

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 750**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.08.2015** **PCT/FR2015/052207**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016** **WO16027029**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2015** **E 15759902 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020** **EP 3183363**

54 Título: **Procedimiento para determinar el pronóstico de supervivencia de un paciente que padece cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

22.08.2014 FR 1457934

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

03.12.2020

73 Titular/es:

**ACOBION (100.0%)
1682, Rue de la Vaisière Cap Delta ZAC
Euromédecine II
34790 Grabels, FR**

72 Inventor/es:

PIQUEMAL, DAVID

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 797 750 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

Procedimiento para determinar el pronóstico de supervivencia de un paciente que padece cáncer de páncreas

- 5 La presente invención se refiere al cáncer de páncreas y, más particularmente, al pronóstico de supervivencia de un paciente que padece cáncer de páncreas.

La invención también tiene por objeto determinar la capacidad de dicho paciente para recibir un tratamiento para el cáncer de páncreas, particularmente un tratamiento con gemcitabina.

- 10 Con 43.920 nuevos casos anuales en los Estados Unidos y 37.390 fallecimientos, la mortalidad relacionada con el cáncer de páncreas es más del 85 %, lo que ubica al cáncer de páncreas en el cuarto lugar en términos de mortalidad por cáncer en los Estados Unidos, tanto en hombres como en mujeres.

- 15 La incidencia del cáncer de páncreas ha aumentado significativamente en las últimas décadas. Cada año, alrededor de 60.000 personas en Europa, y más de 230.000 en todo el mundo, son diagnosticadas con esta enfermedad.

- Los pacientes que padecen cáncer de páncreas a menudo presentan un pronóstico no tan favorable con respecto a otros tumores malignos y tipos de cáncer, en parte porque la detección precoz es difícil.

- 20 En el momento del diagnóstico, la mayoría de los pacientes que padecen adenocarcinoma ductal pancreático presentan una enfermedad localmente avanzada o metastásica, y solamente un 10 a 20 % de los casos son candidatos para cirugía curativa.

- 25 El tiempo medio de supervivencia a partir del diagnóstico es de aproximadamente 3 a 6 meses; la supervivencia durante un periodo de 5 años es muy inferior al 5 % y una remisión completa es extremadamente rara.

- Las terapias actuales aprobadas o utilizadas en la práctica clínica en pacientes que padecen cáncer de páncreas son tratamientos a base de gemcitabina, folfirinix o incluso erlotinib.

- 30 La gemcitabina es un análogo de nucleósido, administrado por vía intravenosa a una dosis de aproximadamente 1000 mg/m². Un tratamiento con gemcitabina suele ser uno de los tratamientos de primera línea recomendados para el cáncer de páncreas resecable (fase I-II), el cáncer de páncreas localmente avanzado no resecable (estadio III) y el cáncer de páncreas metastásico avanzado (estadio IV).

- 35 Con la gemcitabina, el tiempo medio de supervivencia global varía entre 4,9 meses y 8,3 meses.

- El éxito limitado de los tratamientos y la tasa de mortalidad que sigue siendo alta para una parte de los pacientes destaca la necesidad de medios para mejorar la identificación selectiva terapéutica de los pacientes que podrían ser buenos respondedores a la gemcitabina y que tolerarían bien la gemcitabina en esta indicación.

- 40 Una correlación entre la supervivencia de un paciente que padece cáncer de páncreas y la expresión de ciertos marcadores en sus células tumorales se describe en la técnica anterior (A. Tsiaousidou *et al.*, Pancreatology, 2013, 13, págs. 564-569, H. Fujita *et al.*, Neoplasia, 2010, 12, págs. 807-817 y T. Takadate *et al.*, Clinical Proteomics, 2012, 9:8).

- El tratamiento del cáncer de páncreas con diferentes compuestos puede tener diferentes grados de eficacia según el paciente. Sin embargo, hasta hoy, no se dispone de ningún medio para predecir fácilmente el beneficio clínico de los diferentes tratamientos disponibles en un paciente determinado.

- 50 Por lo tanto, existe siempre una necesidad de realizar pruebas que permitan seleccionar el tratamiento adecuado para cada paciente, a fin de darles más posibilidades de sobrevivir.

- 55 En el caso de los pacientes que padecen cáncer de la sangre, es posible establecer un pronóstico de supervivencia de manera no invasiva gracias a la medición de la expresión de marcadores específicos en una muestra de sangre periférica, en la que están localizadas las células cancerosas (A. Kracmarova *et al.*, Leukemia & Lymphoma, 2008, 49 (7), págs. 1297-1305). No obstante, en el caso de un cáncer de páncreas, las células cancerosas son difícilmente accesibles.

- 60 También podría ser deseable que dicha prueba sea una prueba que se pueda realizar de manera regular. Una ventaja adicional sería que dicha prueba sea no invasiva.

- El trabajo de los inventores ha permitido identificar un conjunto de genes cuyo estudio del nivel de expresión permite evaluar el tiempo de supervivencia de un paciente que padece cáncer de páncreas.

- 65 Ventajosamente, esta predicción también permite predecir las posibilidades de éxito de un tratamiento con

gemcitabina y seleccionar a los pacientes que puedan responder favorablemente a un tratamiento con gemcitabina.

De esta forma, el estudio del nivel de expresión de dichos genes permite proporcionar información sobre la oportunidad de administrar un tratamiento con gemcitabina a un paciente que padece cáncer de páncreas.

5 Una de las ventajas de la invención reside en el hecho de que el nivel de expresión de dichos genes puede ser evaluado directamente a partir de una muestra de sangre, ventajosamente de sangre total del paciente, previamente extraída.

10 Esto resulta particularmente ventajoso en el caso del cáncer de páncreas ya que es muy difícil acceder a las células tumorales.

Además, se puede estandarizar el muestreo de sangre (extracción, estabilización y transporte).

