

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 191**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.11.2009 E 09764773 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014 EP 2361315**

54 Título: **CXCL4L1 como biomarcador de cáncer pancreático**

30 Prioridad:

27.11.2008 EP 08305853

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

05.06.2014

73 Titular/es:

**INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET
DE LA RECHERCHE MÉDICALE (100.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**BIKFALVI, ANDREAS;
PRATS, HERVÉ;
DUBRAC, ALEXANDRE;
HAGEDORN, MARTIN y
DUMARTIN, LAURENT**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 465 191 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

CXCL4L1 como biomarcador de cáncer pancreático

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere al uso de CXCL4L1 como biomarcador de cáncer pancreático en un paciente. La invención se refiere además a procedimientos para el tratamiento de cáncer pancreático y/o la prevención de metástasis pancreáticas.

10

Estado de la técnica

El cáncer pancreático es un tumor maligno del páncreas. Cada año aproximadamente 35.000 individuos en los Estados Unidos son diagnosticados con esta afección, y casi el mismo número mueren de la enfermedad. En Europa, más de 60.000 son diagnosticados cada año con este cáncer. Así, el cáncer pancreático tiene una de las mayores tasas de letalidad de todos los cánceres (Jemal y col., 2007) y, por tanto, sigue siendo un problema de salud humano importante que necesita urgentemente un tratamiento eficaz para esta patología mortal.

15

La angiogénesis implica la formación de nuevos vasos sanguíneos de origen capilar y este fenómeno está estrechamente controlado por un conjunto de factores. Ahora se ha reconocido ampliamente que gran parte de la actividad angiogénica que se produce en adultos es patológica. Así, la angiogénesis e invasión son dos procesos estrechamente ligados que desempeñan una función importante en la progresión de enfermedades tales como cáncer (Folkman, 1995). En particular, la expansión de tumores sólidos y otros cánceres depende críticamente de la angiogénesis (Folkman, 1971), haciendo las estrategias anti-angiogénesis relevantes para la terapia contra el cáncer (Folkman, 2001). Por otra parte, la invasión se requiere para la expansión local de la masa tumoral y para la diseminación metastásica.

20

25

Entre los factores investigado está CXCL4, que pertenece a la familia de las quimiocinas CXC (antigua terminología PF4 para factor de plaquetas 4) y que se sintetiza no solo en plaquetas o megacariocitos, sino también en otros tipos de células diferentes que incluyen monocitos, linfocitos T, células de músculo liso vascular y células endoteliales (Lasagni y col., 2007). CXCL4 o un péptido derivado de su dominio del extremo carboxilo (PF4/CTF) muestran significativa actividad antiangiogénica *in vitro* (Maione y col., 1990; Jouan y col., 1999; Hagedorn y col., 2001) e *in vivo* (Maione y col., 1990; Sharpe y col., 1990; Hagedorn y col., 2001). Suprimen el crecimiento de diversos tumores (Tanaka y col., 1997; Maione y col., 1991) y metástasis (Kolber y col., 1995) *in vivo*. Este efecto está relacionado con su acción antiangiogénica y no con la proliferación de células tumorales (Sharpe y col., 1990; Tanaka y col., 1997; Maione y col., 1991; Kolber y col., 1995). Aunque CXCL4 es uno de los primeros agentes descubiertos que tiene una acción antiangiogénica en sistemas *ex vivo* (Maione y col., 1990), los mecanismos receptores específicos que transducen la señal antiangiogénica de CXCL4 son todavía muy poco entendidos. Entre otros efectos descritos de la molécula son en particular funciones inmunomoduladoras sobre linfocitos T (Romagnani y col., 2005).

30

35

40

Además, un nuevo homólogo de CXCL4 llamado CXCL4L1 se identificó en 1989, pero solo recientemente se ha informado de algunos datos sobre la caracterización funcional de esta quimiocina. Se expresa en plaquetas, pero también en células de músculo liso y células endoteliales. Recientemente, el mecanismo de secreción de esta molécula se ha caracterizado en comparación con CXCL4 (Lasagni y col., 2007). CXCL4L1 se encuentra en cantidades significativas en el medio de células HEK transfectadas, pero no CXCL4L1. Además, CXCL4L1 parece ser constitutivamente exportado de una manera no regulada mientras que CXCL4 es exportado de una manera regulada mediante su liberación de gránulos de núcleo denso (DCG). Esto indica que CXCL4L1 tiene un mecanismo muy diferente de exportación y difusión de células.

45

50

55

Por tanto, CXCL4L1 se caracterizó como un potente inhibidor de angiogénesis más eficaz que CXCL4. Por ejemplo, la solicitud de patente internacional WO 2006/029487 se refiere a CXCL4L1, fragmentos y versiones modificadas de CXCL4L1 y fragmentos de CXCL4L1 para la prevención y/o reducción de angiogénesis, y más particularmente para el tratamiento o prevención de trastornos o enfermedades angiogénicos que implican trastornos angiogénicos o angiogénesis patológicas tales como cáncer.

En paralelo a este aspecto terapéutico primordial para el cáncer pancreático, una necesidad importante también se refiere al diagnóstico de un cáncer tal.

60

65

De hecho, un objetivo importante del campo de los biomarcadores para cáncer es el desarrollo de pruebas no invasivas que permitan la detección temprana del cáncer. La detección temprana del cáncer es crucial para la supervivencia a largo plazo y es particularmente relevante para cáncer pancreático, que es una causa importante de muerte por cáncer en el mundo, con una tasa de supervivencia a cinco años inferior al 5 %. Por tanto, los pacientes diagnosticados con cáncer pancreático normalmente tienen un mal pronóstico en parte debido a que el cáncer normalmente no produce síntomas tempranos, conduciendo a enfermedad localmente avanzada o metastásica en el momento del diagnóstico. Debido a que el cáncer pancreático es asintomático en las fases tempranas, la mayoría de los pacientes no son diagnosticados hasta que el cáncer se ha extendido más allá del páncreas, que contribuye

significativamente a la mala tasa de supervivencia a largo plazo como se ha mencionado previamente.

Sin embargo, la mayoría de los tumores sólidos, que incluyen cáncer pancreático, pueden frecuentemente curarse si se detectan y se tratan en una fase temprana.

Así, todavía hay una necesidad existente de desarrollar un procedimiento para diagnosticar cáncer pancreático, en particular durante la fase temprana del desarrollo del cáncer pancreático.

Objeto de la invención:

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de un cáncer pancreático y/o metástasis pancreáticas en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento:

- determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- comparar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 con un valor umbral predeterminado,

en el que un nivel de expresión elevado del gen CXCL4L1 en comparación con dicho valor umbral es indicativo de cáncer pancreático.

La invención también se refiere a un procedimiento de estadificación de un cáncer pancreático en un paciente que tiene cáncer pancreático que comprende determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que el nivel de expresión del gen CXCL4L1 aumenta con el grado histológico.

La invención también se refiere al uso de CXCL4L1 como biomarcador de cáncer pancreático en un paciente.

La invención también se refiere a una molécula de unión específica a CXCL4L1 conjugada con un agente antineoplásico tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático y/o la prevención de metástasis pancreáticas, en la que dicha molécula de unión específica a CXCL4L1 es un anticuerpo anti-CXCL4L1 o un aptámero.

Los inventores hicieron la observación de que CXCL4L1 puede usarse para una detección temprana y precisa de cáncer pancreático, además de una correlación entre el nivel de expresión del gen CXCL4L1 y la gravedad del grado de tumor.

Definiciones:

El término "CXCL4L1", como se usa en el presente documento, pretende englobar todos los sinónimos que incluyen, pero no se limitan a, PFAV1, PF4var1, PF4ALT y SCYB4V1. Así, el término incluye CXCL4L1 que se produce naturalmente y variantes y formas modificadas de la misma. El término "proteína CXCL4L1 madura" se refiere a la proteína CXCL4L1 madura de 70 aminoácidos que puede obtenerse por procesamiento de un propéptido más largo (proporcionado en la base de datos GenPept bajo el número de acceso NP_002611). Una secuencia de nucleótidos nativa a modo de ejemplo que codifica CXCL4L1 se proporciona en la base de datos GenBank bajo el número de acceso NM_002620. Debe observarse adicionalmente que el término "CXCL4L1" también incluye variantes naturales de primate de la proteína CXCL4. A modo de ejemplo, proteínas CXCL4L1 de primate se proporcionan bajo el número de acceso de GenBank XM_001102971-1 (mono rhesus) y XP_001156146.1 (chimpancé).

Como se usa en el presente documento, el término "molécula de unión específica a CXCL4L1" pretende referirse a una molécula de tamaño y complejidad suficientes de manera que sea capaz de unirse selectivamente a CXCL4L1.

El término "anticuerpo anti-CXCL4L1" se refiere a un anticuerpo o un fragmento del mismo que reconoce selectivamente CXCL4L1.

Como se usa en el presente documento, el término "cáncer pancreático" se refiere a carcinomas pancreáticos, en particular adenocarcinomas pancreáticos (por ejemplo, adenocarcinomas ductales pancreáticos), además de otros tumores del páncreas exocrino (por ejemplo, cistoadenomas serosos), cánceres de células acinares y tumores neuroendocrinos pancreáticos (tales como insulinosomas).

El término "metástasis pancreáticas" tiene su significado general en la materia y se refiere a la diseminación de un tumor del páncreas a otro órgano o parte no adyacente.

Ejemplos de metástasis pancreáticas que expresan o expresan en exceso CXCL4L1 y que podrían tratarse con inhibidores de CXCL4L1 incluyen, pero no se limitan a, cánceres metastásicos de colon, pulmón, páncreas, esófago y próstata, melanomas, hepatocarcinomas, además de metástasis a ganglios o al ganglio linfático.

Como se usa en el presente documento, el término "valor predeterminado" se refiere a la cantidad de CXCL4L1 en muestras biológicas obtenidas de la población general o de una población seleccionada de sujetos. Por ejemplo, la

población seleccionada puede comprender sujetos aparentemente sanos, tales como individuos que previamente no han tenido ningún signo o síntoma que indique la presencia de cáncer pancreático. En otro ejemplo, el valor predeterminado puede ser la cantidad de CXCL4L1 obtenida de sujetos que tienen un cáncer pancreático establecido. El valor predeterminado puede ser un valor umbral o un intervalo. El valor predeterminado puede establecerse basándose en mediciones comparativas entre sujetos aparentemente sanos y sujetos con cáncer pancreático establecido.

El término “paciente” o “sujeto”, como se usa en el presente documento, indica un mono, un chimpancé y un ser humano. Preferentemente, un paciente según la invención es un ser humano.

El término “sujetos sanos”, como se usa en el presente documento, se refiere a una población de sujetos que no padece ninguna afección conocida, y en particular, que no padece cáncer pancreático.

El término “muestra biológica” significa cualquier muestra biológica derivada de un paciente. Ejemplos de tales muestras incluyen líquidos, tejidos, muestras de células, órganos, biopsias, etc. Muestras biológicas preferidas son una muestra tumoral o biopsia pancreática. Muestras biológicas preferidas son sangre completa, suero o plasma.

El término “biomarcador”, como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a una molécula, es decir, un gen (o ácido nucleico que codifica dicho gen), proteína, cuya expresión en una muestra biológica de un paciente puede detectarse mediante procedimientos convencionales en la materia (además de los desvelados en el presente documento), y es predictiva o indica una afección del paciente del que se obtuvo.

Procedimientos de diagnóstico y kits:

La presente invención se refiere a un procedimiento de detección de cáncer pancreático y/o metástasis pancreáticas en un paciente que comprende:

- determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- comparar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 con un valor umbral predeterminado,

en el que un nivel de expresión elevado del gen CXCL4L1 en comparación con dicho valor umbral es indicativo de cáncer pancreático.

La presente invención también se refiere a un procedimiento de estadificación de un cáncer pancreático en un paciente que tiene cáncer pancreático que comprende determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que el nivel de expresión del gen CXCL4L1 aumenta con el grado histológico.

Se desvela un procedimiento de monitorización de un tratamiento de un paciente afectado por un cáncer pancreático y/o metástasis pancreáticas con un antagonista de CXCL4L1 que comprende determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, y opcionalmente, comparar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 con un valor predeterminado que representa una fase predeterminada del cáncer pancreático, el nivel de expresión del gen CXCL4L1 con respecto al valor predeterminado que indica la evolución del cáncer pancreático y, por tanto, el grado de eficacia del tratamiento.

En una realización particular, el paciente está afectado con un carcinoma pancreático tal como un adenocarcinoma ductal pancreático.

En una realización, la determinación del nivel de expresión del gen CXCL4L1 según procedimientos de la invención se realiza determinando la cantidad de ARNm que codifica CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.

La muestra de tumor pancreático es la muestra preferida. Los ARN totales pueden extraerse fácilmente de la misma. La célula o muestra de tejido puede tratarse antes de su uso, por ejemplo, con el fin de poner a disposición los ácidos nucleicos. Técnicas de lisis de células o proteínas, concentración o dilución de ácidos nucleicos, son conocidas por el experto.

La determinación del nivel de expresión de un gen puede realizarse mediante una variedad de técnicas. Generalmente, el nivel de expresión como se ha determinado es un nivel de expresión relativo.

