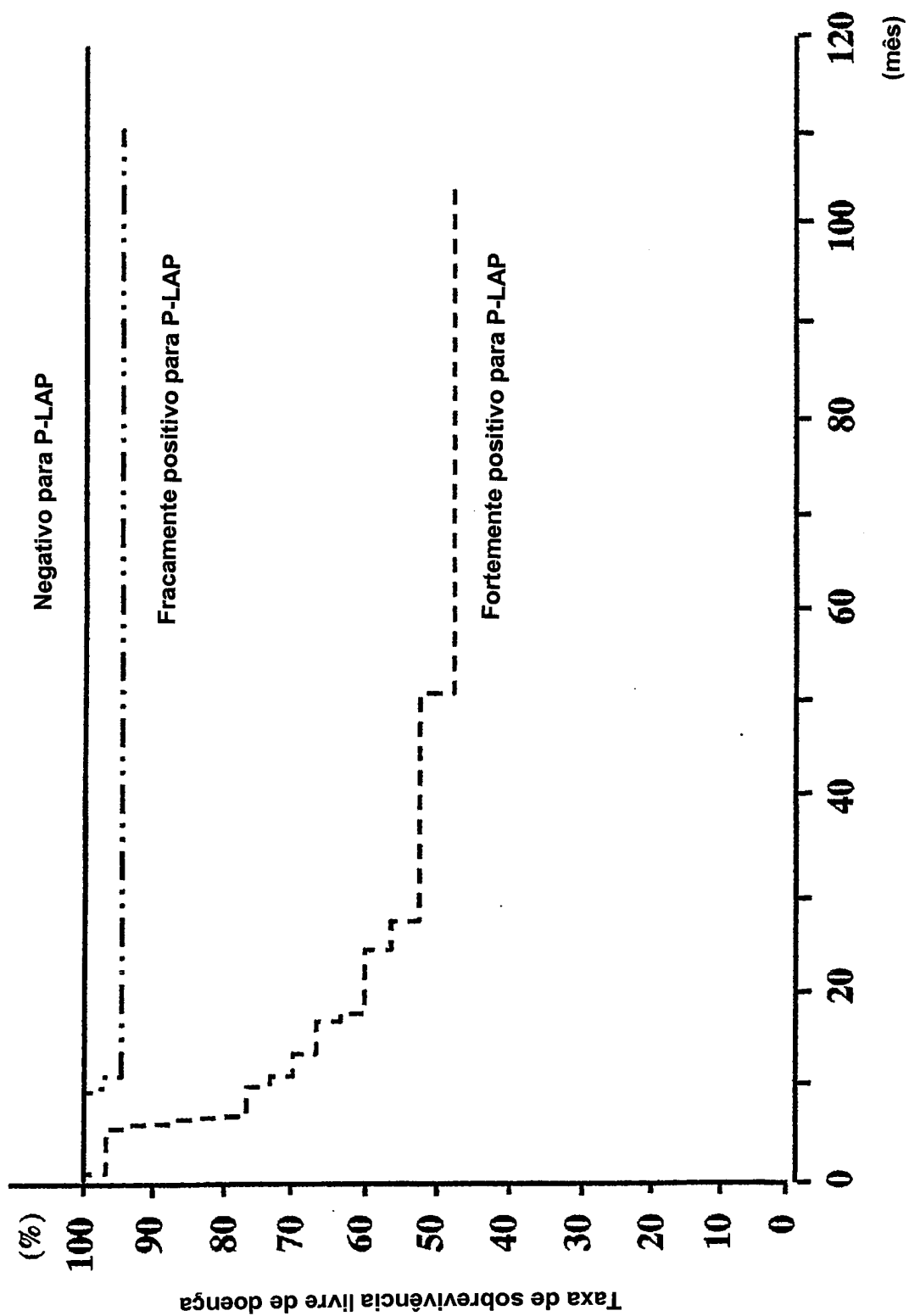


Fig. 3