15 Finalmente, el uso de sangre total es más seguro que el uso de una fracción de sangre como, por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), ya que permite evitar los errores de manipulación relacionados con la preparación de dichas fracciones. Por "sangre total", se entiende la sangre con todos sus constituyentes, (plasma, glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas, ...) en oposición a "fracción de sangre", que corresponde a un producto obtenido por separación de los componentes particulares de la sangre. Las células mononucleares de sangre
20 periférica constituyen un ejemplo de una fracción de sangre.

La invención tiene por objeto un procedimiento *in vitro* para establecer un pronóstico de supervivencia en un paciente que padece cáncer de páncreas, que comprende las siguientes etapas:

- 25 a) medir el nivel de expresión de cada gen de una combinación de genes marcadores seleccionados entre el grupo constituido por genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos 90 % con el gen *NME4* o *ARL4C*, respectivamente, en una muestra de sangre de dicho paciente previamente extraída;
- 30 b) comparar el nivel de expresión medido de los genes marcadores seleccionados en la etapa a) en dicho paciente con un umbral de referencia;
- c) evaluar el tiempo de supervivencia en dicho paciente.

El término "homólogo" se define en el presente texto como una secuencia de polinucleótidos que presenta un grado de identidad de al menos 90 %, y preferentemente 99 % con la secuencia del gen (de longitud completa) salvaje. El
35 grado de identidad hace referencia a una identidad de secuencia entre dos secuencias. La identidad se puede determinar comparando una posición en cada secuencia que puede ser alineada con fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esta posición. Se pueden utilizar diversos algoritmos y/o programas de alineamiento para la determinación de la homología de dos secuencias, incluyendo FASTA y BLAST.

40 El procedimiento de acuerdo con la invención permite establecer un pronóstico de supervivencia en un paciente que padece cáncer de páncreas.

45 De acuerdo con la invención, las etapas a) a c) del procedimiento anterior pueden ser implementadas en un paciente que padece cáncer de páncreas que ha recibido un tratamiento y, particularmente, un tratamiento a base de gemcitabina, para predecir o evaluar la eficacia y/o el beneficio de un tratamiento para el cáncer de páncreas en un paciente que padece dicha patología, en particular, en términos de esperanza de vida.

50 De esta forma, la invención también tiene por objeto un procedimiento *in vitro* para predecir o evaluar la eficacia y/o el beneficio de un tratamiento para el cáncer de páncreas en un paciente que padece dicha patología, que comprende las siguientes etapas:

- 55 a) medir el nivel de expresión de cada gen de una combinación de genes marcadores seleccionados entre el grupo constituido por genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos 90 % con el gen *NME4* o *ARL4C*, respectivamente, en una muestra de sangre de dicho paciente previamente extraída;
- b) comparar el nivel de expresión medido de los genes marcadores seleccionados en la etapa a) en dicho paciente con un umbral de referencia;
- 60 c) evaluar el tiempo de supervivencia en dicho paciente.

El procedimiento de acuerdo con la invención es particularmente adecuado para predecir o evaluar la eficacia y/o el beneficio de un tratamiento para el cáncer de páncreas con gemcitabina.

65 En los procedimientos de acuerdo con la invención, el umbral de referencia utilizado en la etapa c) para llevar a cabo la comparación se determina previamente para cada gen o cada combinación de genes.

El principio de la invención se basa en el hecho de que el solicitante ha podido establecer que el estudio del nivel de expresión de al menos uno de los 5 genes (*NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*), ventajosamente de una combinación de 2 a 5 de estos genes, aún más ventajosamente de una combinación de los 5 genes, permite establecer un pronóstico de supervivencia del paciente. Más particularmente, el solicitante ha establecido que al

comparar los datos del nivel de expresión de al menos uno de los 5 genes (*NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*) o su combinación, obtenidos a partir de una muestra de sangre de dicho paciente sometido a ensayo con los datos establecidos para los 5 genes considerados o su combinación sobre una población de referencia de enfermos que padecen cáncer de páncreas, antes o durante el tratamiento, permitiría establecer un pronóstico de supervivencia del paciente y un seguimiento en el tratamiento del mismo.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo en una muestra de sangre de un paciente, preferentemente en una muestra de sangre periférica de dicho paciente, siendo dicha muestra de sangre extraída previamente a la implementación del procedimiento de acuerdo con la invención. La sangre periférica es la sangre que circula a través del corazón, arterias, capilares y venas.

De acuerdo con la divulgación, la etapa a) del procedimiento puede llevarse a cabo midiendo el nivel de expresión de 1 de los 5 genes (o genes homólogos) del grupo definido anteriormente, ventajosamente de 2 de los 5 genes, más ventajosamente de 3 de los 5 genes, incluso más ventajosamente de 4 de los 5 genes, y preferentemente de los 5 genes (o genes homólogos) del grupo definido anteriormente.

De acuerdo con la invención, la etapa a) del procedimiento puede llevarse a cabo midiendo el nivel de expresión de los genes *NME4* y *ARL4C* (o genes homólogos), más ventajosamente de 3 de los 5 genes (o genes homólogos) del grupo definido anteriormente que incluye *NME4* y *ARL4C*, incluso más ventajosamente de 4 de los 5 genes (o genes homólogos) del grupo definido anteriormente que incluye *NME4* y *ARL4C*, y preferentemente de los 5 genes (o genes homólogos) del grupo definido anteriormente.