Más preferentemente, la determinación comprende poner en contacto la muestra con reactivos selectivos tales como sondas, cebadores o ligandos, y así detectar la presencia, o medir la cantidad de ácidos nucleicos de interés originalmente en la muestra.

En una realización preferida, el nivel de expresión puede determinarse determinando la cantidad de ARNm.

- Los procedimientos de determinación de la cantidad de ARNm son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico contenido en las muestras (por ejemplo, biopsia preparada del paciente) se extrae primero según procedimientos convencionales, por ejemplo, usando enzimas líticas o disoluciones químicas o se extrae por resinas de unión a ácido nucleico siguiendo las instrucciones del fabricante. Entonces, el ARNm extraído se detecta por hibridación (por ejemplo, análisis de transferencia Northern) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). En una realización preferida, el nivel de expresión del gen CXCL4L1 se determina por RT-PCR, preferentemente RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa, incluso más preferentemente RT-PCR cuantitativa o semi-cuantitativa en tiempo real.
- Otros procedimientos de amplificación incluyen reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por la transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA) y amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA).
- Los ácidos nucleicos que tienen al menos 10 nucleótidos y que presentan complementariedad u homología de secuencias con el ARNm de interés en el presente documento encuentran utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Se entiende que tales ácidos nucleicos no necesitan ser idénticos, pero normalmente son al menos aproximadamente el 80 % idénticos a la región homóloga de tamaño comparable, más preferentemente el 85 % idénticas, e incluso más preferentemente el 90-95 % idénticas. En ciertas realizaciones será ventajoso usar ácidos nucleicos en combinación con medios apropiados, tales como una marca detectable, para detectar la hibridación. Se conoce una amplia variedad de indicadores apropiados en la técnica que incluyen ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos (por ejemplo, avidina/biotina).
- Las sondas normalmente comprenden ácidos nucleicos monocatenarios de entre 10 y 1000 nucleótidos de longitud, por ejemplo, de entre 10 y 800, más preferentemente de entre 15 y 700, normalmente de entre 20 y 500. Los cebadores normalmente son ácidos nucleicos monocatenarios más cortos, de entre 10 y 25 nucleótidos en longitud, diseñados para coincidir perfectamente o casi perfectamente con un ácido nucleico de interés, para amplificarse. Las sondas y cebadores son "específicos" para los ácidos nucleicos con los que se hibridan, es decir, preferentemente se hibridan bajo condiciones de hibridación de alta rigurosidad (correspondientes a la mayor temperatura de fusión T_m , por ejemplo, 50 % de formamida, 5x o 6x SCC. SCC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M).
- Los cebadores o sondas de ácido nucleico usados en el procedimiento de amplificación y detección anterior pueden ensamblarse como un kit. Un kit tal incluye cebadores consenso y sondas moleculares. Un kit preferido también incluye los componentes necesarios para determinar si se ha producido la amplificación. El kit también puede incluir, por ejemplo, tampones de PCR y enzimas; secuencias de control positivo, cebadores de control de la reacción; e instrucciones para amplificar y detectar las secuencias específicas.
- En otra realización, la determinación del nivel de expresión del gen CXCL4L1 según procedimientos de la invención se realiza midiendo la concentración de la proteína CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.
- En una realización preferida, la concentración de la proteína CXCL4L1 se mide en una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero obtenida de dicho paciente. Una vez se prepara la muestra biológica del paciente, la concentración de CXCL4L1 puede medirse por cualquier procedimiento conocido en la materia.
- En una realización particular, tales procedimientos comprenden poner en contacto la muestra biológica con un componente de unión que puede interaccionar selectivamente con CXCL4L1 presente en la muestra biológica. El componente de unión puede ser un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. En otra realización, el componente de unión puede ser un aptámero.
- Los anticuerpos policlonales de la invención o un fragmento de los mismos pueden producirse según procedimientos conocidos administrando el antígeno o epítipo apropiado a un animal huésped seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas y ratones, entre otros. Diversos adyuvantes conocidos en la técnica pueden usarse para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque anticuerpos útiles en la práctica de la invención pueden ser anticuerpos policlonales, se prefieren anticuerpos monoclonales.
- Los anticuerpos monoclonales de la invención o un fragmento de los mismos pueden prepararse y aislarse usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el aislamiento incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas originalmente descrita por Kohler y Milstein (1975); la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Cote y col., 1983); y la técnica de hibridomas del VEB (Cole y col. 1985). Por ejemplo, el documento TW 526269 desvela anticuerpos monoclonales contra CXCL4L1.
- Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.946.778) puede adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios anti-CXCL4L1. Anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen fragmentos de anti-CXCL4L1 que incluyen, pero no se limitan a, fragmentos $F(ab')_2$, que pueden generarse por digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo intacto, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes de disulfuro de los

fragmentos F(ab')₂. Alternativamente, las bibliotecas de expresión de Fab y/o scFv pueden construirse para permitir la rápida identificación de fragmentos que tienen la especificidad deseada por CXCL4L1. Por ejemplo, puede usarse expresión en fago de anticuerpos. En un procedimiento tal, fragmentos Fv monocatenarios (scFv) o Fab se expresan sobre la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo, M13. Brevemente, las células del bazo de un huésped adecuado, por ejemplo, ratón, que se ha inmunizado con una proteína se eliminan. Las regiones codificantes de las cadenas VL y VH se obtienen de aquellas células que están produciendo el anticuerpo deseado contra la proteína. Entonces, estas regiones codificantes se fusionan con un extremo de una secuencia de fago. Una vez el fago se inserta en un vehículo adecuado, por ejemplo, bacteria, el fago expresa el fragmento de anticuerpo. La expresión en fago de anticuerpos también puede proporcionarse por procedimientos combinatorios conocidos para aquellos expertos en la materia. Los fragmentos de anticuerpos expresados por un fago pueden entonces usarse como parte de un inmunoensayo.

En otra realización, el componente de unión puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad para reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con alta afinidad y especificidad. Tales ligandos pueden aislarse mediante Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk C. 1997. La biblioteca de secuencias aleatorias es obtenible por síntesis química combinatoria de ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente químicamente modificado, de una secuencia única. Posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena S.D., 1999. Los aptámeros de péptido consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente limitadas expresadas por una proteína de plataforma, tal como tiorredoxina A de *E. coli*, que se seleccionan de bibliotecas combinatorias por dos procedimientos híbridos (Colas y col., 1996).

Los componentes de unión de la invención tales como anticuerpos o aptámeros pueden marcarse con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una enzima capaz de producir un producto coloreado, una molécula radiactiva u cualquier otra marca conocida en la técnica. En la técnica se conocen marcas que generalmente proporcionan (tanto directamente como indirectamente) una señal.

Como se usa en el presente documento, el término "marcado", con respecto al anticuerpo, pretende englobar el marcado directo del anticuerpo o aptámero acoplado (es decir, enlazando físicamente) una sustancia detectable, tal como un agente radiactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)), al anticuerpo o aptámero, además del marcado indirecto de la sonda o anticuerpo (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, HRP) por reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la invención puede marcarse con una molécula radiactiva mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, moléculas radiactivas incluyen, pero no se limitan a, átomo radiactivo para estudios escintigráficos tales como I123, I124, In111, Re186, Re188.

Los ensayos anteriormente mencionados generalmente implican la unión del componente de unión (es decir, anticuerpo o aptámero) en un soporte sólido. Soportes sólidos que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en membrana o forma de pocillo de microtítulo); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, hojas o pocillos de microtítulo); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotizado; membranas de nailon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares.

Más particularmente, puede usarse un procedimiento de ELISA, en el que los pocillos de una placa de microtitulación se recubren con un conjunto de anticuerpos anti-CXCL4L1. Una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene CXCL4L1 se añade entonces a los pocillos recubiertos. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de anticuerpo-antígeno, la(s) placa(s) puede(n) lavarse para eliminar restos sin unir y se añade una molécula de unión secundaria detectablemente marcada. La molécula de unión secundaria se deja reaccionar con proteína marcadora de muestra capturada, la placa se lava y la presencia de la molécula de unión secundaria se detecta usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Un procedimiento alternativo de ELISA implica la adición de una muestra biológica que contiene o que se sospecha que contiene CXCL4L1 a los pocillos recubiertos, además de una cantidad conocida de CXCL4L1 marcada. Después de un periodo de incubación suficiente para permitir la formación de complejos de anticuerpo-antígeno y la competición entre moléculas que se producen naturalmente marcadas y no marcadas, la(s) placa(s) puede(n) lavarse para eliminar restos sin unir. La intensidad de la marca obtenida por la unión de, por ejemplo, CXCL4L1 conjugado con HRP se detecta usando procedimientos muy conocidos en la técnica. En esta configuración, que es más sensible que el ELISA común, la disminución de la marca es en relación con la cantidad de moléculas naturales presentes en la muestra. En el caso de CXCL4L1 conjugada con HRP, la adición de un sustrato de HRP permitirá la detección. Comúnmente se usa detección de color, pero necesita tiempo de incubación, mientras que sustancias derivadas de luminol alternativas permiten una detección directa (sin tiempo de incubación) y altamente sensible.

La concentración de CXCL4L1 puede medirse usando técnicas inmunodiagnósticas convencionales, que incluyen inmunoensayos tales como ensayos de competición, reacción directa o tipo sándwich. Tales ensayos incluyen, pero no se limitan a, pruebas de aglutinación; inmunoensayos marcados y mediados por enzima, tales como ELISA;

ensayos tipo biotina/avidina; radioinmunoensayos; inmunoelectroforesis; inmunoprecipitación.

La medición de la concentración de CXCL4L1 (con o sin procedimientos basados en inmunoensayo) también puede incluir la separación de los compuestos: HPLC basada en hidrofobia; cromatografía de exclusión por tamaño basada en tamaño; y afinidad en fase sólida basada en la afinidad del compuesto por la fase sólida particular que se usa. Una vez separada, la CXCL4L1 puede identificarse basándose en el "perfil de separación" conocido, por ejemplo, tiempo de retención, para ese compuesto y se mide usando técnicas convencionales.

Alternativamente, los compuestos separados pueden detectarse y medirse por, por ejemplo, un espectrómetro de masas.

En una realización, el procedimiento de la invención puede comprender adicionalmente una etapa de comparar la concentración de CXCL4L1 con un valor umbral predeterminado. Dicha comparación es indicativa de cáncer pancreático. CXCL4L1 aumenta durante el desarrollo del cáncer pancreático y en particular durante la fase temprana del desarrollo del cáncer pancreático.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para detectar cáncer pancreático y/o metástasis pancreáticas en un paciente, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- (i) medir la concentración de CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
- (ii) comparar la concentración de CXCL4L1 medida en la etapa (i) con un valor de referencia derivado de la concentración de CXCL4L1 en una muestra biológica de un sujeto que no padece cáncer pancreático, en el que un nivel elevado de CXCL4L1 en la muestra biológica obtenida de dicho paciente con respecto a dicho valor de referencia indica que el paciente padece un cáncer pancreático.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de CXCL4L1 como biomarcador de cáncer pancreático, en particular adenocarcinoma pancreático, en un paciente.

Se desvela el uso de un kit que detecta CXCL4L1 para diagnosticar cáncer pancreático en un paciente.

Procedimientos terapéuticos de la invención:

Otro aspecto de la invención se refiere a procedimientos y composiciones para el tratamiento de cáncer pancreático y/o la prevención de metástasis pancreáticas.

Por consiguiente, la invención se refiere a una molécula de unión específica a CXCL4L1 que puede usarse como agente dirigido a tumor para administrar radioisótopos, quimioterapia u otros agentes citotóxicos (es decir, TNFalfa) al tumor pancreático.

En una realización particular, la molécula de unión específica a CXCL4L1 es un aptámero como se ha descrito anteriormente.

En otra realización particular, la molécula de unión específica a CXCL4L1 es un anticuerpo o y fragmento de anticuerpo como se ha descrito anteriormente.

Según la invención, dicha molécula de unión específica a CXCL4L1 está conjugada con un agente antineoplásico tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente célula de cáncer pancreático, tanto *in vitro* como *in vivo*. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular, tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Bloqueantes de la fase M clásicos incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de la topoisomerasa II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato y 5-fluorouracilo. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos antineoplásicos ambos derivados del tejo. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos de dímeros de tubulina y estabilizan microtúbulos, previniendo la despolimerización, que produce la inhibición de la mitosis en células.

El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y

fragmentos de las mismas tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, que incluyen fragmentos y/o variantes de los mismos, por ejemplo, gelonina, ricina, saporina, y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos desvelados a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida produce la destrucción de células tumorales.

La conjugación de la molécula de unión específica a CXCL4L1 de la invención con agentes citotóxicos o agentes inhibidores del crecimiento puede hacerse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales que incluyen, pero no se limitan a, (2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), (N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluileno-2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col. (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-metildietilenti-aminapentaacético marcado con carbono (MX-DTPA) es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo (documento WO 94/11026).

El ligador puede ser un "ligador escindible" que facilita la liberación del agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento en la célula. Por ejemplo, puede usarse un ligador lábil a ácido, ligador sensible a peptidasa, ligador fotolábil, ligador de dimetilo o ligador que contiene disulfuro (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.208.020).

