

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 403 781**

21 Número de solicitud: 201031629

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**05.11.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**21.05.2013**

71 Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)  
Avda. de la Constitución 18  
41071 Sevilla ES y  
UNIVERSIDAD DE GRANADA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VILLEGAS, Trinidad;  
OLMEDO, Carmen;  
MUFFAK-GRANERO, Karim;  
COMINO, Ana;  
BECERRA, Antonio;  
GARROTE, Daniel;  
BUENO, Pablo;  
FERRÓN, José Antonio;  
CANO, Carlos y  
BLANCO, Armando**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS, Y PARA EVALUAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.**

57 Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico del cáncer de páncreas, y para evaluar la respuesta al tratamiento.

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico en un estadio temprano del adenocarcinoma de páncreas, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y cuantitativo) específico, que es diferente dependiendo del estado de la enfermedad y se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz. Kit que comprende los medios necesarios para llevar a cabo el método de la invención.

**ES 2 403 781 A1**

**DESCRIPCIÓN**

**MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PÁNCREAS, Y PARA EVALUAR LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.**

5 La presente invención se encuentra dentro de la medicina y la biología molecular, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico en un estadio temprano del adenocarcinoma de páncreas, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, que permite el establecimiento de un patrón individual de reconocimiento (cuali- y  
10 cuantitativo) específico, que es diferente dependiendo del estado de la enfermedad y se ve modificado post-tratamiento, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes, así como el diagnóstico precoz.

**ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

15 El cáncer de páncreas se encuentra entre las cinco primeras causas de muerte por cáncer en el mundo desarrollado con una tasa de supervivencia del 19% a 1 año. Un 95% de tumores malignos del páncreas son adenocarcinoma ductal infiltrante. En la mayoría de los casos se diagnostica en un estado muy  
20 avanzado e incluso pacientes con tumores resecables localizados, presentan metástasis. Los tumores que rodean o comprimen estructuras arteriales grandes como las ramas del tronco celíaco o la arteria mesentérica superior son considerados irresecables. La intervención quirúrgica permanece como el tratamiento central, si bien hay que complementarla con otras opciones para  
25 aumentar el tiempo de supervivencia. En este sentido, el tratamiento quimioterápico y de radiación se utilizan bien en combinación con la intervención quirúrgica, o bien como tratamiento definitivo en los casos de tumores avanzados, no resecables (Yeo *et al.* Cancer of the Pancreas. Cancer : principles and practice of oncology. Vincent T. DeVita, Jr., Samuel Hellman,  
30 Steven A. Rosenberg;7th Edition 2005). Así, en enfermedad avanzada, la administración de gemcitabina es el agente estándar, combinándola con citostáticos para mejorar la respuesta.

El conocimiento a nivel molecular, de las rutas de señalización que intervienen en la transformación celular ha permitido el desarrollo de tratamientos nuevos contra el cáncer. La desregulación de la señalización a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR está implicada en el proceso de carcinogénesis. Diversos tipos de cáncer tienden a expresar altos niveles de EGFR y su activación inicia una cascada de señalización cuyos componentes son nuevas dianas potenciales para el tratamiento del cáncer. Moléculas como erlotinib, inhibidor de tirosin-quinasa a nivel intracelular, actúa impidiendo la autofosforilación del receptor de EGFR y posterior transducción de la señal.

10

Los inhibidores de EGFR parecen mostrar máxima actividad en pacientes de cáncer de pulmón con mutaciones activadoras en el dominio citoplásmico. Esto sugiere que los pacientes en los cuales los tumores presenten determinadas mutaciones de este receptor, se beneficiarían de un resultado clínico mejor. Este hecho indicaría que el estudio de la presencia de estas mutaciones en los pacientes se podría utilizar como pauta de aplicación de la terapia para aquellos que respondieran mejor a inhibidores de EGFR (3-5). Sin embargo, esto no es totalmente cierto, ya que no todos los pacientes con mutaciones detectadas responden al tratamiento, mientras que pacientes sin dichas mutaciones son respondedores. Además de EGFR, otras moléculas parecen tener un papel en la aparición y progresión del cáncer. Así la activación del oncogen K-ras junto con la inactivación de genes supresores tumorales (p53, DPC4, p16, y BRCA2) se ha asociado con el desarrollo de cáncer de páncreas (Orchekowski *et al.*, 2005. *Cancer Res* 65:11193-202).

25

Por otra parte, ciertos genes se encuentran sobre-expresados en adenocarcinoma de páncreas, entre ellos claudin 4, fascin, Hsp47, mesotelin, Muc4, PSCA, S100A4. Estos datos indican que un estudio del perfil de expresión génica proporciona una oportunidad única para mejorar el conocimiento del diagnóstico y evolución de este letal tumor y proporcionar una mejora en las pautas del tratamiento del paciente, tanto a nivel de búsqueda de biomarcadores apropiados que reflejen una respuesta eficaz

30

como a nivel de aplicación del mejor tratamiento a nivel individual a cada paciente según los biomarcadores que manifiesten.

5 Por otro lado, las alteraciones genéticas dan lugar a que las células tumorales produzcan diferentes moléculas que están involucradas en la transformación neoplásica y la progresión tumoral. Estas moléculas a menudo hacen emerger  
10 señales autocrinas y paracrinas estimuladoras del crecimiento, factores de crecimiento peptídicos secretados, citoquinas y hormonas. Los niveles aumentados de estas moléculas solubles pueden ser utilizados para el diagnóstico del cáncer y el manejo terapéutico. Se ha detectado expresión de  
15 proteínas asociadas al cáncer, como HER2, por las células tumorales circulantes en sangre. Estas células tienen valor pronóstico en la enfermedad metastásica, y su presencia aumenta, tras un ciclo de tratamiento, en pacientes con probabilidad de que la terapia fuese inefectiva. Estos resultados indican el  
20 valor de utilizar analíticas que permitan la detección en la sangre de los pacientes con cáncer o bien células cancerosas circulantes o las moléculas que puedan producir, y que estén involucradas en el proceso cancerígeno. Este procedimiento es menos invasivo para monitorizar tanto la evolución de la enfermedad como la respuesta a la terapia o intervención quirúrgica. De esta  
manera, estas moléculas-diana pueden ayudar a caracterizar la biología de la tumorigénesis, la progresión de la enfermedad y además pueden identificar biomarcadores para monitorizar el tratamiento de los pacientes con cáncer.