De acuerdo con la divulgación, la etapa a) del procedimiento puede llevarse a cabo midiendo el nivel de expresión de al menos un gen (o gen homólogo) seleccionado entre los genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*, ventajosamente de al menos una de las siguientes combinaciones: *NME4* e *ITPR3*; *NME4* y *SESN3*; *NME4* y *ARL4C*; *NME4* y *RPLP1*; *ITPR3* y *SESN3*; *ITPR3* y *ARL4C*; *ITPR3* y *RPLP1*; *SESN3* y *ARL4C*; *SESN3* y *RPLP1*; *ARL4C* y *RPLP1*; más ventajosamente el nivel de expresión de los genes de una de las siguientes combinaciones: *NME4* e *ITPR3* y *SESN3*; *NME4* e *ITPR3* y *ARL4C*; *NME4* e *ITPR3* y *RPLP1*; *NME4* y *SESN3* y *ARL4C*; *NME4* y *SESN3* y *RPLP1*; *NME4* y *ARL4C* y *RPLP1*; *ITPR3* y *ARL4C* y *RPLP1*; *ITPR3* y *SESN3* y *RPLP1*; *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C*; *SESN3* y *ARL4C* y *RPLP1*; incluso más ventajosamente el nivel de expresión de los genes de una de las siguientes combinaciones: *NME4* e *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C*; *NME4* e *ITPR3* y *ARL4C* y *RPLP1*; *NME4* e *ITPR3* y *SESN3* y *RPLP1*; *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C* y *RPLP1*, y preferentemente la siguiente combinación: *NME4* e *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C* y *RPLP1*.

De esta forma, de acuerdo con la invención, la etapa a) del procedimiento se lleva a cabo ventajosamente midiendo el nivel de expresión de al menos la siguiente combinación: *NME4* y *ARL4C*; más ventajosamente el nivel de expresión de los genes de una de las siguientes combinaciones: *NME4* e *ITPR3* y *ARL4C*; *NME4* y *SESN3* y *ARL4C*; *NME4* y *ARL4C* y *RPLP1*; incluso más ventajosamente el nivel de expresión de los genes de una de las siguientes combinaciones: *NME4* e *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C*; *NME4* e *ITPR3* y *ARL4C* y *RPLP1*, y preferentemente la siguiente combinación: *NME4* e *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C* y *RPLP1*.

De manera preferente, de acuerdo con la invención, la etapa a) del procedimiento se lleva a cabo midiendo el nivel de expresión de los dos genes (o gen homólogo) *NME4* y *ARL4C* o el nivel de expresión de los genes de la siguiente combinación: *NME4* e *ITPR3* y *SESN3* y *ARL4C* y *RPLP1*.

En un primer modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el nivel de expresión de los genes *NME4* y *ARL4C*, y opcionalmente de o de los genes seleccionados entre el grupo que consiste en *ITPR3*, *SESN3* y *RPLP1* se mide por la medición de la cantidad de la proteína codificada por dicho gen en la muestra de sangre de dicho paciente a someter a ensayo. En ese caso, el contenido en proteínas se mide preferentemente utilizando métodos de detección a base de anticuerpos tales como inmunoquímica o análisis por inmunoelectrotransferencia.

En otro modo de realización del procedimiento de acuerdo con la invención, el nivel de expresión de los genes se mide por la medición del contenido de transcripción de dicho gen. Este contenido puede medirse por la medición de la cantidad de ARN o ADNc de dicho gen. En ese caso, el nivel de ARN transcrito o ADNc se puede medir utilizando métodos de detección de ácidos nucleicos como PCR cuantitativa, chips de ADN, hibridación con sondas marcadas o inmunoensayos de flujo lateral, en particular utilizando tiras de flujo lateral.

Preferentemente, en los procedimientos de acuerdo con la invención, el nivel de expresión del gen o de la combinación de genes se mide por PCR cuantitativa en tiempo real (*real time quantitative polymerase chain reaction* o qPCR) realizada en los transcritos de ARN de dicho gen o sobre su ADN complementario (ADNc). Una qPCR es una PCR en la que el ADN amplificado es detectado en tiempo real a medida que avanza la reacción de polimerización. Esta detección se realiza por la acumulación de una señal fluorescente.

Esta técnica utiliza cebadores (sentido y antisentido) y un marcador, preferentemente, un intercalante fluorescente del ADN formado durante los ciclos de PCR. Ventajosamente, dichos cebadores son específicos de las regiones flanqueantes del gen considerado.

5 En el caso del gen *NME4*, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 16 entre los nucleótidos 399665 y 399728 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRch38/hg38, fuente UCSC).

10 En el caso del gen *ITPR3*, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 6 entre los nucleótidos 33696404 y 33696485 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRch38/hg38, diciembre de 2013, fuente UCSC).

En el caso del gen *SESN3*, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 11 entre los nucleótidos 95166241 y 95166313 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRch38/hg38, fuente UCSC).

15 En el caso del gen *ARL4C*, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 4 entre los nucleótidos 234493401 y 234493502 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRch38/hg38, diciembre de 2013, fuente UCSC).

20 En el caso del gen *RPLP1*, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 15 entre los nucleótidos 69455485 y 69455598 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRch38/hg38, diciembre de 2013, fuente UCSC).

En un modo de realización ventajoso, los siguientes cebadores pueden ser utilizados para llevar a cabo la qPCR:

- ARN procedentes del gen *NME4*

- 25 ○ cebador sentido: CATGATTGGACACACCGACTC (SEQ ID NO. 1)
 ○ cebador antisentido: GACGCTGAAGTCACCCCTTAT (SEQ ID NO. 2)

- ARN procedentes del gen *ITPR3*

- 30 ○ cebador sentido: TCCTGGGGAAGAGTTGTACG (SEQ ID NO. 3)
 ○ cebador antisentido: AGGAGAAAAACAAGCGGTCA (SEQ ID NO. 4)

- ARN procedentes del gen *SESN3*

- 35 ○ cebador sentido: TTGCCTTTGTAGTCCTGTGC (SEQ ID NO. 5)
 ○ cebador antisentido: CATTAGTCCAGTCACGTGCTTC (SEQ ID NO. 6)

- ARN procedentes del gen *ARL4C*

- 40 ○ cebador sentido: AAAGCCCTGTGGTGTATCAA (SEQ ID NO. 7)
 ○ cebador antisentido: GCTTCCTCTGTTGGGTCAGA (SEQ ID NO. 8)

- ARN procedentes del gen *RPLP1*

- 45 ○ cebador sentido: TGGGCTTTGGTCTTTTGGAC (SEQ ID NO. 9)
 ○ cebador antisentido: CAGACCATTTTGCAGAGCA (SEQ ID NO. 10)

50 La qPCR permite determinar el valor del número de ciclos (Ct) de un gen en el paciente a someter a ensayo. El Ct ("cycle threshold", umbral de ciclo) se define como el número de ciclos de PCR necesarios para que la señal fluorescente cruce el ruido de fondo.