Alternativamente, una proteína de fusión que comprende la molécula de unión específica a CXCL4L1 de la invención (por ejemplo, anticuerpo) y agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento puede prepararse por técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado tanto adyacentes entre sí como separadas por una región que codifica un péptido ligador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

La molécula de unión específica a CXCL4L1 puede conjugarse con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco antineoplásico activo (véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278). La enzima incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que la convierta en su forma citotóxica más activa. Enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como O-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; P-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con P-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de enlace heterobifuncionales tratados anteriormente.

La invención también se refiere a un procedimiento de tratamiento de cáncer pancreático y/o prevención de metástasis pancreáticas que comprende la etapa de administrar a un sujeto en necesidad del mismo una molécula de unión específica a CXCL4L1 como se ha descrito anteriormente.

Se desvela una molécula de unión específica a CXCL4L1 como se ha descrito anteriormente para tratar un paciente afectado con un cáncer pancreático, siendo dicho paciente diagnosticado como afectado por un cáncer pancreático mediante el procedimiento que se ha descrito anteriormente.

Se desvela una molécula de unión específica a CXCL4L1 para tratar un paciente afectado con un cáncer pancreático, en el que dicho paciente tiene un nivel de expresión del gen CXCL4L1 superior a un valor predeterminado obtenido de la población general o de sujetos sanos.

La molécula de unión específica a CXCL4L1 como se ha descrito anteriormente puede administrarse en forma de una composición farmacéutica.

Preferentemente, dicho inhibidor se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por una "cantidad terapéuticamente eficaz" se indica una cantidad suficiente de dicha molécula de unión específica a CXCL4L1 para tratar cáncer pancreático y/o para prevenir metástasis pancreáticas a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico.

Se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. El nivel de dosis terapéuticamente eficaz específica para cualquier paciente particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada, la edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; el tiempo de administración, vía de administración y tasa de secreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares muy conocidos en las ciencias médicas. Por ejemplo, está perfectamente dentro de la experiencia de la materia empezar las dosis del compuesto a niveles menores a aquellos requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. Sin embargo, la dosificación diaria de los productos puede variarse en un amplio intervalo de 0,01 a 1.000 mg por adulto por día. Preferentemente, las composiciones contienen 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100, 250 y 500 mg del principio activo para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que va a tratarse. Un medicamento normalmente contiene de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg del principio activo, preferentemente de 1 mg a aproximadamente 100 mg del principio activo. Una cantidad eficaz del fármaco es generalmente suministrada a un nivel de dosificación de 0,0002 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, especialmente de aproximadamente 0,001 mg/kg a 7 mg/kg de peso corporal por día.

Descripción de las figuras

La invención se ilustrará adicionalmente en vista de las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1: Árbol filogenético de CXCL4 o CXCL4L1. Como se observa en la figura, la divergencia se produjo muy tarde en la evolución. CXCL4 de chimpancé, mono y ser humano o CXCL4L1 de chimpancé, mono y ser humano se agrupan juntos respectivamente.

Figura 2: Expresión de CXCL4 y CXCL4L1 en diferentes tejidos humanos. Las expresiones génicas se analizaron por PCR en tiempo real semi-cuantitativa con cebadores específicos para cada gen y en comparación con la expresión del gen de mantenimiento S16.

Figura 3: Análisis de expresión de ARNm de CXCL4 y CXCL4L1 *in vitro* e *in vivo* en el modelo de PDAC-CAM. **A.** Análisis de expresión de PCR en tiempo real en células BxPC3 *in vitro* y en el modelo PDAC-CAM en T1 y T6, en comparación con la expresión de S16. Al nivel relativo de ARNm de CXCL4L1 en T1 se le ha dado arbitrariamente el valor 1. **B.** Hibridación *in situ* sobre secciones incorporadas en parafina de muestras de T6 PDAC-CAM con ribosondas de CXCL4L1 o CXCL4. Los nodos de tumor están delimitados por líneas de puntos (asterisco*: nodo positivo) y la superficie de CAM por líneas continuas. Barras de escala 50 μ m.

Figura 4: Expresión del análisis de proteínas de CXCL4L1 en el modelo PDAC-CAM. **A-B.** Inmunomarcado sobre secciones incorporadas en parafina de T6 con el anticuerpo pan CXCL4L1/CXCL4 o el anticuerpo para CXCL4 específico, respectivamente, que muestran nodos de tumor positivos (asterisco*). Barras de escala 50 μ m. **C.** Extractos de tumor de CAM se incubaron con anticuerpo anti-CXCL4/CXCL4L1. Entonces, los inmunoprecipitados se ejecutaron sobre 10 % de gel de SDS-poliacrilamida y se realizó transferencia Western después de la transferencia usando anticuerpo anti-CXCL4L1 específico. El gel es representativo de dos experimentos independientes.

Figura 5: Análisis de expresión de CXCL4L1 en un modelo de ratón de xenoinjerto de adenocarcinoma pancreático. Inmunomarcado sobre secciones incorporadas en parafina de tumores primarios subcutáneos (**A-B**) y micrometástasis de pulmón (**C-D**) con el anticuerpo pan CXCL4L1/CXCL4 (**A-C**) o el anticuerpo para CXCL4 específico (**B-D**). Los insertos presentan vistas globales de las micrometástasis respectivas. Barras de escala 50 μ m.

Figura 6: Análisis de expresión de CXCL4L1 en tejidos pancreáticos humanos. **A.** Expresión relativa de CXCL4L1 en muestras de adenocarcinoma pancreático de 24 pacientes humanos analizados por PCR en tiempo real. La expresión de CXCL4L1 en tumores humanos se facilita en comparación con la expresión en páncreas normal. **B-C.** El inmunomarcado se hizo usando tanto el CXCL4/CXCL4L1 policlonal (**B**) como Mabv1 que reconoce solo CXCL4L1 (**C**). **B.** CXCL4/CXCL4L1 **B1-B2**, Control; Panel **B3-B7**, adenocarcinoma pancreático en diferentes fases; **B8**, metástasis a ganglios. **C.** **C1-C3** tinción de fondo débil en páncreas normal, C4-9 fuerte inmunoreactividad en carcinoma pancreático, C10, positividad en células invasoras, C11 células invasoras en tejido adiposo, C12 metástasis a ganglios linfáticos positivas.

Figura 7: Estudios funcionales de CXCL4L1 sobre células endoteliales.

A-B. Actividad de proteínas GST-CXCL4 (GST-PF4) y GST-CXCL4L1 (GST-PF4v1) recombinantes sobre la proliferación, migración e invasión de células endoteliales. Células BAEC y HUVEC se cultivaron en presencia de FGF2 (10 ng/ml) y diferentes concentraciones de proteínas recombinantes. **A.** Después de un periodo de estimulación de 48 h, la proliferación de células se determinó en comparación con células

únicamente tratadas con FGF2. CI_{50} : concentración de proteína necesaria para inducir el 50 % de la inhibición de la proliferación celular; $Imáx$: concentración de proteína necesaria para la inhibición total de la proliferación celular. **B.** Después de un periodo de estimulación de 18 h, la migración de BAEC se determinó por el porcentaje de superficie cubierta de la herida inicial. Los resultados son promedio \pm EEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. **C.** Efectos de CXCL4L1 y CXCL4 sobre la invasión inducida por FGF-2 de HUVEC. Izquierda, imágenes de células invasoras; derecha, cuantificación.

Figura 8: Efecto de CXCL4 y CXCL4L1 sobre células de carcinoma pancreático (BxPC3)

Efecto de CXCL4L1 (PF4v1) y CXCL4 (PF4) sobre la proliferación e invasión. A, efecto sobre la proliferación de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). B, C Efecto sobre la invasión de HUVEC. B, Imágenes de células invasoras, C, Cuantificación de la invasión.

Descripción detallada de la invención

Ejemplo:

Material y procedimientos

Cultivo celular y modelo de PDAC-CAM

Líneas de células de cáncer pancreático humano BxPC3 y células endoteliales aórticas bovinas (BAEC) se cultivaron en DMEM 1 g/l de glucosa (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) complementado con 10 % de suero bovino fetal, antibióticos (penicilina/estreptomycin) y L-glutamina. Células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC, Lonza, Levallois-Perret, Francia) se mantuvieron en EBM-2 (Lonza) complementado con EGM-2 SingleQuots (Lonza), que contenía 2 % de SBF. Los cultivos se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂. Las células tumorales fueron un amable regalo del Dr. C. Susini (INSERM U531, Toulouse, Francia). Huevos de pollo fecundados (*Gallus gallus*) (EARL Morizeau, Dangers, Francia) se manipularon como se ha descrito previamente (Hagedorn y col., 2005). En el día embrionario 10 (E10), 4 millones de células BxPC3 diluidas en medio sin suero en un volumen final de 40 μ l se depositaron como una delgada capa sobre la superficie de CAM intacta.

Modelo de xenoinjerto de ratón

Ratones RAG- γ/c hembra se alojaron y se trataron en el animalario de la Universidad de Burdeos 1 ("Animalerie Mutualisée Bordeaux I"). Todos los procedimientos animales se hicieron según pautas institucionales. Ratones de veinte semanas de edad (n=26) se anestesiaron con inyección intraperitoneal de ketamina (150 mg/kg) y xilazina (15 mg/kg) y se xenoinjertaron con 3,10⁶ células BxPC3 en 100 μ l de medio sin suero por inyección subcutánea.

Extracción de ARN y transcripción inversa

ARN total de células o tejidos congelados criogénicamente se extrajeron usando el mini kit de RNeasy (Qiagen, Courtaboeuf, Francia). La calidad y cantidad del ARN se evaluaron por electroforesis en gel de agarosa y medición de la densidad óptica. El ADNc de la primera cadena se preparó a partir de 1 μ g de ARN total con el kit de transcripción inversa Quantitect (Qiagen).

PCR en tiempo real

Se llevó a cabo PCR en tiempo real en un ciclador térmico Mx3000P (Stratagene, La Jolla, CA) usando el colorante SYBR Green (ABgene, Courtaboeuf, Francia). Se diseñaron cebadores específicos para ser humano y se evaluaron para la eficiencia de amplificación usando ARN de referencia humano universal (Stratagene). Solo se usaron pares de cebadores con eficacia de amplificación entre el 90 y el 110 %. La especificidad de PCR se verificó por el análisis de curvas de disociación y electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación. Todas las muestras se probaron en un mínimo de tres experimentos independientes.

Hibridación *in situ*

Se sintetizaron ribosondas humanas DIG CXCL4 y CXCL4L1 según las instrucciones del fabricante (kit de marcado de ARN de Roche (SP6/T7) - Roche). Brevemente, vectores pCR2.1 TOPO CXCL4_UTRs y pCR2.1 TOPO CXCL4L1_UTRs se linealizaron por digestión con enzimas XhoI (para sondas codificantes) o BamHI (para sondas no codificantes). Después de la transcripción, los moldes de ADN se digirieron (DNasa I - Invitrogen) y luego las ribosondas se precipitaron por cloruro de litio.

CAM con nódulos de BxPC3 se fijaron durante la noche con 4 % de PAF a 4 °C. Después de lavar en PBS, los tejidos se deshidrataron, luego se incorporaron en parafina. Antes de la hibridación, las secciones de tejido se rehidrataron, se permeabilizaron por proteinasa K y se fijaron de nuevo con 4 % de PAF. Las secciones de CAM incorporadas en parafina se hibridaron durante la noche a 70 °C con sondas de CXCL4 o CXCL4L1. Para control negativo se realizó la hibridación con sondas codificantes. Las secciones de tejido se incubaron en suero de oveja,

se lavaron y se incubaron con anticuerpo de oveja anti-DIG.

Histología, inmunohistoquímica

- 5 Tejidos incorporados en parafina se cortaron en secciones de micrótomos de 7 μm de espesor y se tiñeron con hematoxilina-eosina para análisis histológicos, localización de metástasis y selección de las áreas de tumor más representativas. Los anticuerpos primarios usados fueron anticuerpo monoclonal de cabra anti-CXCL4 humana (PF4 - AF-795, R&D Systems - Mineápolis) y de ratón para CXCL4L1 (MabV1, clon 9E11-2D5-2G1). La producción y caracterización de este anticuerpo se informará en cualquier parte (**Dubrac y col., manuscrito en preparación**).
- 10 Anticuerpos secundarios correspondientes fueron anticuerpos acoplados a HRP anti-cabra o anti-ratón (Dakocytomation). La obtención de imágenes se llevó a cabo usando un microscopio Nikon DXM Eclipse E600.