25 Una manera de detectar estas moléculas es utilizando anticuerpos específicos, para detectar su presencia en el suero de los pacientes con cáncer, así en pacientes con cáncer de vejiga, la presencia de p33ING1 y ciclina D2, se ha asociado con pérdida de la regulación del ciclo celular; angiostatina y factor de crecimiento epidérmico con repuesta antiangiogénica; osteopontina y CXCR4 con riesgo metastásico. El perfil de proteínas en suero que se pueden detectar  
30 utilizando anticuerpos puede ser característico de la enfermedad (Orchekowski *et al.*, 2005. *Cancer Res* 65:11193-202).

Estas moléculas alcanzan el torrente sanguíneo tanto por secreción o

excreción como por mecanismos de degradación incluyendo apoptosis o necrosis tisular. La neovascularización, vías celulares tumorales autocrinas y las paracrinas, son factores colaboradores de que estas dianas antigénicas alcancen la circulación y se puedan detectar en sangre (Burczynski *et al.*, 2006. J Mol Diagn. 8:51-61; Golub *et al.*, 1999. Science 286:531-537; Smirnov *et al.*, 2005. Cancer Researc. 65:4993-4997).

En el caso del cáncer de páncreas, en un estudio realizado sobre la expresión del antígeno de células madre prostático (PSCA) mRNA se detectó mediante RT-PCR en la sangre de 7 de 11 pacientes con cáncer de páncreas (63,6%), y no se observó en la sangre de individuos sanos. Otras alteraciones genéticas características del cáncer de páncreas, como mutación K-ras que está presente en el 80-90% de los casos, pueden detectarse en el plasma de dichos pacientes por la misma técnica, con potencial aplicación en la monitorización de la enfermedad. En esta línea, la viabilidad de medir en sangre periférica moléculas que permitan conocer la evolución de cáncer de páncreas fue la demostración de que los niveles de transcritos de RNAm del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en sangre periférica estaban elevados en los 10 pacientes con cáncer de páncreas estudiados comparados con 9 controles sanos ( $p < 0.05$ ) medidos por Q-RT-PCR y los transcritos de RNAm del TNF- $\alpha$  se redujeron a un nivel similar a los controles tras la extirpación del tumor.

La tecnología actual permite determinar el perfil molecular de la enfermedad, mediante micromatrices (microarrays) capaces de medir simultáneamente los niveles de expresión de miles de genes. Se puede medir la expresión a nivel de ARNm, para ello están los microarrays que utilizan sondas con ADNc u oligonucleótidos sintéticos o medir las proteínas utilizando como "sondas" anticuerpos específicos. En el caso de medir los niveles de expresión de los genes a nivel de ARNm, se puede partir de ARN total o ARNm aislado de la muestra de tejido o de células. Tanto en el caso de partir de ARN total como de ARNm se realiza un paso previo de obtención de ADN complementario (ADNc), y posteriormente se realiza una transcripción in vitro para la obtención de ARNc

marcado con biotina de manera proporcional al mRNA original expresado en el tejido. Este ARNc biotinilado se fragmenta y se hibrida específicamente con el panel de sondas de ADNc u oligonucleótidos sintéticos presentes en el microarray en condiciones específicas, se elimina el que no ha hibridado y la
   
 5 cantidad de ARNc-biotinilado para cada gen se pone de manifiesto al añadir un fluoróforo que suele ser Cy5 unido a estreptavidina. La fluorescencia se detecta con un escaner, que la convierte en datos numéricos y se crea una base de datos en la que podemos tener unos valores de intensidad de fluorescencia directamente relacionados con el nivel de expresión de cada gen particular.
   
 10 Esto permite visualizar las interacciones de miles de genes simultáneamente.

En los últimos años, se han usado los perfiles de expresión génica basados en microarrays, para el diagnóstico de diversas enfermedades entre ellas el cáncer, si bien los estudios se han limitado a ciertos tipos de esta enfermedad,
   
 15 lo cual ha permitido clasificar los distintos tipos de cáncer en subgrupos clínicamente relevantes, de una manera más precisa y antes de que aparezcan manifestaciones clínicas severas, con lo que aumenta la posibilidad de un mejor diagnóstico precoz, un mejor seguimiento de la evolución clínica y de la respuesta a los diferentes tratamientos con respecto a los métodos
   
 20 convencionales o en conjunto con ellos. De esta manera mediante el análisis del perfil de expresión génica es posible predecir la respuesta a quimioterapia o a agentes dirigidos frente a dianas moleculares del cáncer (Burczynski *et al.*, 2006. J Mol Diagn. 8:51-61; Golub *et al.*, 1999. Science 286:531-537; Smirnov *et al.*, 2005. Cancer Researc. 65:4993-4997; Burczynski *et al.*, 2005. Clin
   
 25 Cancer Res 11:1181-9). El perfil molecular se puede utilizar como una herramienta adicional dentro de los exámenes clínicos para determinar la sensibilidad a un tratamiento determinado, y de esta manera reducir tratamientos innecesarios.

30 La sangre periférica es un tipo de tejido esencial para la investigación clínica debido a su papel crítico en la respuesta inmune y metabólica, y a su fácil recolección, lo cual es esencial para el descubrimiento de marcadores