55 El valor de Ct obtenido se puede normalizar acto seguido con respecto al nivel de expresión de al menos un gen ubicuo expresado en número de ciclos en la misma muestra de sangre del mismo paciente. Dichos genes ubicuos son genes que se expresan en todas las células de un organismo en condiciones normales y fisiopatológicas. Estos genes son expresados generalmente a niveles relativamente constantes.

60 Preferentemente, en los procedimientos de acuerdo con la invención, en la etapa a), además del nivel de expresión de cada gen (Ct_{gen}) de una combinación de al menos 2 genes marcadores, se mide el nivel de expresión de al menos un gen ubicuo, siendo dichos niveles de expresión medidos en número de ciclos (Ct, "cycle threshold", umbral de ciclo) por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), después se normaliza el nivel de expresión de los genes marcadores con respecto al nivel de expresión de al menos un gen ubicuo de acuerdo con

$$\Delta Ct_{gen} = Ct_{gen} - [(media de los) Ct (gen(es) ubicuo(s))]$$

65 a fin de obtener un nivel de expresión normalizado ΔCt_{gen} para cada gen marcador en el que se ha medido el nivel de expresión.

Preferentemente, en los procedimientos de acuerdo con la invención, la normalización se lleva a cabo con respecto al nivel de expresión de dos genes ubicuos, en particular, con respecto al nivel de expresión de los genes GAPDH y B2M. En ese caso, el nivel de expresión normalizado ΔCt_{gen} de un gen marcador se calcula por:

$$\Delta Ct_{\text{gen}} = Ct_{\text{gen}} - (Ct_{B2M} + Ct_{GAPDH})/2$$

En el caso del gen B2M, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 15 entre los nucleótidos 44718721 y 44718792 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRCh38/hg38, fuente UCSC).

En el caso del gen GAPDH, las regiones flanqueantes se sitúan en el cromosoma 12 entre los nucleótidos 6534833 y los nucleótidos 6536572 (Ensamblaje, diciembre de 2013, GRCh38/hg38, fuente UCSC).

Los cebadores particularmente adecuados para los genes *B2M* y *GAPDH* pueden ser:

- ARN procedentes del gen *B2M*

- o cebador sentido: GCTCAGTAAAGACACAACCATCC (SEQ ID NO. 11)
- o cebador antisentido: CATCTGTGGATTGAGCAAACC (SEQ ID NO. 12)

- ARN procedentes del gen *GAPDH*

- o cebador sentido: ATGGGGAAGGTGAAGGTCG (SEQ ID NO. 13)
- o cebador antisentido: GGGGTCATTGATGGCAACAATA (SEQ ID NO. 14)

Ventajosamente, para llevar a cabo la qPCR, los cebadores, su tamaño (preferentemente comprendido entre 80 y 150 nucleótidos), su temperatura de fusión (T_f , preferentemente de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), su porcentaje de nucleótidos G y C (% de GC, preferentemente -60 % en 3'), su autocomplementariedad 3' y 5' y su estabilidad (preferentemente inferior a 4 nucleótidos), los intervalos de las dimensiones del producto y los parámetros termodinámicos (evolución de la estructura secundaria de acuerdo con la T_f de los cebadores y la concentración de sal de sodio) se seleccionan para permitir una detección simultánea.

De acuerdo con un primer modo de realización de la divulgación, durante la etapa a), se mide el nivel de expresión de un único gen marcador. En este modo de realización, durante las etapas b) y c), los umbrales de referencia (U_{ref}) de un gen dado se definen en la tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Gen	U_{ref}
<i>NME4</i>	3,1864
<i>ITPR3</i>	6,4014
<i>SESN3</i>	3,6262
<i>ARL4C</i>	2,6286
<i>RPLP1</i>	6,3748

- un nivel de expresión normalizado ΔCt de *NME4* superior a 3,1864, y/o
- un nivel de expresión normalizado ΔCt de *ITPR3*, *SESN3*, *ARM4C* y/o
- *RPLP1* inferior respectivamente a 6,4015; 3,6262; 2,6286 y 6,3748, indica un pronóstico de supervivencia a largo plazo, mientras que
- un nivel de expresión normalizado ΔCt de *NME4* inferior a 3,1864, y/o
- un nivel de expresión normalizado ΔCt de *ITPR3*, *SESN3*, *ARM4C* y/o
- *RPLP1* superior respectivamente a 6,4015; 3,6262; 2,6286 y 6,3748, indica un pronóstico de supervivencia a corto plazo.

Por "supervivencia a largo plazo", se entiende la supervivencia de más de 10 meses, preferentemente más de 12 meses, incluso más preferentemente más de 15 meses.

Por "supervivencia a corto plazo", se entiende una supervivencia de menos de 6 meses, menos de 5 meses, o menos de 3 meses.

Por lo demás, cuando se supone que un paciente tiene una supervivencia a largo plazo, esto también significa que puede considerarse elegible para un tratamiento a base de gemcitabina. Por el contrario, una supervivencia a corto plazo del paciente indica que un tratamiento a base de gemcitabina no presentará ningún beneficio o presentará un beneficio escaso al paciente. Se debe considerar otro tratamiento.