Ensayos de proliferación celular y muerte celular

- 15 La viabilidad celular se evaluó por el ensayo de WST-1 (Roche, Neuilly sur Seine Cedex, Francia). La abundancia relativa de la apoptosis se midió por la actividad de caspasa 3/7, según instrucciones del fabricante (kit de ensayo homogéneo Apo-one, Promega, Charbonnières, Francia). En ambos casos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 (HUVEC) o 3×10^3 (BxPC3) células/pocillo y se dejó que se adhirieran durante la noche. El medio completo se sustituyó con medio sin suero con o sin gemcitabina (Laboratoire Lilly, Suresnes, Francia) y/o CXCL4L1 durante 24 (HUVEC) o 48 (BxPC3) horas. Todos los ensayos se realizaron en pocillos por triplicado y cada experimento se repitió tres veces.
- 20

Ensayos de migración e invasión

- 25 Los ensayos de migración e invasión celular se llevaron a cabo usando filtro de membrana de Transwell con 8 μm de tamaño de poro (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, Francia) dispuesto en placas de cultivo de 24 pocillos. La superficie superior de la membrana de Transwell se recubrió o no con 100 $\mu\text{g/ml}$ de matriz Matrigel reducida con factor de crecimiento (BD Biosciences). Entonces, 1×10^5 células en medio sin suero se añadieron a cada cámara de Transwell y se dejó que migraran a la parte inferior de la cámara superior 6 h para las pruebas de migración y 24 h para las pruebas de invasión a 37 °C con medio sin suero, 0,5% de SBF en la cámara inferior como quimioatrayente. Las células se fijaron 10 minutos con 30 % de metanol, 10 % de ácido acético y se colorearon 3 minutos con 0,1 % de azul de Coomassie, 30 % de metanol, 40 % de ácido acético. Las células sobre la superficie superior de la membrana se eliminaron limpiando con un hisopo de algodón.
- 30

35 Análisis filogenético

- Se realizó una búsqueda de péptidos coincidentes con CXCL4 (PF4) con BLAST por comparación con la base de datos Refseq de proteínas y se retiraron las accesiones de péptido. Las secuencias seleccionadas designan las secuencias que fueron satisfactoriamente recíprocas por BLAST contra ser humano. Se enumeraron otras
- 40 secuencias por interés. Se ejecutó un programa ClustalW en las 12 secuencias que se encontraron que representaban CXCL4 (PF4) y CXCL4L1 (PF4V1) en todas las especies.

- Se construyó el árbol filogenético usando el procedimiento de unión de vecinos usando 1000 secuencias iniciales de instrucciones para encontrar el mejor árbol. Las posiciones con huecos se excluyeron del análisis y el alineamiento se corrigió para múltiples sustituciones.
- 45

Muestras de tumores humanos

- Se proporcionaron muestras de adenocarcinoma humano por el Prof. Martin Schilling (Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Homburg, Alemania). Se obtuvieron tejidos tumorales frescos durante la cirugía y directamente se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido. Los pacientes dieron sus consentimientos antes del análisis del tejido según las pautas clínicas.
- 50

Resultados

55 Análisis filogenético de CXCL4L1 y CXCL4

- CXCL4L1 y CXCL4 son altamente homólogos. Para analizar la expresión de especies de CXCL4L1 en comparación con CXCL4, los presentes inventores buscaron péptidos que coincidieran con CXCL4/CXCL4L1 con BLAST por comparación con la base de datos Refseq de proteínas. CXCL4L1 solo se expresa en ser humano, mono y chimpancé. Es de observar que el pollo no expresa ni CXCL4L1 ni CXCL4.
- 60

- Los presentes inventores realizaron a continuación un análisis filogenético usando el programa ClustalW en las 12 secuencias que representan CXCL4 y CXCL4L1 (en todas las especies) y construyeron un árbol filogenético usando el procedimiento de unión de vecinos con 1000 secuencias iniciales de instrucciones para encontrar el mejor árbol (Figura 1). Las posiciones con huecos se excluyeron del análisis y el alineamiento se corrigió para múltiples
- 65

sustituciones. Como se observa del análisis, CXCL4L1 y CXCL4 divergieron muy tarde en la evolución al nivel de un ancestro común de monos, chimpancés y seres humanos.

Expresión de CXCL4L1 o CXCL4 en tejidos humanos

La PCR cuantitativa en ARNm de varios tejidos humanos indica diferentes perfiles de expresión para CXCL4L1 y CXCL4 (Figura 2). Mientras que CXCL4L1 se expresa simplemente en el hígado fetal, el colon, y a cierto grado en el bazo, CXCL4 se expresa altamente en el bazo. Páncreas humano normal humano no expresa significativamente ni CXCL4L1 ni CXCL4.

Expresión de CXCL4L1 o CXCL4 en adenocarcinoma pancreático

El perfilado transcriptómico identifica CXCL4L1, pero no CXCL4, en el modelo PDAC-CAM: Se ha realizado análisis transcriptómico dual usando micromatrices Affymetrix humanas o Affymetrix de pollo entre el día 1 de tumor (T1) y el día 6 de tumor (T6) de implantación de células BxPC3 en la membrana corioalantoidea de pollo (correspondiente a E11 y E16 del desarrollo embrionario). Los presentes inventores demostraron claramente que CXCL4L1, pero no CXCL4, era altamente regulada por incremento en T6 en comparación con T1 (aumento de 14,6 veces). CXCL4L1 también se detectó solo en la matriz Affymetrix humana, pero no estuvo presente ortólogo de pollo cuando se usaron chips de pollo. Esto indicó que CXCL4L1 se induce en células tumorales durante el desarrollo tumoral *in vivo*.

Análisis de la expresión de CXCL4L1 o CXCL4 en el adenocarcinoma pancreático experimental: Para reforzar esta opinión, los presentes inventores realizaron primero PCR en tiempo real usando cebadores específicos para CXCL4L1 y CXCL4 para determinar la expresión específica en el modelo experimental de adenocarcinoma pancreático. Como se observa con el análisis transcriptómico, el análisis de PCRc reveló alta regulación por incremento en tumores T6 cuando se comparó con tumores T1 (9,65 veces). No se observó expresión en células BxPC3 en cultivo (Figura 3A).

Los presentes inventores investigaron entonces la expresión de CXCL4L1 por hibridación *in situ* en comparación con CXCL4 usando sondas específicas que reconocen una cualquiera de las quimiocinas (Figura 3B). La hibridación *in situ* demostró claramente que solo CXCL4L1, pero no CXCL4, se expresa en tumores T6.

Los presentes inventores investigaron a continuación la expresión de proteínas en sus muestras experimentales de tumor pancreático del modelo PDAC-CAM. La inmunolocalización de CXCL4L1 usando un anticuerpo policlonal o monoclonal específico que solo reconoce CXCL4 o CXCL4L1 humano muestra claramente inmunorreactividad significativa en tumores T6 (Figura 4A), pero no en células BxPC3 (datos no mostrados). Además, un anticuerpo anti-CXCL4L1 monoclonal específico (MABv1) detecta claramente CXCL4L1 en nódulos pancreáticos en CAM (Figura 4B).

Además, los presentes inventores detectaron inmunorreactividad significativa de 7 kDa en transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal o policlonal capaz de interactuar con tanto CXCL4 como CXCL4L1. Además, si se usa el anticuerpo anti-CXCL4L1 monoclonal específico (MABv1) se detectó inmunorreactividad de CXCL4L1 significativa (Figura 4C).

Tomados conjuntamente, estos datos indican que CXCL4L1, pero no CXCL4, se expresa altamente en exceso en tumores pancreáticos que se cultivan en la membrana corioalantoidea de pollo.

Análisis de la expresión en modelos de ratón de carcinoma pancreático: Para determinar que la regulación por incremento de CXCL4L1 no fue específica para el modelo de embrión de pollo, células BxPC3 se implantaron primero subcutáneamente en ratones RAG-c y el tumor primario o metástasis de pulmón se analizaron 10 semanas después de la implantación. Entonces, los tejidos se analizaron por PCRc o por inmunohistoquímica usando anticuerpos para CXCL4L1 o CXCL4 humana. El análisis por PCRc indica claramente que CXCL4L1, pero no CXCL4, se expresa en muestras tumorales. Como se observa en la Figura 5A, los presentes inventores realizaron a continuación inmunohistoquímica usando el anticuerpo pan CXCL4L1/CXCL4 que reconoce ambas formas. Los presentes inventores detectaron claramente inmunorreactividad positiva en ambos, el tumor primario y la metástasis de pulmón. Este anticuerpo es específico para CXCL4/CXCL4L1 humana, pero no reacciona de forma cruzada con CXCL4 de ratón. Los presentes inventores realizaron a continuación inmunohistoquímica usando su anticuerpo monoclonal específico para CXCL4L1. De nuevo, los presentes inventores detectaron claramente inmunorreactividad positiva en ambos, el tumor primario y la metástasis de pulmón (Figura 5B). Estos resultados indican que CXCL4L1 se expresa significativamente en este modelo de tumor tanto en el tumor primario como en la metástasis de pulmón.

Análisis de la expresión de CXCL4/CXCL4L1 en muestras de tumor humano: Para determinar la expresión de CXCL4L1 en tumores pancreáticos, se aisló ARN de 24 muestras de pacientes con adenocarcinoma y se realizó PCRc usando cebadores específicos en comparación con páncreas normales (Figura 6A). La expresión de ARNm de CXCL4L1 se detectó en todos los tumores pancreáticos probados y se expresó en exceso en 23/24 muestras (valor promedio +5,0) con diversos niveles de expresión en exceso. Los presentes inventores también realizaron

PCRc con cebadores específicos para CXCL4. No pudo detectarse expresión de CXCL4 en muestras tumorales de pacientes. Estos resultados indican la expresión en exceso heterogénea de CXCL4L1 en carcinoma pancreático humano que puede reflejar diferentes subgrupos de pacientes.

5 Los presentes inventores realizaron a continuación análisis inmunohistológico de muestras de tumor pancreático usando anticuerpos específicos para CXCL4/CXCL4L1 humana (Figura 6B y C). Los presentes inventores demostraron claramente inmunorreactividad en muestras de tumor pancreático con tanto el anticuerpo anti-CXCL4L1/CXCL4L1 policlonal (Figura 6B) como el anticuerpo monoclonal específico MABv1 (Figura 6C), pero no en páncreas humano normal. Sorprendentemente, la inmunorreactividad aumentó con la gravedad del grado de tumor, mostrándose la tinción más débil en tumores de grado uno y la tinción más fuerte en tumores de grado 3. Esto indica que CXCL4L1 se expresa altamente en exceso en adenocarcinoma pancreático y que la expresión aumenta con el grado histológico creciente.

15 **Estudios funcionales con CXCL4L1 o CXCL4 en carcinoma pancreático.** Las proteínas recombinantes CXCL4L1 y CXCL4 se purificaron en cantidades significativas como proteínas de fusión de GST. La eliminación de GST por escisión de proteasas no tuvo efecto significativo sobre la actividad biológica, haciendo innecesaria la escisión.

20 Para probar la actividad de CXCL4L1 en comparación con CXCL4, células BxPC3 o células HUVEC se estimularon con concentraciones crecientes de estas moléculas y se midió la proliferación. CXCL4L1 presentó un efecto mucho más fuerte sobre la proliferación de células endoteliales que CXCL4 (43 veces mayor) similar a como se informa en la bibliografía (Figura 7A). Sin embargo, no se observó efecto de ambas quimiocinas en células BxPC3 (Figura 8). Los presentes inventores investigaron adicionalmente el efecto de CXCL4L1 o CXCL4 sobre la migración e invasión usando el ensayo de migración de la cámara de Boyden. De nuevo, la migración e invasión de células endoteliales se inhibió significativamente, pero no la migración de células BxPC3 (Figura 7B, C; Figura 8 B,C).

25

Discusión

30 CXCL4L1 solo se expresa en ser humano, mono y chimpancé y diverge de CXCL4 muy tarde en la evolución. Varios tejidos humanos expresan CXCL4L1 y CXCL4, que incluyen intestino, hígado y bazo, pero el tejido pancreático normal muestra expresión débil o no muestra expresión de estas quimiocinas. Sin embargo, CXCL4L1, pero no CXCL4, se expresa significativamente en exceso en carcinoma pancreático y representa un biomarcador novedoso. Esto se basa en las siguientes observaciones:

35 (1) el análisis de transcriptomas combinado con PCRc o hibridación *in situ* indica que las células de adenocarcinoma pancreático humano cuando se implantaron en la membrana corioalantoidea de pollo expresan niveles significativos de ARNm de CXCL4L1, pero no de CXCL4;

40 (2) la inmunolocalización usando anticuerpos anti-CXCL4L1/CXCL4 humana o anti-CXCL4L1 monoclonales específicos (Mabv1) evidencia la fuerte inmunorreactividad en células tumorales cuando se implantan en la CAM de pollo;

(3) tumores pancreáticos primarios después de la implantación en ratones expresan ARNm de CXCL4L1 y tumor primario, además de células tumorales metastásicas, también presentan inmunorreactividad positiva;

45 (4) las muestras de adenocarcinoma pancreático de paciente humano solo expresan ARNm de CXCL4L1, pero no de CXCL4, y presentan fuerte inmunorreactividad positiva;

50 (5) células endoteliales, pero no células de adenocarcinoma pancreático, responden a CXCL4L1 exógena, que indica un modo de acción paracrino de CXCL4L1 en el desarrollo de tumores pancreáticos. Además, los resultados de los presentes inventores indican que la regulación por incremento de la expresión de CXCL4L1 es debida a una interacción tumor-huésped específica debido a que células de adenocarcinoma pancreático en cultivo dejan de expresar tanto CXCL4L1 como CXCL4.