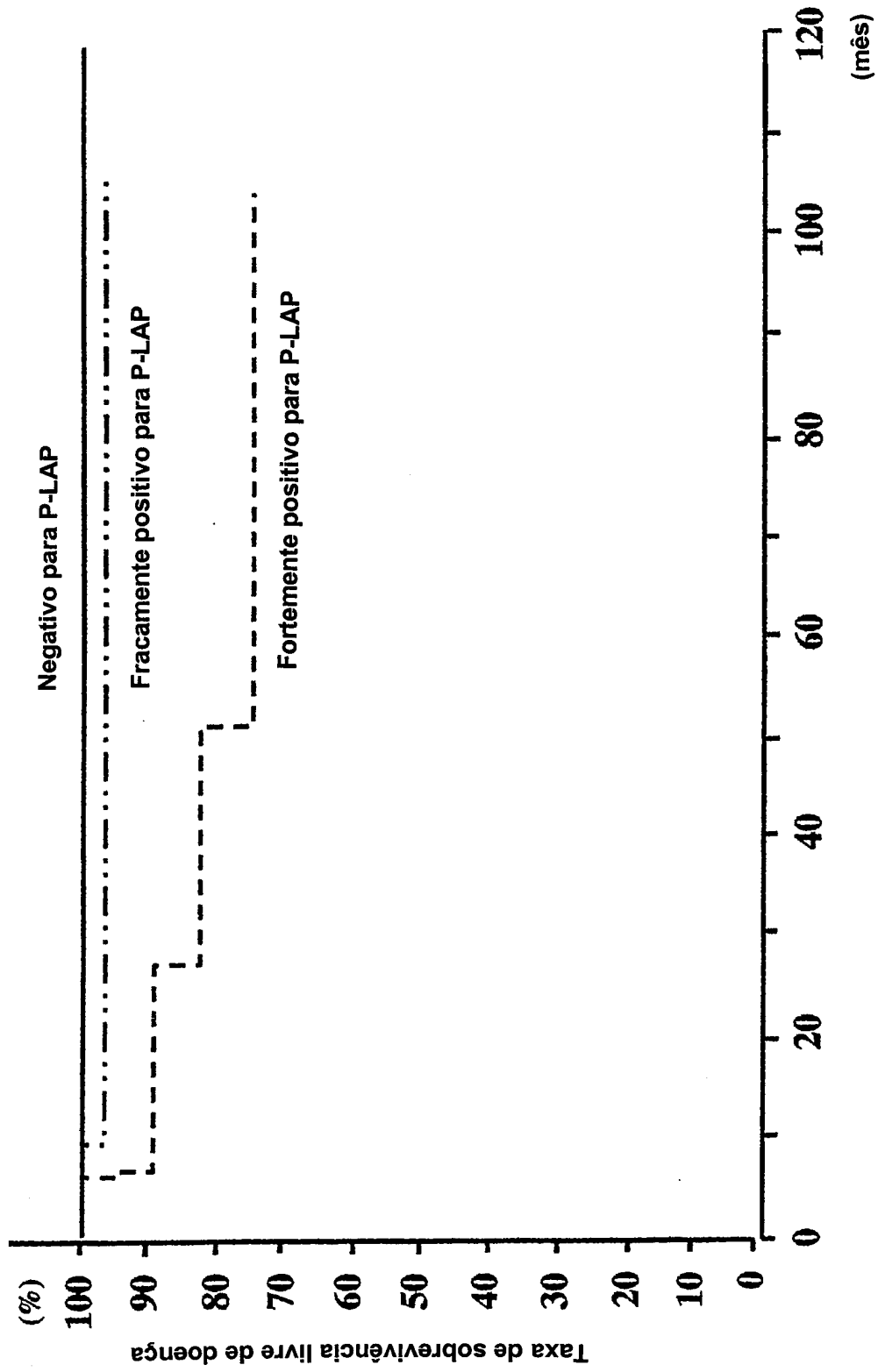


Fig. 4