El trabajo del solicitante (véase el ejemplo 1) sobre una población de referencia lo ha llevado de hecho a identificar 5

genes que pueden utilizarse como marcadores para un pronóstico de supervivencia de un paciente que padece cáncer de páncreas, pero también a determinar para estos 5 genes, los valores para los umbrales de Umbral de referencia (U_{ref}), permitiendo realizar una comparación.

- 5 No obstante, se puede proporcionar una mayor precisión en el pronóstico gracias a la medición de una combinación de al menos dos genes. Por consiguiente, de acuerdo con un segundo modo de realización de acuerdo con la invención, durante la etapa a), se mide el nivel de expresión de una combinación de al menos dos genes marcadores y, durante las etapas b), para cada gen marcador en el que se midió la expresión:

i) se determina un valor $ÍNDICE_{gen}$ que depende del nivel de expresión normalizado del gen, definido por:

- 10 - $ÍNDICE_{gen} = +1 \times \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta Ct_{gen} > \text{umbral de referencia del gen, e}$
 - $ÍNDICE_{gen} = -1 \times \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta Ct_{gen} < \text{umbral de referencia del gen,}$

en el que el coeficiente β y el umbral de referencia de un gen dado son aquellos definidos en la tabla 2 a continuación:

Tabla 2

Gen	U_{ref}	Coeficiente β
<i>NME4</i>	3,1864	-1,3207
<i>ITPR3</i>	6,4014	1,0850
<i>SESN3</i>	3,6262	1,0301
<i>ARL4C</i>	2,6286	1,3577
<i>RPLP1</i>	6,3748	1,0101

ii) se determina, para un paciente determinado, un valor $ÍNDICE_{paciente}$ igual a la suma de los $ÍNDICE_{gen}$ de los genes de combinación, y

iii) se compara el $ÍNDICE_{paciente}$ con un umbral final de referencia previamente determinado para la combinación de genes.

El solicitante ha desarrollado así un sistema que permite una comparación simplificada de los niveles de expresión de varios genes. Este sistema de comparación requirió el desarrollo de un coeficiente, el Coeficiente beta (véase la tabla 2 anterior), que permite ponderar la importancia de los diferentes genes dentro del sistema.

De lo anterior se deduce que los $ÍNDICE_{gen}$ solo pueden tomar los siguientes valores (véase la tabla 3 a continuación):

Tabla 3

$ÍNDICE_{NME4} = (+1 \text{ o } -1) \times (-1,3207) = \pm 1,3207$
$ÍNDICE_{ITPR3} = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,0850) = \pm 1,0850$
$ÍNDICE_{SESN3} = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,0301) = \pm 1,0301$
$ÍNDICE_{ARL4C} = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,3577) = \pm 1,3577$
$ÍNDICE_{RPLP1} = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,0101) = \pm 1,0101$

Un $ÍNDICE_{paciente}$ es entonces calculado, que corresponde a la suma de los $ÍNDICE_{gen}$ de los genes de la combinación de los genes marcadores, cuyo nivel de expresión se midió en la etapa a) de los procedimientos de acuerdo con la invención:

$$ÍNDICE_{paciente} = \sum ÍNDICE_{gen}$$

Este $ÍNDICE_{paciente}$ se compara a continuación con un valor de umbral final de referencia previamente determinado por el solicitante para cada combinación de genes marcadores.

A título de ejemplo, para la combinación de los 5 genes, dicho valor de umbral final de referencia es igual a 1,102.

De esta forma, sobre la base del valor de umbral final de referencia definido para cada combinación de genes marcadores, es posible establecer el pronóstico de supervivencia del paciente sometido a ensayo.

De acuerdo con un modo de realización preferido de los procedimientos de la invención, se mide en la etapa a) en una muestra de sangre extraída previamente de un paciente a someter a ensayo, por qPCR, el nivel de expresión en número de ciclos (Ct_{gen}) de los 5 genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* y de los dos genes ubicuos B2M y GAPDH. El nivel de expresión normalizado ΔCt_{gen} de cada uno de los 5 genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* se calcula a continuación de acuerdo con:

$$\Delta Ct_{gen} = Ct_{gen} - (Ct_{B2M} + Ct_{GAPDH})/2$$

Luego se calcula un $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}}$ para cada uno de los genes de acuerdo con:

- 5 - $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}} = +1 \cdot \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta\text{Ct}_{\text{gen}} > \text{umbral de referencia del gen, e}$
 - $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}} = -1 \cdot \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta\text{Ct}_{\text{gen}} < \text{umbral de referencia del gen}$

en el que el coeficiente β y el umbral de referencia de un gen dado son aquellos definidos en la tabla 2 a continuación:

10

Tabla 2

Gen	U_{ref}	Coeficiente β
<i>NME4</i>	3,1864	-1,3207
<i>ITPR3</i>	6,4014	1,0850
<i>SESN3</i>	3,6262	1,0301
<i>ARL4C</i>	2,6286	1,3577
<i>RPLP1</i>	6,3748	1,0101

El $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ es entonces calculado como:

15
$$\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}} = \text{ÍNDICE}_{\text{NME4}} + \text{ÍNDICE}_{\text{ITPR3}} + \text{ÍNDICE}_{\text{SESN3}} + \text{ÍNDICE}_{\text{ARL4C}} + \text{ÍNDICE}_{\text{RPLP1}}$$

Este valor de $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ se compara a continuación con el valor de umbral final de referencia para la combinación de los 5 genes marcadores, es decir 1,102.

- 20 Si un paciente presenta un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102, se considera que tiene un pronóstico de supervivencia a largo plazo, y puede considerarse elegible para el tratamiento a base de gemcitabina. Por el contrario, si un paciente presenta un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ superior a 1,102, esto indica que presenta un pronóstico de supervivencia a corto plazo y que un tratamiento a base de gemcitabina no presentará ningún beneficio o presentará un beneficio escaso. Se debe considerar otro tratamiento.