55 CXCL4L1 es un quimiocina estrechamente homóloga a CXCL4 en la que solo se observan el 34 % de diferencias en el extremo amino que codifica la secuencia señal y el 4,3 % de diferencias en la secuencia restante. Se ha mostrado que CXCL4L1 purificada de plaquetas es al menos 50 veces más potente que CXCL4 sobre la migración celular (Stryuf y col. 2004). En nuestras manos, CXCL4L1 recombinante es 50 veces más potente que CXCL4 en inhibir la proliferación de células endoteliales, pero 1000 veces más potente que CXCL4 en inhibir la migración de células endoteliales. Además, la inhibición del desarrollo tumoral observada en células de pulmón y de carcinoma por melanoma se inhibe por CXCL4L1 (Stryuf y col., 2007). Además, se ha mostrado previamente que la secreción y procesamiento de CXCL4L1 y CXCL4 son diferentes (Lasagni y col., 2007). Mientras que CXCL4 se exporta de un modo regulado mediante la ruta regulada por PKC de gránulos de núcleo denso, CXCL4L1 no se regula mediante PKC y se secreta constitutivamente. Además, CXCL4L1 o CXCL4 no solo no se expresan en el linaje megacariocítico de plaquetas, sino también en células inflamatorias (linfocitos T, leucocitos, monocitos), células de músculo liso vasculares y coronarias, y células endoteliales (Lasagni y col., 2007). Estos resultados indican que CXCL4L1 puede tener funciones reguladoras en la angiogénesis.

65

En el laboratorio, los presentes inventores han desarrollado inicialmente un modelo de embrión de pollo para conseguir un mejor entendimiento en la invasión y angiogénesis de glioma (Hagedorn y col., 2005). Los presentes inventores han ahora expandido adicionalmente este modelo para adenocarcinoma ductal pancreático (modelo PDAC-CAM) y demostrado la significativa regulación por incremento de CXCL4L1, pero no CXCL4, en células de tumor pancreático cuando se implantan en la CAM. Sorprendentemente, no se encontró expresión de CXCL4L1 en células tumorales en cultivo. Debido a que se usaron cebadores específicos para CXCL4L1 humana y CXCL4L1 solo se expresa en células de origen humano, pero no en otras especies, estos resultados indican que esas células tumorales están regulando por incremento la expresión de CXCL4L1 cuando se disponen en un microentorno adecuado. Además, la hibridación *in situ* usando sondas específicas para CXCL4L1 o CXCL4 demostró una señal significativa en tumores cuando crecen en la CAM solo para CXCL4L1. Además, se detectó inmunorreactividad de CXCL4L1 en células tumorales cuando se implantan en la CAM, pero no cuando las células se cultivaron en cultivo. Estos resultados también cuestionan la validez de algunos estudios de perfilado molecular hechos en cultivo, debido a que moléculas de interés significativo pueden no detectarse bajo estas condiciones.

Los presentes inventores investigaron a continuación la expresión de CXCL4L1 usando ratones xenoinjertados con células de tumor pancreático. Tumores primarios subcutáneamente implantados expresaron ARNm de CXCL4L1, pero no ARNm de CXCL4. De nuevo se demostró alta inmunorreactividad usando anticuerpos anti-CXCL4L1/CXCL4 humana o CXCL4L1. Además, también se detectó inmunorreactividad significativa en metástasis de pulmón. Estos resultados indican claramente que la regulación por incremento no es específica para el microentorno del pollo, sino que también se detectan cuando las células se implantan en el tejido de ratón.

Los presentes inventores demostraron finalmente una significativa regulación por incremento de ARNm de CXCL4L1, pero no de ARNm de CXCL4, en muestras de pacientes humanos. La expresión de ARNm fue heterogénea y probablemente indica diversos grupos de pacientes con baja, intermedia o alta expresión de CXCL4L1. Un hallazgo interesante que observaron los presentes inventores fue que la inmunorreactividad para CXCL4L1 aumentó con el grado histológico. También se detectó inmunorreactividad significativa en lesiones metastásicas del ganglio linfático. Esto indica que CXCL4L1 constituye un biomarcador novedoso para carcinoma pancreático y predice la evolución de la enfermedad y respuesta al tratamiento.

Además, debido a un aumento local en la concentración de CXCL4L1 en el entorno del tumor, tumores pancreáticos pueden ser elegidos como diana por una molécula de unión específica a CXCL4L1 conjugada con un agente antineoplásico tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento para fines terapéuticos.

Referencias:

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002 Apr 19;296(5567):550-3.

Colas P, Cohen B, Jessen T, Grishina I, McCoy J, Brent R. (1996) Genetic selection of peptide aptamers that recognize and inhibit cyclin-dependent kinase 2. *Nature*, 380, 548-50.

Cote RJ, Morrissey DM, Houghton AN, Beattie EJ Jr, Oettgen HF, Old LJ. Generation of human monoclonal antibodies reactive with cellular antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Apr;80(7):2026-30.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411 (6836):494-8.

Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat Med* 1995, 1:27-31

Folkman J: Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med* 1971, 285:1182-1186

Folkman J: Angiogenesis-dependent diseases, *Semin Oncol* 2001, 28:536-542

Maione TE, Gray GS, Petro J, Hunt AJ, Donner AL, Bauer SI, Carson HF, Sharpe RJ: Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides, *Science* 1990, 247:77-79

Hagedorn M, Zilberberg L, Lozano RM, Cuevas P, Canron X, Redondo-Horcajo M, Gimenez-Gallego G, Bikfalvi A: A short peptide domain of platelet factor 4 blocks angiogenic key events induced by FGF-2, *Faseb J* 2001, 15:550-552

Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, Bikfalvi A: Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:1643-1648

Hannon GJ. RNA interference. *Nature*. 2002 Jul 11;418(6894):244-51.

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007). "Cancer statistics, 2007". *CA Cancer J Clin* 57 (1): 43-66.
- 5 Jouan V, Canron X, Alemany M, Caen JP, Quentin G, Plouet J, Bikfalvi A: Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action, *Blood* 1999, 94:984-993.
- Kolber DL, Knisely TL, Maione TE: Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4, *J Natl Cancer Inst* 1995, 87:304-309.
- 10 Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975 Aug 7;256(5517):495-7.
- Lasagni L, Grepin R, Mazzinghi B, Lazzeri E, Meini C, Sagrinati C, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Alain-Courtois N, Ballerini L, Netti GS, Maggi E, Annunziato F, Serio M, Romagnani S, Bikfalvi A, Romagnani P: PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion, *Blood* 2007, 109:4127-4134.
- 15 McManus MT, Sharp PA. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*. 2002 Oct;3(10):737-47.
- 20 Maione TE, Gray GS, Hunt AJ, Sharpe RJ: Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity, *Cancer Res* 1991, 51:2077-2083.
- Romagnani P, Maggi L, Mazzinghi B, Cosmi L, Lasagni L, Liotta F, Lazzeri E, Angeli R, Rotondi M, Fili L, Parronchi P, Serio M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F: CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production, *J Allergy Clin Immunol* 2005, 116:1372-1379.
- 25 Sharpe RJ, Byers HR, Scott CF, Bauer SI, Maione TE: Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4, *J Natl Cancer Inst* 1990, 82:848-853.
- 30 Struyf S, Burdick MD, Proost P, Van Damme J, Strieter RM: Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis, *Circ Res* 2004, 95:855-857.
- 35 Struyf S, Burdick MD, Peeters E, Van den Broeck K, Dillen C, Proost P, Van Damme J, Strieter RM. Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. *Cancer Res*. 2007 Jun 15;67(12):5940-8.
- Tanaka T, Manome Y, Wen P, Kufe DW, Fine HA: Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth, *Nat Med* 1997, 3:437-442.
- 40 Tuerk C., Using the SELEX combinatorial chemistry process to find high affinity nucleic acid ligands to target molecules. *Methods Mol Biol*. 1997; 67: 219-30.
- 45 Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999 Dec 15; 13(24):3191-7.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento de detección de un cáncer pancreático y/o metástasis pancreáticas en un paciente que comprende:
- determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente,
 - comparar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 con un valor umbral predeterminado, en el que un nivel de expresión elevado del gen CXCL4L1 en comparación con dicho valor umbral es indicativo de cáncer pancreático.
- 10 2. Un procedimiento de estadificación de un cáncer pancreático en un paciente que tiene cáncer pancreático que comprende:
- determinar el nivel de expresión del gen CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente, en el que el nivel de expresión del gen CXCL4L1 aumenta con el grado histológico.
- 15 3. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho nivel de expresión del gen CXCL4L1 se determina midiendo la cantidad de ARNm de CXCL4L1 y dicha muestra biológica es una muestra de tejido.
- 20 4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha muestra de tejido es una muestra de tumor pancreático.
- 25 5. El procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho nivel de expresión del gen CXCL4L1 se determina midiendo la concentración de la proteína CXCL4L1 en una muestra biológica obtenida de dicho paciente.
- 30 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre, una muestra de suero o una muestra de plasma.
- 35 7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho cáncer pancreático es un adenocarcinoma pancreático.
- 40 8. Uso de CXCL4L1 como biomarcador de cáncer pancreático en un paciente.
9. Una molécula de unión específica a CXCL4L1 conjugada con un agente antineoplásico tal como un agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático y/o la prevención de metástasis pancreáticas, en la que dicha molécula de unión específica a CXCL4L1 es un anticuerpo anti-CXCL4L1 o un aptámero.
10. La molécula de unión específica a CXCL4L1 para su uso en el tratamiento de cáncer pancreático y/o la prevención de metástasis pancreáticas según la reivindicación 9, en la que dicha molécula de unión específica a CXCL4L1 es un anticuerpo anti-CXCL4L1.