biológicos de enfermedad. Así, la aplicación de la tecnología de microarrays en sangre periférica puede proporcionar nuevos conocimientos de las variaciones en la expresión genética global específicamente asociadas a la enfermedad (Burczynski *et al.*, 2005. Clin Cancer Res 11:1181-9; Feezor *et al.*, 2004. 5 Physiol. Genomics 19:247-254; Samuel *et al.*, 2003. ASCO Molecular Therapeutics Symposium Nov 2002 San Diego. BMC Cancer 3:3; Jazaeri *et al.*, 2005. Clin cancer Res. 11: 6300-10; McPhail *et al.*, 2005. 10:1485-1487). Es posible el aislamiento de ARN total de sangre sin riesgo de su degradación, y aunque inicialmente se comprobó que había diferencias en la expresión debido 10 a sobreabundancia de mRNA de hemoglobina, una vez que se dispone de técnicas que eliminan ARN de la fracción eritrocitaria los sistemas de recolección de ARN de sangre son idóneos para estudios que requieran muchas muestras, seguimiento a lo largo del tiempo o multicéntricos. Se ha demostrado que el método de reducción de RNAm de globina consigue 15 aumentar la calidad de los datos de las muestras de RNA estabilizado con menor variación intragrupos y una tasa de detección de genes expresados similar a la de células mononucleares en sangre. La utilización de sangre periférica, permite un aumento en la identificación de biomarcadores basados en el perfil de expresión de ARN y puede ayudar en lo que ya se conoce como 20 farmacogenómica. El uso de células mononucleares de sangre periférica para análisis de transcriptoma ha probado su valor para valorar la firma genética asociada a la enfermedad y relacionada a respuesta a fármacos. La disponibilidad de microarrays de ADN está acelerando el descubrimiento de dianas del cáncer (Andrea *et al.*, 2006. Nature 439: 353-357). Se ha empleado 25 RT-PCR para detectar transcritos mRNA de cáncer de mama o asociados a epitelio como citoqueratinas, EGFR, mamoglobulina, MUC-1, beta-HCG, c-Met, GalNac-T, MAGE-3.

En el caso del cáncer de páncreas se han estudiado microarrays de proteínas 30 para detección de marcadores en suero (Orchekowski *et al.*, 2005. 65:11193-202), así como se han identificado, mediante microarrays de cDNA, 158 genes expresados en el epitelio neoplásico con mayor expresión (mayor del doble,

p<0,01) en 10 cánceres de páncreas comparados con 10 muestras de páncreas no tumoral (Logsdon *et al.*, 2003. Cancer Res 63:2649-57). Investigadores de la Universidad de Ulm, aprovechando el conocimiento de estudios previos de perfil de expresión genética de cáncer de páncreas, diseñaron un array diagnóstico de cDNA especialmente diseñado para diagnóstico diferencial de tumores pancreáticos basado en el perfil de expresión de biopsias obtenidas con aspiración mediante aguja fina, puesto que más del 90% de tumores pancreáticos representan adenocarcinomas ductales; según estos autores los resultados permitían diferenciar adenocarcinomas ductales de tumores no malignos de páncreas con un 95% de especificidad (Buchloz *et al.*, 2005. Clin Cancer Res. Nov 15;11(22):8048-54). Así mismo se han realizado estudios comparativos de los análisis de microarrays utilizados en cáncer de páncreas a fin de encontrar genes y biomarcadores que pudiesen ser utilizados en nuevas estrategias diagnósticas y terapéuticas (Brandt *et al.*, 2004. Pancreatology 4: 587-597).

Es importante, por tanto, encontrar biomarcadores que puedan emplearse para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas.

## 20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico precoz del cáncer de páncreas, así como para evaluar la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad, permitiendo el establecimiento de grupos de pacientes.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende *HLA-G*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento



del cáncer de páncreas. En una realización preferida de este aspecto de la invención, los genes se usan de manera simultánea.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos  
5 útiles para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento del cáncer de páncreas, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- b) detectar la cantidad de expresión de, al menos, uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende *HLA*, *ARFGAP1*, *S100A2*,  
10 *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*,  
*RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, en la muestra biológica aislada de (a).

En una realización preferida, el primer método de la invención comprende  
15 además:

- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra  
20 biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica, y/o comprende células de sangre periférica (*peripheral blood cells* PBCs).

En otra realización preferida, el primer método de la invención además  
comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos a los  
25 que se ha tomado muestra de sangre periférica a los siete días de efectuada una intervención quirúrgica por cáncer de páncreas, cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia  
30 (que se obtiene del grupo control individuos con cáncer de páncreas antes de una intervención quirúrgica).

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del producto de expresión de al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o  
5 cualquiera de sus combinaciones, se realiza mediante RT-PCR.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del producto de expresión de al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*,  
10 *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, se realiza mediante un microarray.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, pronóstico o seguimiento del cáncer de páncreas, de ahora en adelante segundo método  
15 de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- b) detectar la cantidad de expresión de, al menos, uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*,  
20 *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, en la muestra biológica aislada de (a),
- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia, y
- d) asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con cáncer de  
25 páncreas cuando presentan un nivel de expresión dos veces superior al de los individuos sanos.

La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva del gen, en un grupo de individuos sanos, o de la expresión del gen  
30 en el grupo de individuos antes de ser sometidos a una intervención quirúrgica. En particular, en la presente invención, las muestras de sangre periférica se obtuvieron antes de la intervención quirúrgica (T0) y a los siete días después de realizada ésta (T7d)

Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

5

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica, y/o comprende células de sangre periférica (*peripheral blood cells* PBCs).

10

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del producto de expresión de al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: *HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, se realiza mediante RT-PCR.

15

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del producto de expresión de al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: *HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9* y *FKBP1B*, o

20

cualquiera de sus combinaciones, se realiza mediante un microarray.

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, a la capacidad de discriminar entre individuos afectados o no por adenocarcinoma de páncreas.

25

A su vez, atendiendo al método de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la

30

- materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P, test de Student o funciones discriminantes de Fisher, medidas no paramétricas de Mann Whitney,
- 5 correlacion de Spearman, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite
- 10 detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.
- 15 Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada comprende células de sangre periférica (*peripheral blood cells* PBCs).
- 20 El término “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.
- 25 La detección de la cantidad del producto de expresión de los genes seleccionados de la lista que comprende: *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores
- 30 de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad o la concentración de estos productos de expresión de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes estadios del cáncer de

páncreas. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por cáncer de páncreas, que permite subclasificarlos.

La medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes, o de las proteínas a las que se traducen, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión de los genes, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y/o *FKBP1B* de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema,

- con una cantidad de los productos de expresión de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y/o *FKBP1B* de una o varias muestras de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.
- 10 Los productos de expresión de los genes van a dar un determinado perfil de expresión génica. Se entiende por "perfil de expresión génica" el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica. La determinación del nivel de ARNm derivado de la transcripción de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, puede realizarse, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), RT-PCR cuantitativa, retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; análisis en serie de la expresión génica (SAGE, SuperSAGE); chips de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante

transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. El perfil de expresión génica también podría obtenerse mediante la  
5 detección y/o cuantificación de las proteínas producto de la traducción del ARNm derivado de la transcripción de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, mediante por ejemplo, pero sin limitarnos, inmunodetección por western blot. La detección cuantitativa de la expresión de  
10 los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B* puede realizarse más preferiblemente mediante PCR en tiempo real (RT-PCR ó RTqPCR). La detección en tiempo real de los productos amplificados puede  
15 llevarse a cabo mediante la utilización de moléculas fluorescentes que se intercalan en el ADN de cadena doble o mediante hibridación con diferentes tipos de sondas.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la descripción, se  
20 refiere a la cantidad absoluta o relativa (al gen de referencia) de productos de expresión de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y/o *FKBP1B* que permite discriminar un determinado estadio de cáncer de páncreas de otros estadios, o de otras enfermedades. Las cantidades de  
25 referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método  
30 de la invención en muestras de individuos que no padecen cáncer de páncreas.

La cantidad de referencia será, por ejemplo, en el caso de la diferenciación

entre los pacientes afectados por cáncer de páncreas de los individuos sanos, la expresión constitutiva del gen en un grupo control de individuos sanos. Sin embargo, en el caso de la subclasificación de los pacientes afectados por cáncer de páncreas en función de sus manifestaciones, el grupo control estará  
5 formado por un grupo de enfermos con cáncer de páncreas que no tuvieron esa manifestación clínica.

Así pues, la muestra o muestras de referencia pueden ser, por ejemplo, obtenidas a partir de las células sanguíneas de un paciente con cáncer de  
10 páncreas, en una determinada fase clínica. En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras obtenidas de una población de individuos con cáncer  
15 de páncreas en distintas fases, mediante técnicas estadísticas bien conocidas.

El gen HLAG, antígeno mayor de histocompatibilidad clase I, implicado en la presentación de antígenos al sistema inmune. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_002118 ; y/o en la  
20 SEQ ID NO: 1).

En el contexto de la presente invención, el gen HLAG se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 1, y que comprendería  
25 diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 1,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 30 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que



comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 1, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína KMP11. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 002721.

El gen ARFGAP1 ó *ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 1* (RP11-261N11.1, ARF1GAP, HRIHFB2281, MGC39924), codifica para una proteína activadora de GTPasa que interacciona con el factor de ribosilación ARF1 (Weimer *et al.*, 2008. J Cell Biol. Nov 17;183(4):725-35). Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_060679; y/o la SEQ ID NO: 2.

En el contexto de la presente invención, ARFGAP1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína ARFGAP1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 018209.2.

El gen S100A2, o "*S100 calcium binding protein A2*" (RP11-49N14.8, CAN19, MGC111539, S100L), es un gen que codifica para una proteína de la familia S100, implicado en la regulación de procesos como ciclo celular y diferenciación. Una expresión alterada de este gen se ha detectado en cáncer  
 5 de mama. La subexpresión de este gen se asocia a una pobre diferenciación tumoral y menor supervivencia en carcinoma de laringe (Almadori *et al.*, 2009. J Otolaryngol Head Neck Surg. Feb;38(1):16-22).

En el contexto de la presente invención, S100A2 se define también por una  
 10 secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_005969 y/o en la SEQ ID NO: 3, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
 15 comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 3,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

20 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 3, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína S100A2. Entre dichas moléculas de  
 25 ácido nucléico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 005978.3.

El gen SLC25A23 o "*solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 23*", (APC2, MCSC2, MGC2615, SCaMC-3). Es un  
 30 transportador mitocondrial de solutos dependiente de Ca. Puede actuar como un ATP-Mg/Pi intercambiador que media el transporte de Mg-ATP en intercambio por fosfato, catalizando el nivel neto o eflujo de nucleótidos de

adenina dentro o fuera de la mitocondria (Bassi *et al.*, 2005. Gene. Jan 31;345(2):173-82. Epub 2005 Jan 7.).

.En el contexto de la presente invención, SLC25A23 se define también por una  
5 secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia  
codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI)  
NP\_077008 y/o en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes  
procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
10 comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con  
la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido  
a la degeneración del código genético,

15 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%,  
un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las que el  
polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las  
características estructurales de la proteína SLC25A23. Entre dichas moléculas  
20 de ácido nucléico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank  
(NCBI) NM 024103.2.

El gen KLRG1 o "*killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1*", (2F1,  
CLEC15A, MAFA, MAFA-2F1, MAFA-L, MAFA-LIKE, MGC13600), desempeña  
25 un papel inhibidor de las células "natural killer" (NK) (Schwartzkopff *et al.*, 2007.  
J Immunol. Jul 15;179(2):1022-9)

En el contexto de la presente invención, KLRG1 se define también por una  
secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia  
30 codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI)  
NP\_077008 y/o en la SEQ ID NO: 5, y que comprendería diversas variantes  
procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 5,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

5 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 5, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína KLRG1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 005810.3.

15 El gen GZMB o "*granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1*", (CCPI, CGL-1, CGL1, CSP-B, CSPB, CTLA1, CTSSL1, HLP, SECT) está implicado en inducción de apoptosis. Este gen codifica para la enzima Granzima B, necesaria para dirigir la lisis celular en respuestas inmunes mediadas por células. Parece estar ligada a una activación de caspasas responsables de la apoptosis (Rotonda *et al.*, 2001. Chem Biol. Apr;8(4):357-68).

.En el contexto de la presente invención, GZMB se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_004122 y/o en la SEQ ID NO: 6, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6,

30 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido

a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 6, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GZMB. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 004131.3.

10 El gen GFOD1 o "*glucose-fructose oxidoreductase domain containing 1*", está implicado en inducción de apoptosis. Este gen codifica para la enzima Granzima B, necesaria para dirigir la lisis celular en respuestas inmunes mediadas por células. Parece estar ligada a una activación de caspasas responsables de la apoptosis (Rotonda *et al.*, 2001. Chem Biol. Apr;8(4):357-15 68).