25

La invención también se refiere a un método de seguimiento de la eficacia de un tratamiento para el cáncer de páncreas por la implementación del procedimiento de acuerdo con la invención descrito anteriormente, ventajosamente a intervalos de tiempo de tratamiento.

- 30 Los expertos en la materia podrán determinar sin dificultad los intervalos de tiempo de tratamiento en los que desean implementar el procedimiento de acuerdo con la invención. Por ejemplo, los intervalos de tiempo apropiados son 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses o 6 meses.

- 35 La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, por ejemplo, superior a 10 meses, ventajosamente superior a 12 meses, incluso más ventajosamente superior a 15 meses, siendo el pronóstico determinado de acuerdo con uno de los procedimientos descritos anteriormente.

- 40 La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente con un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102 calculado de acuerdo con el modo de realización preferido descrito anteriormente.

- 45 La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por un procedimiento *in vitro* que comprende las siguientes etapas:

- 50 a) medir el nivel de expresión de al menos un gen marcador seleccionado entre el grupo constituido por los genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* o genes homólogos, en una muestra de sangre de dicho paciente previamente extraída;
 b) comparar el nivel de expresión medido de o de los genes marcadores seleccionados en la etapa a) en dicho paciente con un umbral de referencia;
 c) evaluar el tiempo de supervivencia en dicho paciente.

- 55 La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por el procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que se mide en la etapa a), el nivel de expresión de al menos dos genes, ventajosamente 3, más ventajosamente 4, y preferentemente 5 genes.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un

paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por un procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que la muestra de sangre es una muestra de sangre total periférica.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por un procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que se mide el nivel de expresión del o de los genes por la medición de la cantidad de la(s) proteína(s) codificada(s) por dicho gen(es) presente(s) en la muestra de sangre.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por un procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que se mide el nivel de expresión de o de los genes por el nivel de transcripción del ARN o ADNc de dicho(s) gen(es).

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por el procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que la etapa a), además del nivel de expresión de un gen (Ct_{gen}) marcador o de cada gen de una combinación de al menos 2 genes marcadores, se mide el nivel de expresión de al menos un gen ubicuo, siendo dichos niveles de expresión medidos en número de ciclos (Ct , "cycle threshold", umbral de ciclo) por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), después se normaliza el nivel de expresión del o de los genes marcadores con respecto al nivel de expresión de al menos un gen ubicuo de acuerdo con

$$\Delta Ct_{gen} = Ct_{gen} - [(media de los) Ct (gen(es) ubicuo(s))]$$

a fin de obtener un nivel de expresión normalizado ΔCt_{gen} para cada gen marcador en el que se ha medido el nivel de expresión.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por el procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que el nivel de expresión normalizado ΔCt de un gen marcador o de cada gen de una combinación de al menos dos genes marcadores se normaliza con respecto a dos genes ubicuos B2M y GAPDH.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por el procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que durante la etapa a), se mide el nivel de expresión de un único gen marcador y durante las etapas b) y c), los umbrales de referencia (U_{ref}) de un gen dado son:

Gen	U_{ref}
NME4	3,1864
ITPR3	6,4014
SESN3	3,6262
ARL4C	2,6286
RPLP1	6,3748

- un nivel de expresión normalizado ΔCt de NME4 superior a 3,1864 y/o
- un nivel de expresión normalizado ΔCt de ITPR3, SESN3, ARL4C y/o RPLP1 inferior respectivamente a 6,4015; 3,6262; 2,6286 y 6,3748 indica un pronóstico de supervivencia a largo plazo.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por el procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que durante la etapa a), se mide el nivel de expresión de una combinación de al menos dos genes marcadores y, durante las etapas b), para cada gen en el que se midió la expresión

i) se determina un valor ÍNDICE_{gen} que depende del nivel de expresión normalizado del gen, definido por:

- $\text{ÍNDICE}_{gen} = +1 \cdot \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta Ct_{gen} > \text{umbral de referencia del gen, e}$
- $\text{ÍNDICE}_{gen} = -1 \cdot \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta Ct_{gen} < \text{umbral de referencia del gen, y}$

en el que el coeficiente β y el umbral de referencia (U_{ref}) de un gen dado son aquellos definidos anteriormente

Gen	U _{ref}	Coefficiente β
<i>NME4</i>	3,1864	-1,3207
<i>ITPR3</i>	6,4014	1,0850
<i>SESN3</i>	3,6262	1,0301
<i>ARL4C</i>	2,6286	1,3577
<i>RPLP1</i>	6,3748	1,0101

ii) se determina, para un paciente determinado, un valor $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ igual a la suma de los $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}}$ de los genes de combinación, y

iii) se compara el $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ con un umbral final de referencia previamente determinado para la combinación de los genes.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un pronóstico de supervivencia a largo plazo, siendo dicho pronóstico de supervivencia a largo plazo determinado por el procedimiento *in vitro* descrito anteriormente, en la que se mide el nivel de expresión de los 5 genes marcadores, siendo el umbral final de referencia de 1,102, un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102 indica un pronóstico de supervivencia a largo plazo.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102, siendo el $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ determinado por el procedimiento de acuerdo con la invención, en el que se mide el nivel de expresión de los 5 genes marcadores, siendo el umbral final de referencia de 1,102, un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102 indica un pronóstico de supervivencia a largo plazo.