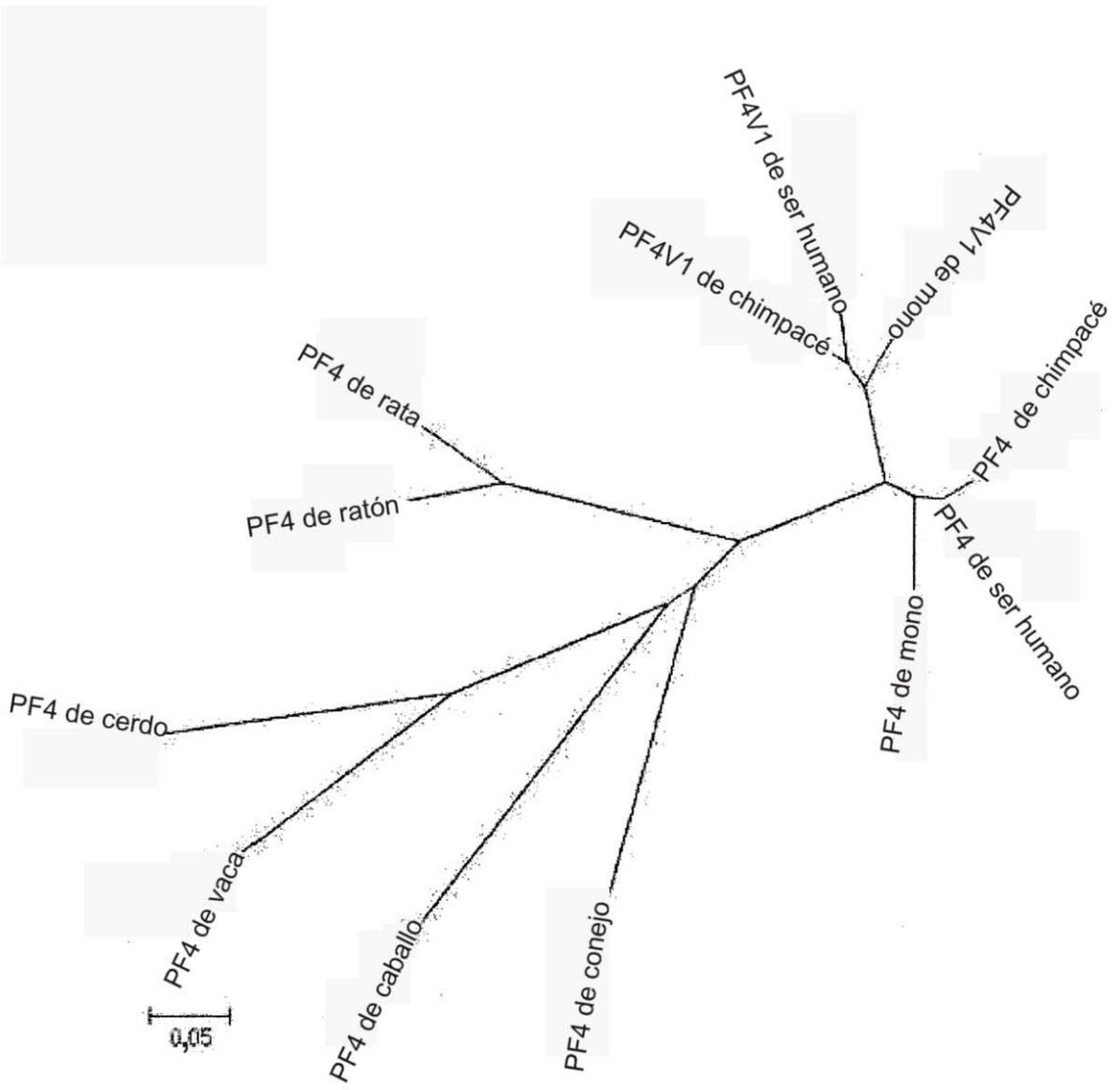


Figura 1

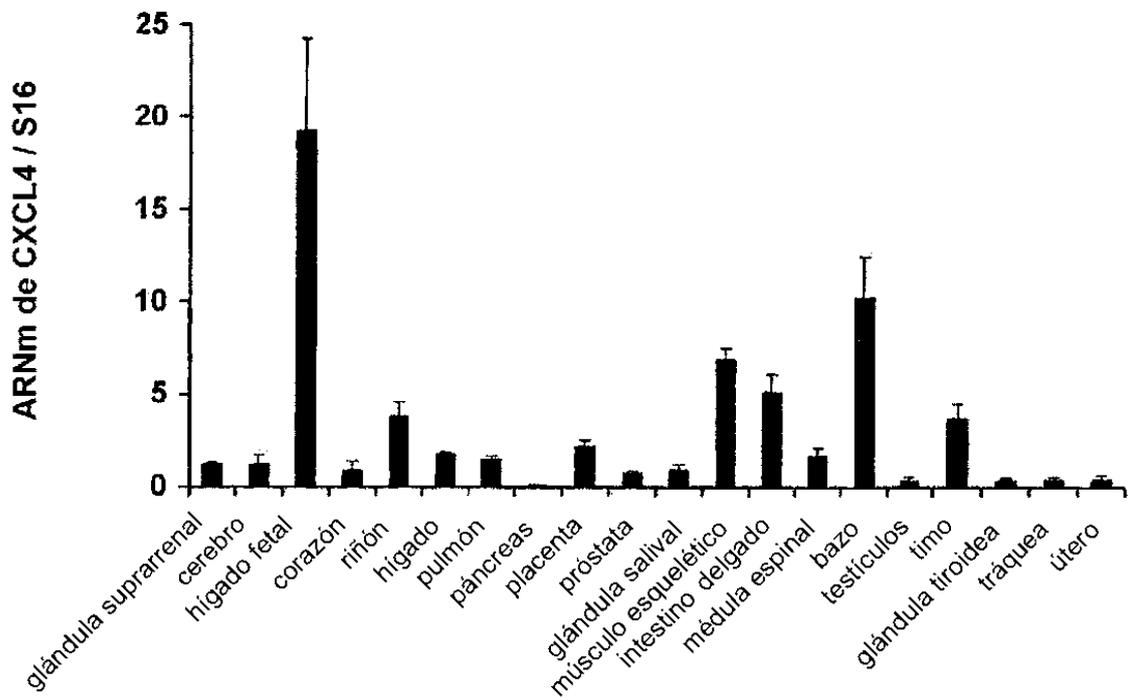
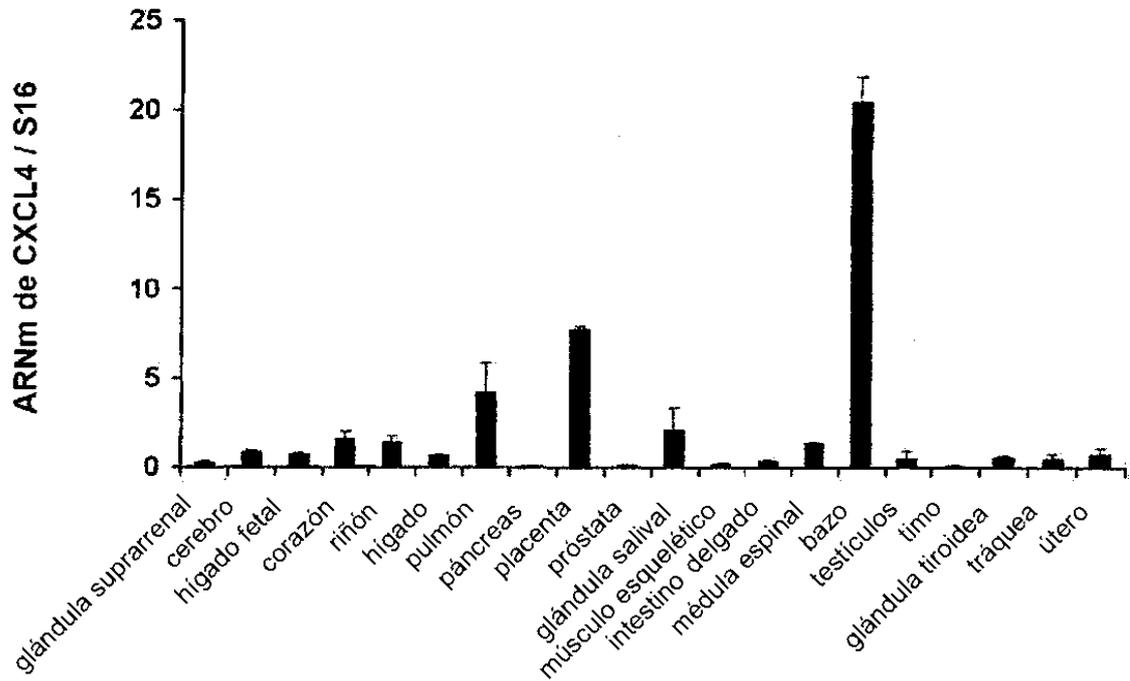
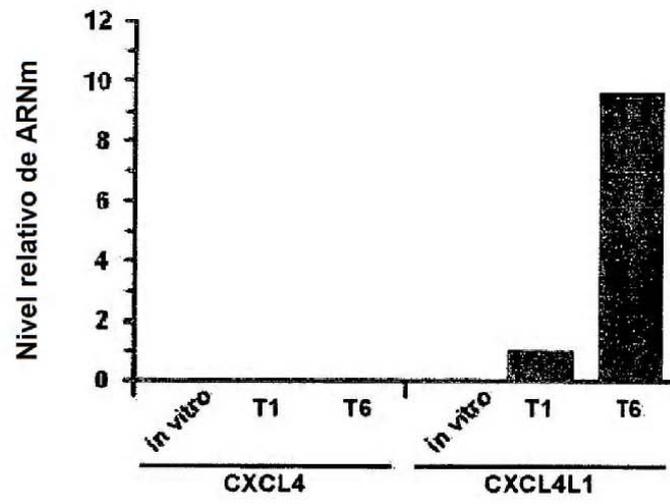