En el contexto de la presente invención, GFOD1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_061861 y/o en la SEQ ID NO: 7, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 7,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 7, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GFOD1. Entre dichas moléculas de

ácido nucléico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 018988.2.

El gen GPI o "*glucose-6-phosphate isomerase*", codifica para una enzima  
5 dimérica que cataliza la isomerización reversible de glucosa-6-fosfato y fructosa-6-fosfato, además puede actuar como una citoquina segregada por tumores y como factor angiogénico (AMF) que estimula la motilidad de la célula endotelial (25).

10 En el contexto de la presente invención, GPI (AMF, DKFZp686C13233, GNPI, NLK, PGI, PHI, SA-36, SA36) se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_000166, NP\_001171651.1 y/o en la SEQ ID NO: 8, y que comprendería diversas  
15 variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 8,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

20 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 8, y en las que el  
25 polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GPI. Entre dichas moléculas de ácido nucléico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM\_000175.3 ó NM\_001184722.1.

30 El gen GPR56 o "*G protein-coupled receptor 56*", (UNQ540/PRO1083, BFPP, DKFZp781L1398, TM7LN4, TM7XN1) receptor ligado a proteína G cuya sobre-expresión puede suprimir crecimiento tumoral y metástasis (Huang et al., 2008.

Mol Cell Biochem. Jan;308(1-2):133-9. Epub 2007 Oct 12).

En el contexto de la presente invención, GPR56 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia  
5 codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_002057 y/o en la SEQ ID NO: 9, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 9,

10 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
15 comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 9, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GPR56. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI)  
20 NM 201524.1.

El gen MUC20 o "*mucin 20, cell surface associated*", (UNQ2782/PRO7170, FLJ14408, FLJ53153, KIAA1359, MUC-20) codifica para una mucina, glicoproteína que forma una barrera mucosa insoluble (Higuchi *et al.*, 2004. Mol  
25 Cell Biol. Sep;24(17):7456-68). Este gen parece reducir la activación transitoria de MAPK inducida por hepatocyte growth factor (HGF). Así mismo inhibe la proliferación de la expresión de MMP1 y MMP9 inducida por HGF (Higuchi *et al.*, 2004. Mol Cell Biol. Sep;24(17):7456-68).

30 En el contexto de la presente invención, MUC20 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI)

NP\_002057 y/o en la SEQ ID NO: 10, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 10,

5 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que  
10 comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 10, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MUC20. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI)  
15 NM 152673.

El gen MAP4K1 o "*mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1*", (HPK1) codifica para una mucina, glicoproteína que forma una barrera mucosa insoluble (Higuchi *et al.*, 2004. Mol Cell Biol. Sep;24(17):7456-68). Este gen  
20 parece reducir la activación transitoria de MAPK inducida por hepatocyte growth factor (HGF). Así mismo inhibe la proliferación de la expresión de MMP1 y MMP9 inducida por HGF (Higuchi *et al.*, 2004. Mol Cell Biol. Sep;24(17):7456-68).

25 En el contexto de la presente invención, MAP4K1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_002057 y/o en la SEQ ID NO: 11, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

30 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 11,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con



la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 11, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MAP4K1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI)  
10 NM 007181.3.

El gen HBD o "*hemoglobin, delta*", está implicado en el transporte de oxígeno desde el pulmón a otros tejidos periféricos.

15 En el contexto de la presente invención, HBD se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_002057 y/o en la SEQ ID NO: 12, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

20 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 12,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

25 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 12, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las  
30 características estructurales de la proteína HBD. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 000519.3.

El gen RPS5 o “*ribosomal protein S5*”, codifica para una proteína ribosomal cuya expresión variable se ha detectado, además de en cáncer de páncreas, en cáncer colorrectal, si bien no se ha relacionado con la severidad de la enfermedad (Campagna *et al.*, 2008. Int J Clin Exp Pathol 1: 32-43, Frigerio et al., 1995. Biochim Biophys Acta 1262: 64-68).

En el contexto de la presente invención, RPS5 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_002057 y/o en la SEQ ID NO: 13, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 13,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 13, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína RPS5. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 031902.3.

El gen BNIP3L o “*BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like*”, (BNIP3a, NIX) puede funcionar como supresor de tumores. Inhibe la apoptosis inducida por BNIP3 (Fei *et al.*, 2004. Cancer Cell. Dec;6(6):597-609; Mellor et al., 2007. Cancer Metastasis Rev. Dec;26(3-4):553-66).

En el contexto de la presente invención, BNIP3L se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia

codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_004322 y/o en la SEQ ID NO: 14, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

5 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 14,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

10 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 14, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína BNIP3L. Entre dichas moléculas de  
15 ácido nucléico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 004331.2.

El gen PCDH9 o "*protocadherin 9*", (BNIP3a, NIX) es un gen que codifica para una proteína de adhesión celular dependiente de calcio (protocadherina) y  
20 alterada en cáncer de páncreas (Hidalgo, 2010. Pancreatic Cancer. N Engl J Med 362:1605-17).

En el contexto de la presente invención, PCDH9 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia  
25 codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP\_065136 y/o en la SEQ ID NO: 15, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 15,

30 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido

a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 15, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína PCDH9. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 020403.4 o NM 203487.2.

10 El gen FKBP1B o "*FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa*", (FKBP12.6, FKBP1L, OTK4, PKBP1L, PPlase) este gen codifica para una proteína miembro de la familia de las inmunofilinas, implicadas en inmunoregulación y en procesos celulares básicos como plegamiento de proteínas y su paso a través de membranas. Esta proteína es una cis-trans prolil-isomerasa que se une al  
15 inmunosupresor FK506 y a rapamicina

En el contexto de la presente invención, FKBP1B se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante que se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI)  
20 NP\_004107 y/o en la SEQ ID NO: 16, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 16,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria hibrida con  
25 la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 16, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína FKBP1B. Entre dichas moléculas de  
30

ácido nucléico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 004116.2

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una  
5 proteína sustancialmente homóloga a cualquiera de las proteínas HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9 y/o FKBP1B. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones  
10 postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación metilación o acilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a cualquiera de las proteínas HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1,  
15 GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9 y/o FKBP1B, cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:  
20 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16, respectivamente a como se ha descrito anteriormente; es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9,  
25 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, y SEQ ID NO: 16, de al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homologas a  
30 cualquiera de las proteínas HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9 y/o FKBP1B pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia,

por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

5 La expresión "funcionalmente equivalente", tal como aquí se utiliza, significa que las proteínas o el/los fragmento/s de la/s proteína/s en cuestión mantiene/n esencialmente las propiedades biológicas o inmunológicas descritas en este documento. Dicha capacidad se puede determinar mediante métodos convencionales.