La divulgación también se refiere a la gemcitabina para su uso en el tratamiento del cáncer de páncreas en un paciente que presenta un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102, siendo el $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ determinado por un procedimiento *in vitro* que comprende las siguientes etapas:

a) medir el nivel de expresión de una combinación de cinco genes marcadores *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* y de dos genes ubicuos B2M y GADPH en una muestra de sangre de dicho paciente previamente extraída, el nivel de expresión de los genes corresponde al nivel de transcripción del ARN o del ADNc de dichos genes, medido en número de ciclos (Ct, "cycle threshold", umbral de ciclo) por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), siendo el nivel de expresión de los cinco genes marcadores normalizado a continuación con respecto al nivel de expresión de los genes ubicuos de acuerdo con

$$\Delta\text{Ct}_{\text{gen}} = \text{Ct}_{\text{gen}} - [\text{media de los Ct}_{\text{genes ubicuos}}]$$

a fin de obtener un nivel de expresión normalizado $\Delta\text{Ct}_{\text{gen}}$ para cada uno de los cinco genes marcadores, b) comparar el nivel de expresión medido de los genes marcadores seleccionados en la etapa a) en dicho paciente y para cada gen en el que se midió la expresión: i)

se determina un valor $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}}$ que depende del nivel de expresión normalizado del gen, definido por:

- $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}} = +1 \cdot \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta\text{Ct}_{\text{gen}} > \text{umbral de referencia del gen, e}$
- $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}} = -1 \cdot \text{coeficiente } \beta \text{ del gen, si } \Delta\text{Ct}_{\text{gen}} < \text{umbral de referencia del gen, y}$

en el que el coeficiente β y el umbral de referencia (U_{ref}) de un gen dado son aquellos definidos anteriormente

Gen	U _{ref}	Coefficiente β
<i>NME4</i>	3,1864	-1,3207
<i>ITPR3</i>	6,4014	1,0850
<i>SESN3</i>	3,6262	1,0301
<i>ARL4C</i>	2,6286	1,3577
<i>RPLP1</i>	6,3748	1,0101

ii) se determina, para un paciente determinado, un valor $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ igual a la suma de los $\text{ÍNDICE}_{\text{gen}}$ de los genes de combinación, y

iii) se compara el $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ con el umbral final de referencia de 1,102;

c) evaluar el tiempo de supervivencia en dicho paciente, un $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ inferior a 1,102 indica un pronóstico de supervivencia a largo plazo.

La presente divulgación se refiere además a un chip de ADN que tiene en sus superficies, ácidos nucleicos capaces de hibridarse con al menos uno de los genes seleccionados entre el grupo que consiste en *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*, preferentemente al menos 2, 3 o 4 genes y, más preferentemente, para detectar el nivel de

expresión de los 5 genes, opcionalmente con ácidos nucleicos específicos para al menos un gen ubicuo, preferentemente dos genes ubicuos, de manera aún más preferida los ácidos nucleicos específicos de los genes ubicuos *B2M* y *GAPDH*.

5 La presente divulgación también se refiere a un kit para la determinación del pronóstico de cáncer de páncreas en un paciente, que comprende medios para detectar el nivel de expresión de al menos dos genes seleccionados entre el grupo que consiste en *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*, preferentemente al menos 2, 3 o 4 genes y, más preferentemente, para detectar el nivel de expresión de los 5 genes.

10 Los medios para detectar el nivel de expresión pueden ser, por ejemplo, un chip de ADN de acuerdo con la divulgación, un juego de cebadores y un indicador como los agentes fluorescentes, sondas de hidrólisis marcadas, balizas moleculares, sondas de hibridación y anticuerpos.

15 Preferentemente, el kit de acuerdo con la divulgación podrá comprender medios para detectar el nivel de expresión de una combinación de genes seleccionada entre el grupo que consiste en *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*.

De manera más preferente, el kit de acuerdo con la divulgación podrá comprender medios para detectar todas las combinaciones de genes mencionados anteriormente, preferentemente al menos 2, 3 o 4 genes y, más preferentemente, de medios para detectar la combinación de los 5 genes.

20 El kit puede comprender además instrucciones de uso en el procedimiento *in vitro* de acuerdo con la invención.

Finalmente, la divulgación también se refiere al uso de al menos un gen seleccionado entre el grupo que consiste en *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*, para el pronóstico del cáncer de páncreas, en particular, durante un tratamiento a base de gemcitabina.

25 Preferentemente, la divulgación se refiere al uso de al menos una de las combinaciones de 2 a 5 genes seleccionados entre el grupo que consiste en *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* y preferentemente la combinación de 3 genes, más preferentemente de 4 genes, incluso más preferentemente de 5 genes, para el pronóstico del cáncer de páncreas, en particular, durante un tratamiento a base de gemcitabina.

30 La divulgación también se refiere al uso de al menos un gen seleccionado entre el grupo constituido por los genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* o genes homólogos, preferentemente al menos 2, 3 o 4 genes y, más preferentemente, de los 5 genes para el pronóstico de un cáncer de páncreas en un paciente, así como al uso de al menos un gen seleccionado entre el grupo constituido por los genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* o genes homólogos, preferentemente al menos 2, 3 o 4 genes y, más preferentemente, de los 5 genes para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento del cáncer de páncreas, ventajosamente de un tratamiento con gemcitabina, en un paciente.

40 La invención se refiere al uso *in vitro* de una combinación de genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, o una combinación de 5 genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo, *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, *ITPR3* o un gen homólogo del mismo, *SESN3* o un gen homólogo del mismo y *RPLP1* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos 90 % con el gen *NME4*, *ARL4C*, *ITPR3*, *SESN3* o *RPLP1*, respectivamente, para el pronóstico de un cáncer de páncreas, en un paciente.

45 La invención también se refiere al uso *in vitro* de una combinación de genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, o una combinación de 5 genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo, *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, *ITPR3* o un gen homólogo del mismo, *SESN3* o un gen homólogo del mismo y *RPLP1* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos 90 % con el gen *NME4*, *ARL4C*, *ITPR3*, *SESN3* o *RPLP1*, respectivamente, para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento del cáncer de páncreas, ventajosamente de un tratamiento con gemcitabina en un paciente.