Figura 2

A



B

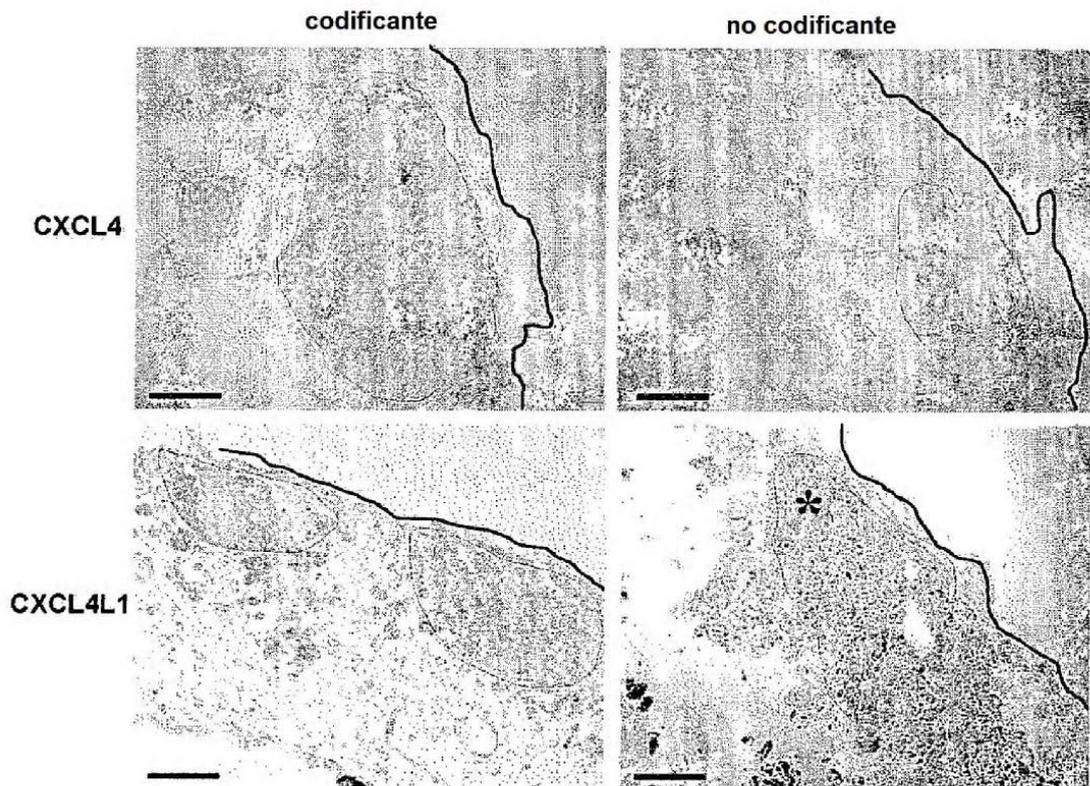


Figura 3

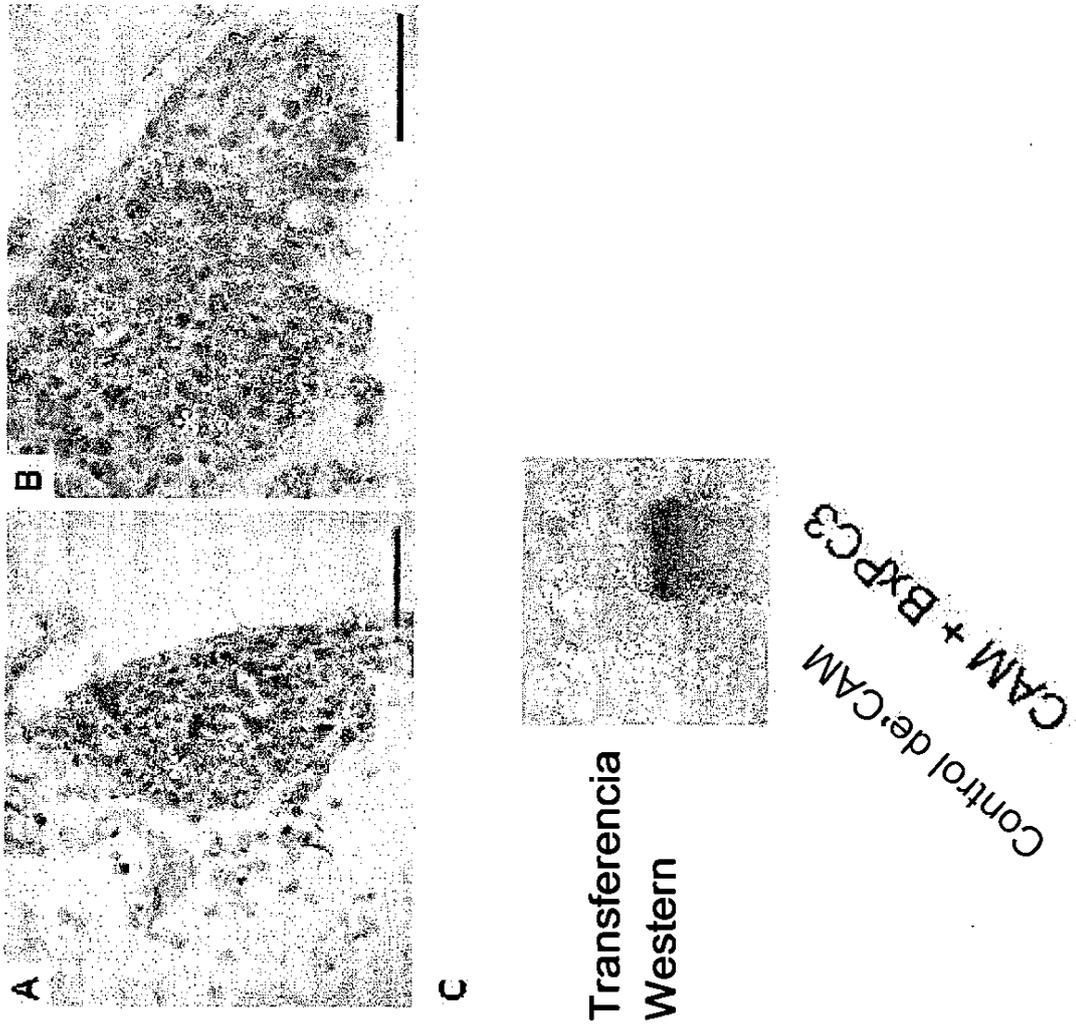


Figura 4

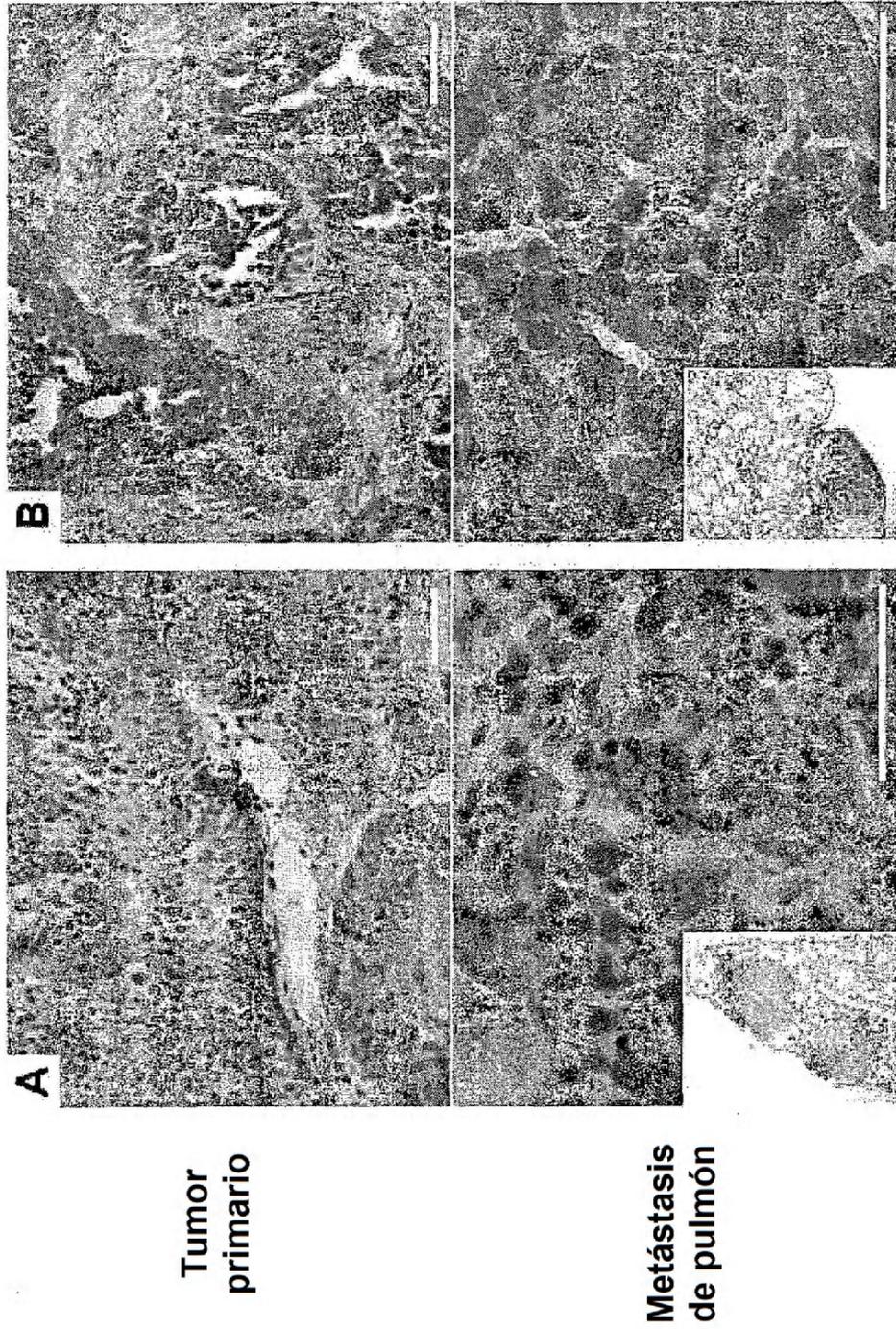


Figura 5

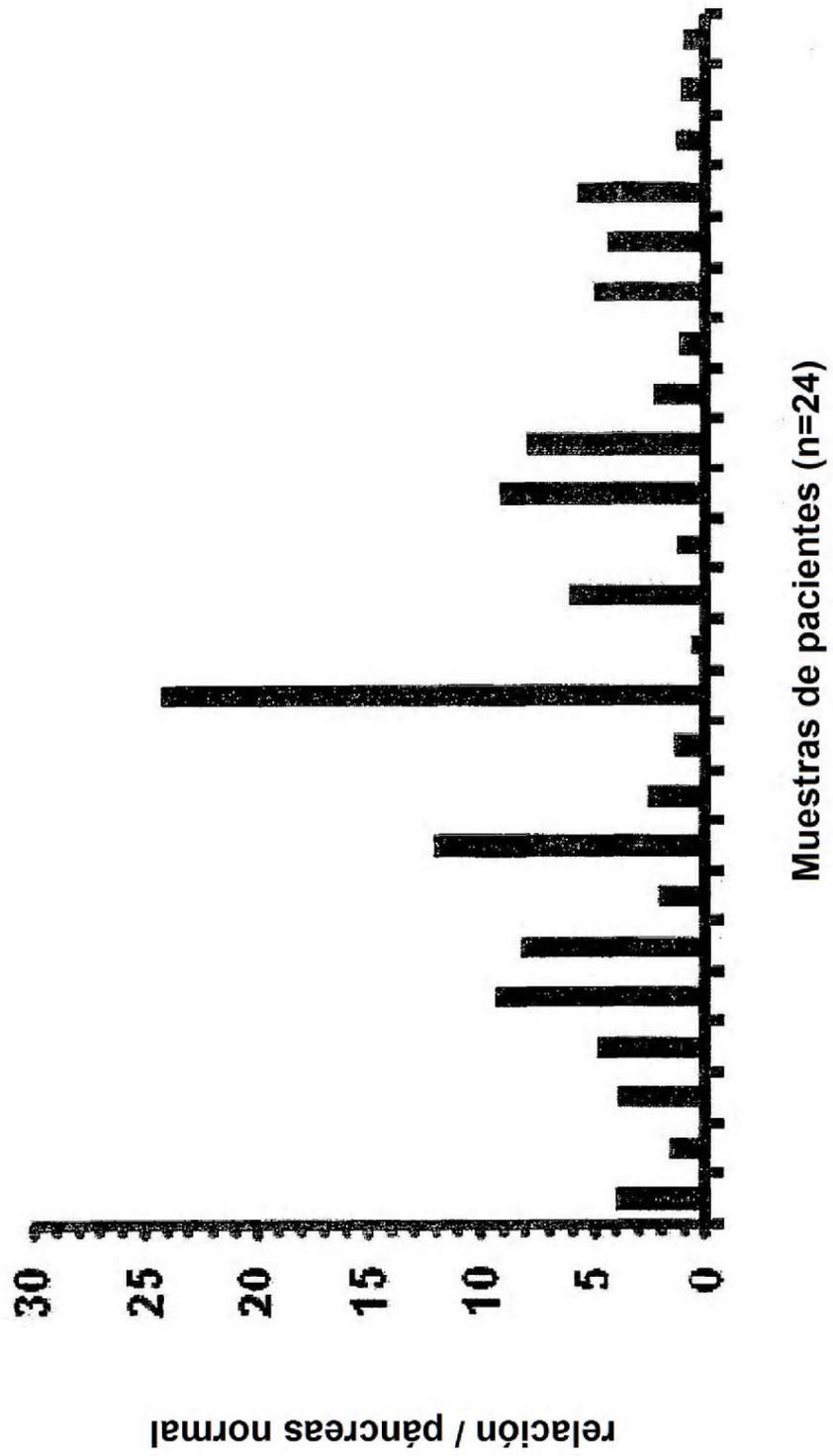


Figura 6A

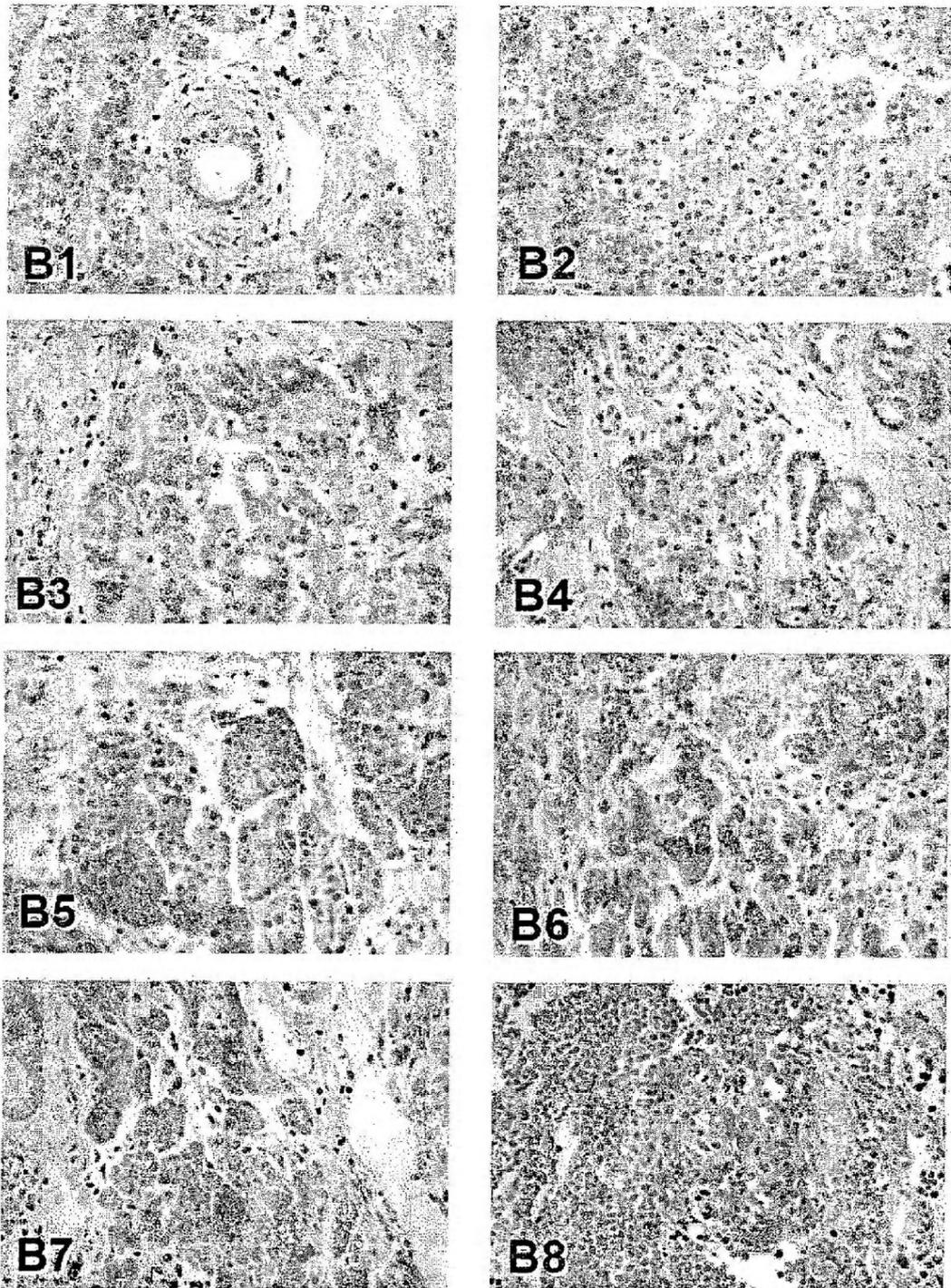


Figura 6B