10 En otra realización preferida, la detección de la cantidad de cualquiera de las proteínas HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9 y/o FKBP1B se realiza mediante un inmunoensayo. El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se  
15 basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.

20

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en  
25 contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador. Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente  
30 descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad de anticuerpos frente a los antígenos

HLAG, ARFGAP1, S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9 y/o FKBP1B. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto  
5 marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante  
10 colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención además comprende asignar al individuo según el paso (a) al grupo de individuos  
15 intervenidos quirúrgicamente y a los que siete días después de realizada ésta se les toma muestra de sangre periférica cuando presenta una cantidad de producto de expresión de los genes *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, detectado en el paso (b) mayor y estadísticamente significativa en comparación con una cantidad de referencia  
20 (que se obtiene del grupo control individuos con cáncer de páncreas antes de una intervención quirúrgica).

A su vez, atendiendo a los métodos de la presente invención, se podrían establecer otras subclasificaciones dentro de esta principal, facilitando, por  
25 tanto, la elección y el establecimiento de regímenes terapéuticos adecuados. Esta discriminación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es  
30 significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza,

determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de  
5 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad de forma diferencial 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 determinado grupo o población analizada.

10 La quimioterapia actual es muy eficaz en los primeros estadios. El método de la presente invención permite el diagnóstico precoz, y por tanto, adelantar significativamente el inicio del tratamiento.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de seguimiento de la  
15 evolución del cáncer de páncreas, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende:

a) tomar una muestra biológica aislada de un individuo,  
b) detectar la cantidad de producto de expresión de, al menos, uno de los genes que se seleccionan de la lista que comprende HLAG, ARFGAP1,  
20 S100A2, SLC25A23, KLRG1, GZMB, GFOD1, GPI, GPR56, MUC20, MAP4K1, HBD, RPS5, BNIP3L, PCDH9 y FKBP1B, o cualquiera de sus combinaciones, en la muestra biológica aislada de (a).

c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia, y

25 d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención la muestra  
30 biológica aislada de un individuo del paso (a) se obtiene de sangre periférica, y/o comprende células de sangre periférica (*peripheral blood cells* PBCs).



En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del producto de expresión de al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o  
5 cualquiera de sus combinaciones, se realiza mediante RT-PCR.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la detección del producto de expresión de al menos un gen que se selecciona de la lista que comprende: *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*,  
10 *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, se realiza mediante un microarray.

El término "seguimiento de la evolución", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como  
15 por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento del cáncer de páncreas, o a una intervención quirúrgica. Por tanto, en una realización preferida de este aspecto de la invención, el seguimiento se realiza post-tratamiento.

20 En una realización preferida, la detección de los productos de expresión se realiza de al menos dos, preferiblemente tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce trece, catorce, quince, y aún más preferiblemente los dieciséis genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y  
25 *FKBP1B*. En otra realización más preferida, la detección de los productos de expresión de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B* se realiza simultáneamente.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para analizar la cantidad del producto de expresión de los genes de

la lista que comprende: *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*, *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones.

- 5 Más preferiblemente comprende los medios necesarios para comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la  
10 presente invención.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad cantidad del producto de expresión de los genes *HLAG*, *ARFGAP1*, *S100A2*, *SLC25A23*, *KLRG1*, *GZMB*, *GFOD1*, *GPI*, *GPR56*, *MUC20*, *MAP4K1*,  
15 *HBD*, *RPS5*, *BNIP3L*, *PCDH9* y *FKBP1B*, o cualquiera de sus combinaciones, por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los  
20 soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la  
25 invención para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento del cáncer de páncreas.

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier  
30 longitud, tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

5

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15

**Fig. 1. Visualización de los 3 tubos con estabilizador de RNA para cada paciente y tiempo.**

20

**Fig. 2. Expresión génica.** Sobre-expresión superior a dos veces respecto a los voluntarios sanos (>2-fold,  $p < 0,05$ ) y de la sub-expresión. **(A)** Antes de la intervención. **(B)** A los 7 días de la intervención quirúrgica.

## EJEMPLOS

25

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los métodos de la invención para obtener datos útiles en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, y para el diagnóstico y el seguimiento de dicha enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pacientes y Métodos

5 Estudio aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada, en el cual se han estudiado cuatro pacientes con adenocarcinoma de páncreas comparando con un grupo de cinco voluntarios sanos. Las muestras de sangre periférica se obtuvieron antes de la intervención quirúrgica (T0) y a los siete días de realizada ésta  
 10 (T7d) utilizando para cada paciente y tiempo de toma de muestra, tres tubos que contienen un estabilizador de RNA. Una vez extraído, se procede a la purificación de este RNA comprobándose su calidad en un bioanalizador, de modo que las muestras de RNA cuya razón 28S/18S no sea del orden de 1,5 son desechadas. A continuación se procede a realizar la reacción de  
 15 transcripción inversa, así como a marcar los cRNA obtenidos con Cy5-streptavidina, procediéndose a hibridar éstos en los microarrays de genoma completo humano del sistema CodeLink. Cada microarray se realiza por duplicado cargando 2 µg de cRNA de cada paciente, para compararlo con 2 µg de cRNA de los voluntarios sanos. Una vez finalizada la hibridación durante un  
 20 periodo de 12h y a 37°C, se realizó la lectura de los microarrays en un láser escáner, procediéndose a la cuantificación y normalización de los valores obtenidos mediante el software CodeLink 5.0.

De cada paciente participante en el estudio se obtuvieron antes de la  
 25 intervención quirúrgica (T0) y 7 días después de ésta (T7d) 18 ml de sangre periférica distribuidos del siguiente modo: 12 ml para la obtención de ARN, 6 ml para un estudio de bioquímica sérica de los parámetros lipasa, amilasa,  $\gamma$ -glutamil transferasa (GGT) y alanin-L-transferasa (ALT=GPT) como indicadores de funcionalidad pancreática, y 6 ml para realización de un hemograma  
 30 completo así como fórmula leucocitaria. El perfil de expresión génica se estudió mediante bioarrays del sistema CodeLink (Applied Microarrays, Tempe, AZ, USA) a partir de RNA total de sangre periférica obtenido con Paxgene Blood

RNA Tubes (PreAnalytix, Qiagen, The Netherlands) y purificado con Paxgene Blood RNA kit (Qiagen, The Netherlands). La calidad del RNA obtenido se midió mediante microfluídica en un bioanalizador (Experion, Bio-Rad, Richmond, VI, USA). La fluorescencia de los bioarrays se determinó en un  
 5 escáner GenePix-4000B (Axon Instruments). Los datos se procesaron con el software de la plataforma CodeLink 5.0 (GE Healthcare).

## Resultados

10 Antes de la intervención quirúrgica (T0), y comparando con los voluntarios sanos, se han detectado 176 genes con un nivel de sobre-expresión superior a 2 veces ( $p < 0,05$ ), entre los cuales se encuentran: HLAG, implicado en la presentación de antígenos al sistema inmune; ARFGAP1, proteína activadora de GTPasa que interacciona con el factor de ribosilación ARF1; S100A2,  
 15 implicado en la regulación de procesos como ciclo celular y diferenciación; SLC25A23, transportador mitocondrial de solutos dependiente de Ca; KLRG1, que desempeña un papel inhibitor de las células “natural killer” (NK); GZMB, implicado en inducción de apoptosis; GFOD1, una glucosa-fructosa oxidoreductasa; GPI, glucosa fosfato isomerasa que además de función  
 20 glicolítica puede actuar como una citoquina segregada por tumores y como factor angiogénico; GPR56, receptor ligado a proteína G cuya sobre-expresión puede suprimir crecimiento tumoral y metástasis; MUC20, que codifica para una mucina, glicoproteína que forma una barrera mucosa insoluble. Después de la intervención, T7d, comparando con T0, se han detectado 11 genes con  
 25 una sobre-expresión superior a 2 veces ( $p < 0,05$ ), entre los que se encuentran: HBD, hemoglobina delta, implicada en el transporte de oxígeno desde el pulmón a otros tejidos periféricos; RPS5, que codifica para una proteína ribosomal cuya expresión variable se ha detectado en cáncer colorrectal, si bien no se ha relacionado con la severidad de la enfermedad.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento del cáncer de páncreas, que comprende:
  - 5 a. obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
  - b. detectar la cantidad de producto de expresión de:
    - 10 i. el gen *S100A2* y el gen *KLRG*, en la muestra biológica aislada de (a), cuando la muestra se obtiene de un individuo antes de la intervención quirúrgica,
    - ii. el gen *RPS5* y el gen *BNIP3L*, en la muestra biológica aislada de (a), cuando la muestra se obtiene de un individuo, post-intervención quirúrgica.
  
2. El método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico o  
15 seguimiento del cáncer de páncreas según la reivindicación anterior, que además comprende
  - c. comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
  
- 20 3. Un método de diagnóstico, pronóstico o seguimiento del cáncer de páncreas, que comprende los pasos (a) – (c) del método según la reivindicación 2, y además comprende:
  - 25 d. asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con cáncer de páncreas cuando presenta un nivel de expresión dos veces superior al de los individuos sanos.
  
4. Un método de seguimiento de la evolución del cáncer de páncreas, que comprende los pasos (a) – (c) del método según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además:
  - 30 d. repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la muestra se obtiene de sangre periférica.
- 5
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la detección del producto de expresión de se realiza mediante RT-PCR.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la detección del producto de expresión se realiza mediante un microarray.
- 10
8. Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 15
9. Un kit o dispositivo comprende los elementos necesarios para detectar el producto de expresión de:
- a. el gen S100A2 y el gen KLRG, en muestras de individuos antes de la intervención quirúrgica,
  - b. el gen RPS5 y el gen BNIP3L, en muestras de individuos post-intervención quirúrgica.
- 20
10. El uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 8-9, para la obtención de datos útiles en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento del cáncer de páncreas.