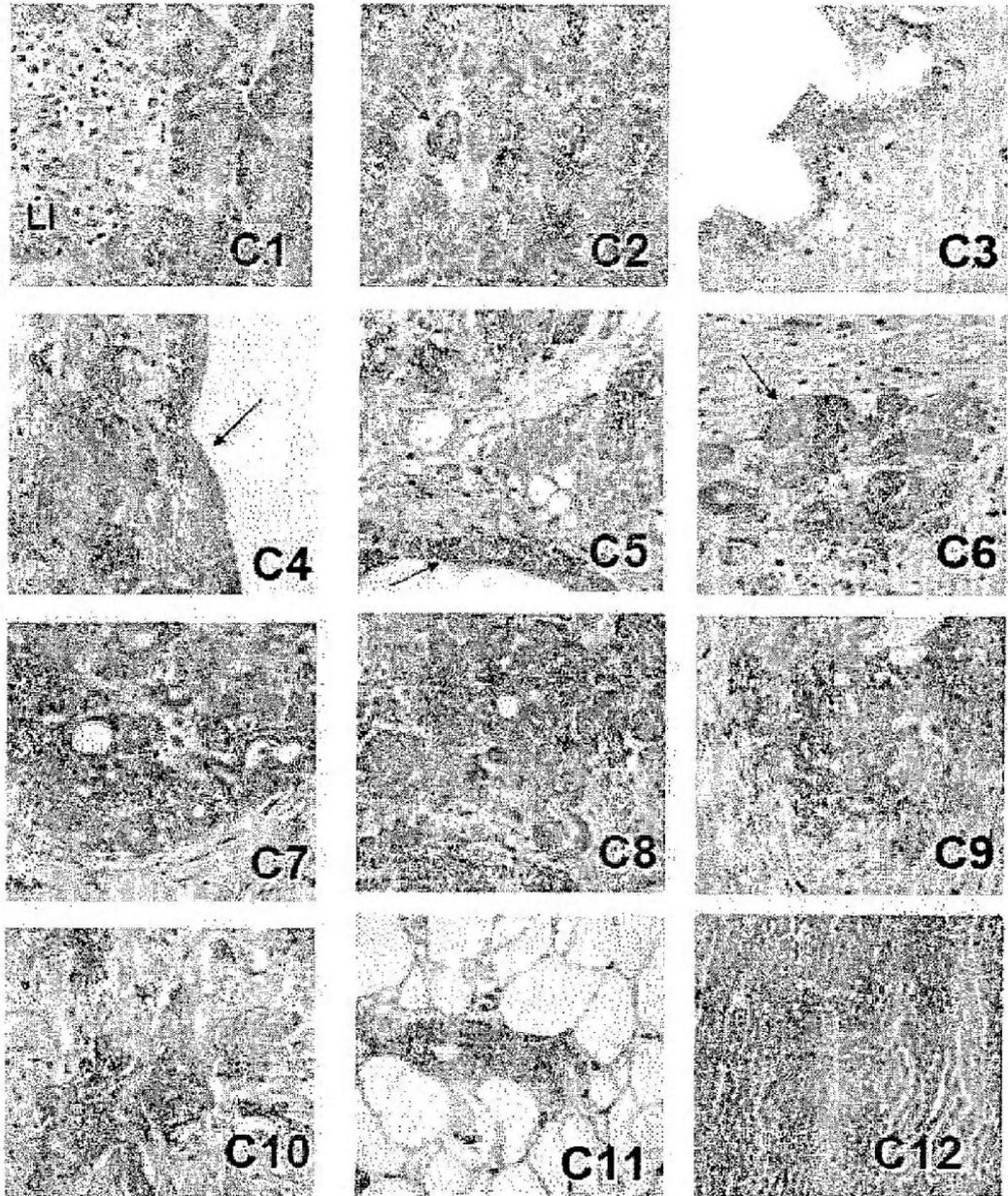


Figura 6C

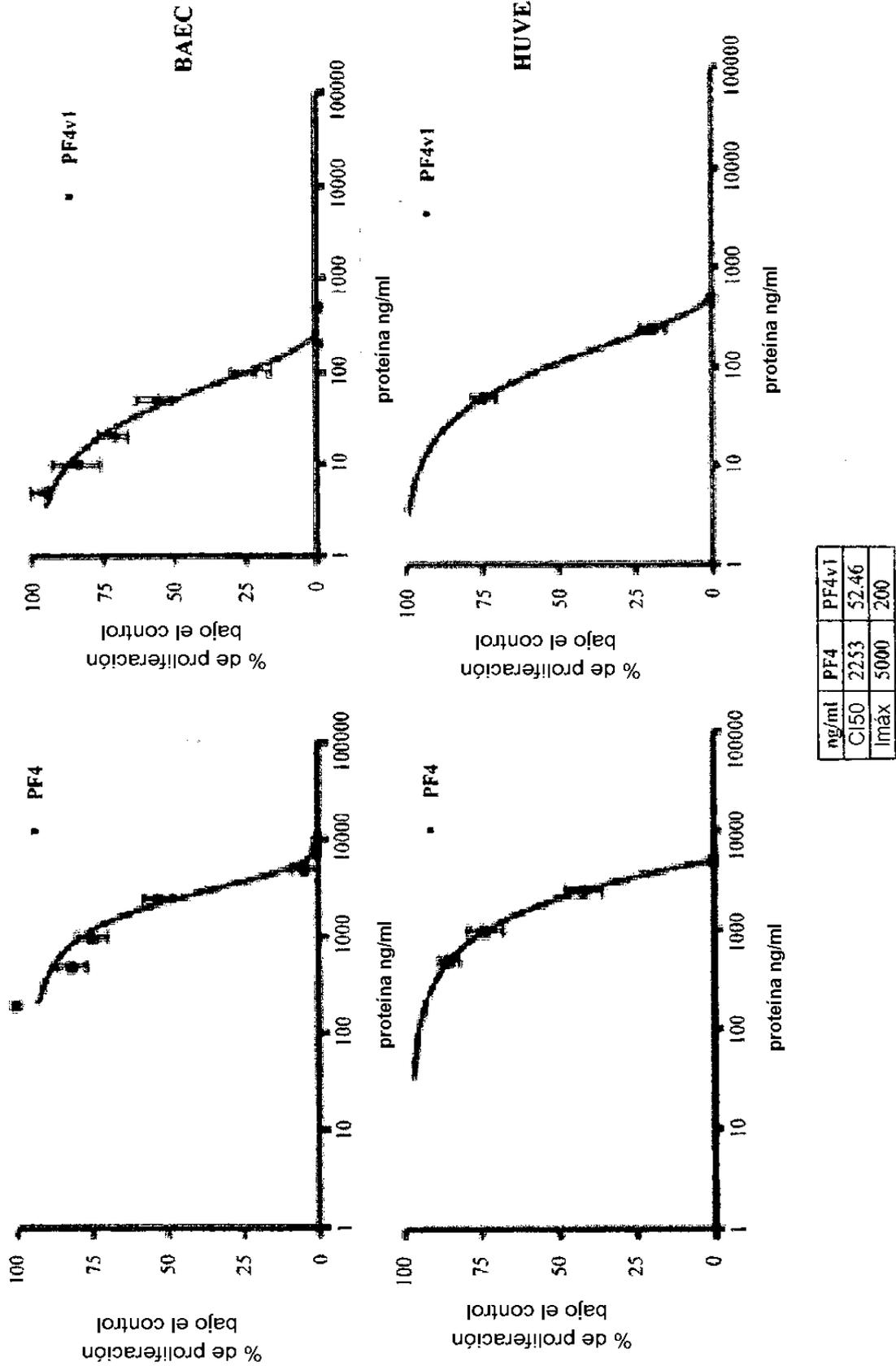
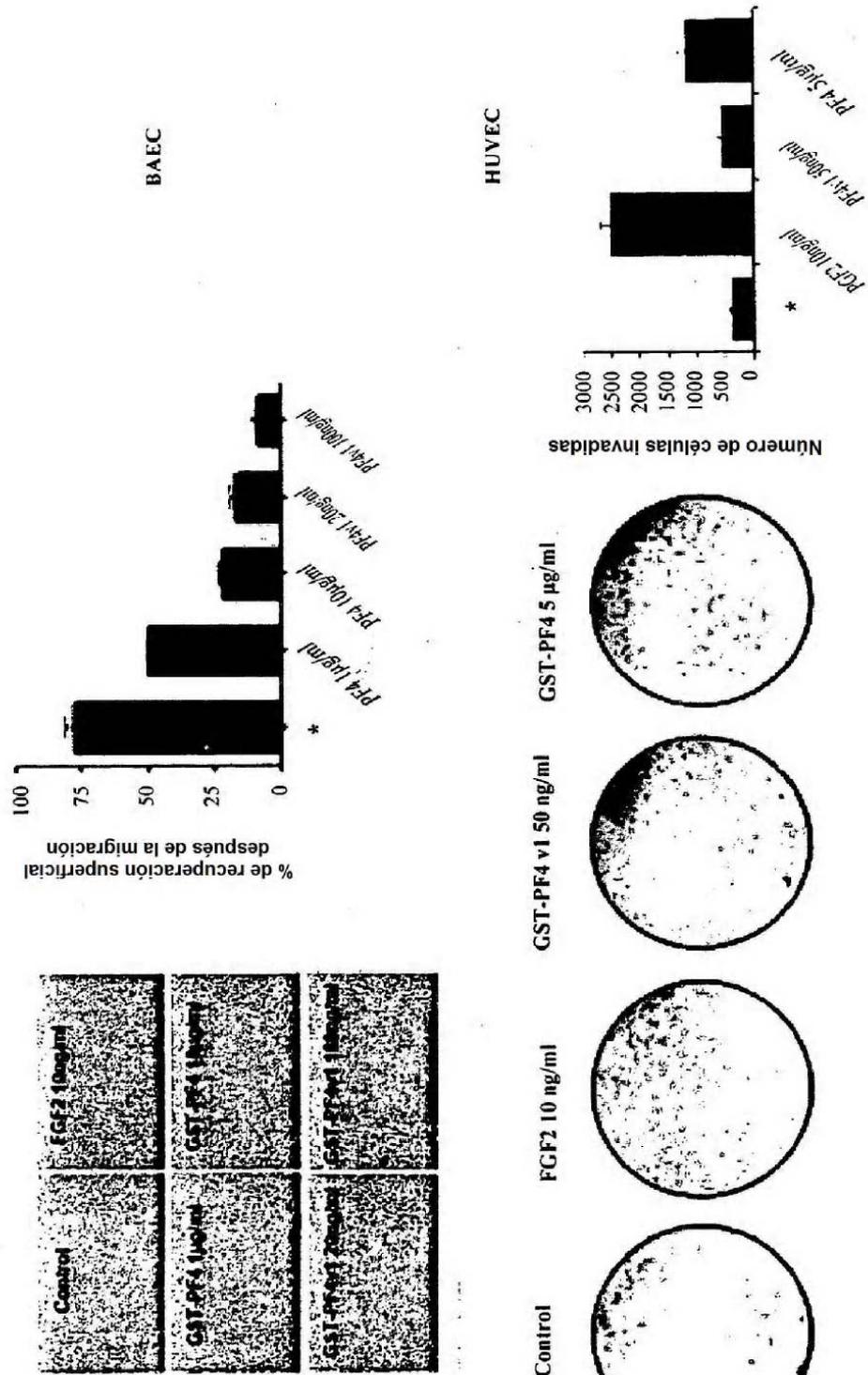


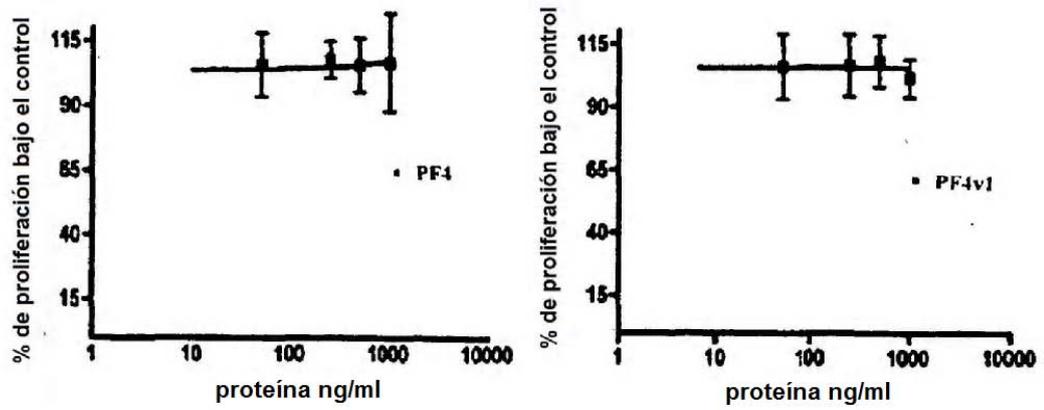
Figura 7A

B b)

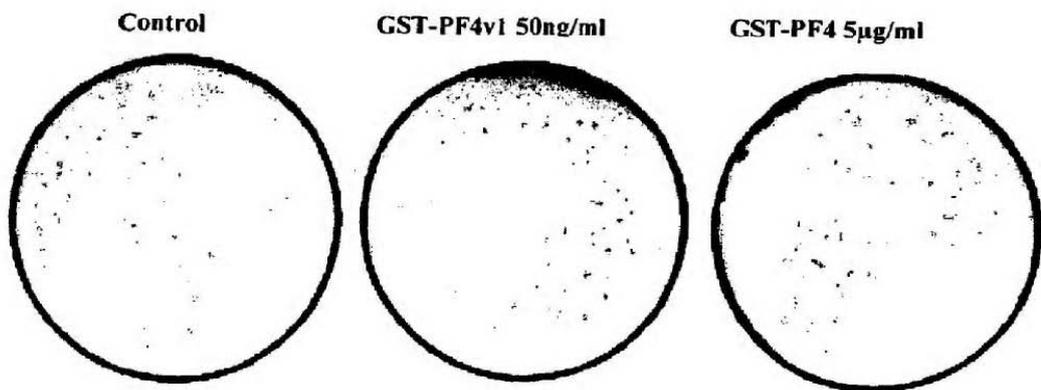


Figuras 7B y 7C

A



B



C

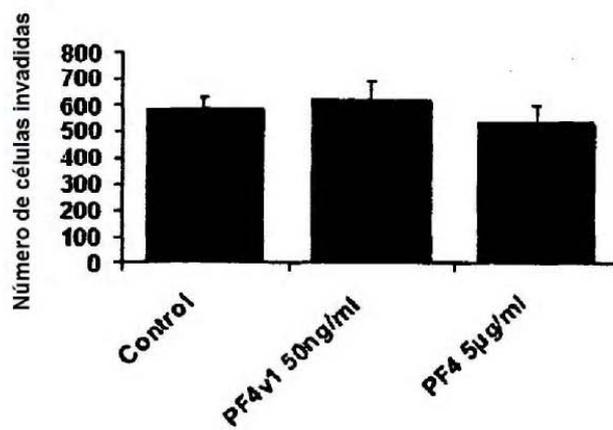


Figura 8