25

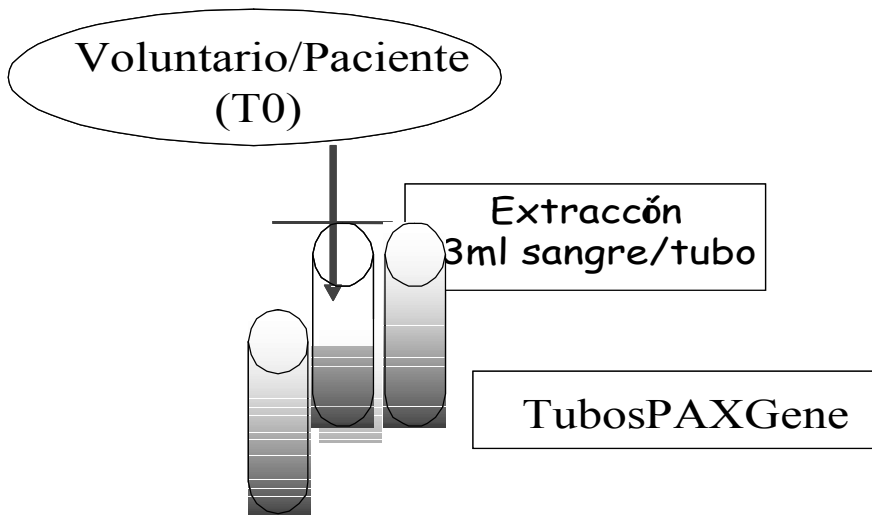


Fig. 1

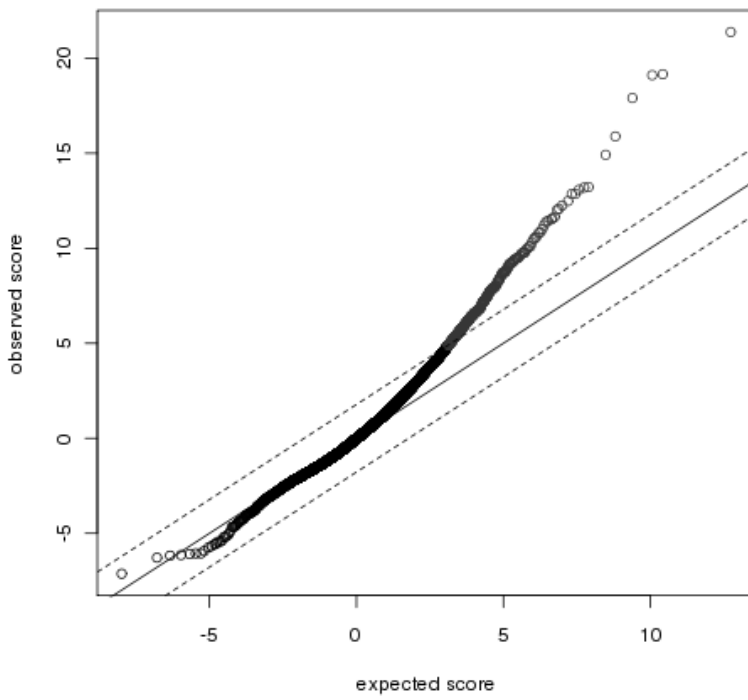
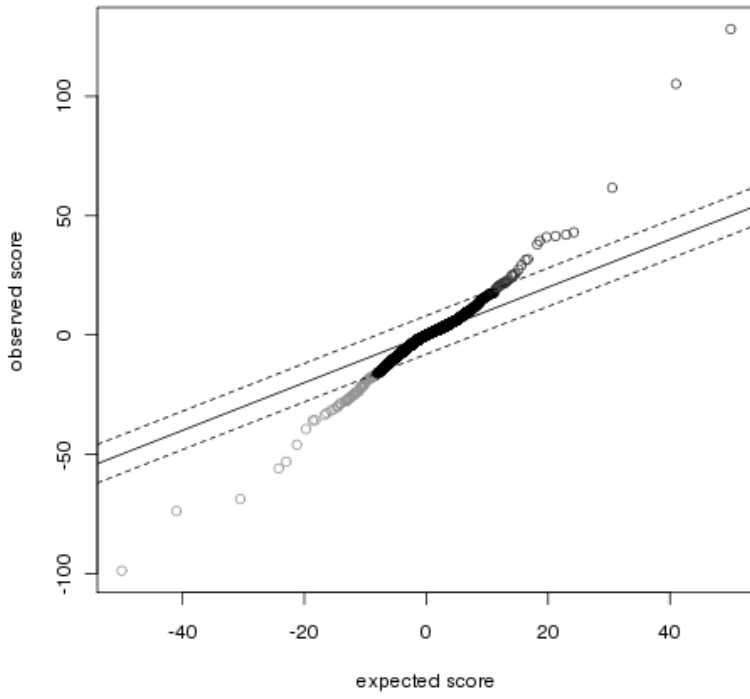


Fig. 2A





**Fig. 2B**



②① N.º solicitud: 201031629

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BIANKIN A. V., et al. "Expression of S100A2 calcium-binding protein predicts response to pancreatectomy for pancreatic cancer." Gastroenterology (2009) Vol. 137, páginas 558-568. Todo el documento.	1-10
A	OKAMI J., SIMEONE D. M., LOGSDON C. D. "Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cáncer." Cancer Research (2004) Vol. 64, páginas 5338-5346. Todo el documento.	1-10
A	ROSTY C., UEKI T., ARGANI P., JANSEN M., HRUBAN R. H., GOGGINS M. "Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation." American Journal of Pathology (2002) Vol. 160, páginas 45-50. Todo el documento.	1-10

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  
31.01.2013

Examinador  
M. J. García Bueno

Página  
1/4

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, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSI, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-10	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BIANKIN A. V., et al. "Expression of S100A2 calcium-binding protein predicts response to pancreatectomy for pancreatic cancer." Gastroenterology (2009) Vol. 137, páginas 558-568. Todo el documento.	2009
D02	OKAMI J., SIMEONE D. M., LOGSDON C. D. "Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer." Cancer Research (2004) Vol. 64, páginas 5338-5346. Todo el documento.	2004
D03	ROSTY C., UEKI T., ARGANI P., JANSEN M., HRUBAN R. H., GOGGINS M. "Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation." American Journal of Pathology (2002) Vol. 160, páginas 45-50. Todo el documento.	2002

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud de invención consiste en un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico, o seguimiento del cáncer de páncreas que comprende las etapas de obtención de una muestra biológica aislada de un individuo, detección de la cantidad de producto de expresión de los genes S100A2 y KLRG, o RPS5 y BNIP3L, y comparación con un valor de referencia (reivindicaciones 1-7).

La presente solicitud de invención también consiste en un kit para la detección del producto de expresión (reivindicaciones 8-9), y el uso de dicho kit (reivindicación 10).

El documento D01 consiste en el estudio de múltiples biomarcadores de vías biológicas distintas como posibles marcadores predictivos de respuesta a una pancreatectomía, siendo S100A2 un buen factor predictivo de la respuesta a una pancreatectomía por cáncer de páncreas (ver todo el documento).

El documento D02 consiste en un análisis de la expresión del gen BNIP3, encontrando una reducción de la regulación en adenocarcinomas pancreáticos en comparación con el páncreas normal (ver todo el documento).

El documento D03 consiste en un estudio de la sobreexpresión de S100A4 mediante RT-PCR en líneas celulares de páncreas (ver todo el documento).

**1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986) Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8,1 Ley 11/1986).**

Ninguno de los documentos D01-D03, o cualquier combinación relevante de ellos revela la detección de producto de expresión de los genes S100A2 y KLRG, o RPS5 y BNIP3L.

Por lo tanto, los documentos D01-D03 son solo documentos que reflejan el estado de la técnica. En consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva a la vista de los artículos 6.1 y 8.1 Ley 11/1986.