La presente invención podrá comprenderse mejor y otras ventajas y características pueden resultar evidentes tras la lectura de los siguientes ejemplos y los dibujos anexos en los que:

60 La figura 1 representa los resultados obtenidos por los inventores en la determinación del umbral de referencia para el gen *NME4*.

La figura 1A representa la distribución de ciertos valores estadísticos de la prueba de Mantel-Cox en función de su valor de ΔCt . Para determinar el límite (punto de corte) entre 2 grupos, se determina el valor máximo obtenido por un individuo para la estadística de la prueba de Mantel-Cox y se utiliza una lectura gráfica que permite determinar el valor del umbral de referencia (U_{ref}) de 3,1864.

La figura 1B representa las curvas de supervivencia calculadas por el método de Kaplan-Meier para los 2 grupos

de supervivencia después del cálculo del valor de umbral. El grupo representado en negro es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es inferior al valor de umbral (U_{ref}) y el grupo representado en gris es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es superior al valor de umbral (U_{ref}). Aquí, el grupo de larga supervivencia es el grupo en negro. El valor p ("p-value") de la prueba de rango logarítmico se indica en la parte superior del gráfico: $P=9,59 \cdot 10^{-5}$.

La figura 2 representa los resultados obtenidos por los inventores en la determinación del umbral de referencia para el gen *ITPR3*.

La figura 2A representa la distribución de ciertos valores estadísticos de la prueba de Mantel-Cox en función de su valor de ΔCt . Para determinar el límite (punto de corte) entre 2 grupos, se determina el valor máximo obtenido por un individuo para la estadística de la prueba de Mantel-Cox y se utiliza una lectura gráfica que permite determinar el valor del umbral de referencia (U_{ref}) de 6,4015.

La figura 2B representa las curvas de supervivencia calculadas por el método de Kaplan-Meier para los 2 grupos de supervivencia después del cálculo del valor de umbral. El grupo representado en negro es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es inferior al valor de umbral (U_{ref}) y el grupo representado en gris es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es superior al valor de umbral (U_{ref}). Aquí, el grupo de larga supervivencia es el grupo en gris. El valor p de la prueba de rango logarítmico se indica en la parte superior del gráfico: $P=0,000219$.

La figura 3 representa los resultados obtenidos por los inventores en la determinación del umbral de referencia para el gen *SESN3*.

La figura 3A representa la distribución de ciertos valores estadísticos de la prueba de Mantel-Cox en función de su valor de ΔCt . Para determinar el límite (punto de corte) entre 2 grupos, se determina el valor máximo obtenido por un individuo para la estadística de la prueba de Mantel-Cox y se utiliza una lectura gráfica que permite determinar el valor del umbral de referencia (U_{ref}) de 3,6262.

La figura 3B representa las curvas de supervivencia calculadas por el método de Kaplan-Meier para los 2 grupos de supervivencia después del cálculo del valor de umbral. El grupo representado en negro es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es inferior al valor de umbral (U_{ref}) y el grupo representado en gris es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es superior al valor de umbral (U_{ref}). Aquí, el grupo de larga supervivencia es el grupo en gris. El valor p de la prueba de rango logarítmico se indica en la parte superior del gráfico: $P=0,000331$.

La figura 4 representa los resultados obtenidos por los inventores en la determinación del umbral de referencia para el gen *ARL4C*.

La figura 4A representa la distribución de ciertos valores estadísticos de la prueba de Mantel-Cox en función de su valor de ΔCt . Para determinar el límite (punto de corte) entre 2 grupos, se determina el valor máximo obtenido por un individuo para la estadística de la prueba de Mantel-Cox y se utiliza una lectura gráfica que permite determinar el valor del umbral de referencia (U_{ref}) de 2,6286.

La figura 4B representa las curvas de supervivencia calculadas por el método de Kaplan-Meier para los 2 grupos de supervivencia después del cálculo del valor de umbral. El grupo representado en negro es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es inferior al valor de umbral (U_{ref}) y el grupo representado en gris es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es superior al valor de umbral (U_{ref}). Aquí, el grupo de larga supervivencia es el grupo en gris. El valor p de la prueba de rango logarítmico se indica en la parte superior del gráfico: $P=0,000472$.

La figura 5 representa los resultados obtenidos por los inventores en la determinación del umbral de referencia para el gen *RPLP1*.

La figura 5A representa la distribución de ciertos valores estadísticos de la prueba de Mantel-Cox en función de su valor de ΔCt . Para determinar el límite (punto de corte) entre 2 grupos, se determina el valor máximo obtenido por un individuo para la estadística de la prueba de Mantel-Cox y se utiliza una lectura gráfica que permite determinar el valor del umbral de referencia (U_{ref}) de 6,3748.

La figura 5B representa las curvas de supervivencia calculadas por el método de Kaplan-Meier para los 2 grupos de supervivencia después del cálculo del valor de umbral. El grupo representado en negro es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es inferior al valor de umbral (U_{ref}) y el grupo representado en gris es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es superior al valor de umbral (U_{ref}). Aquí, el grupo de larga supervivencia es el grupo en gris. El valor p de la prueba de rango logarítmico se indica en la parte superior del gráfico: $P=0,00053$.

La figura 6 representa los resultados obtenidos por los inventores en la determinación del umbral final de referencia para la combinación de los 5 genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C*, *RPLP1*.

La figura 6A representa la distribución de ciertos valores estadísticos de la prueba de Mantel-Cox en función de su valor de ΔCt . Para determinar el límite (punto de corte) entre 2 grupos, se determina el valor máximo obtenido por un individuo para la estadística de la prueba de Mantel-Cox y se utiliza una lectura gráfica que permite determinar el valor del umbral de referencia (U_{ref}) de 1,102.

La figura 6B representa las curvas de supervivencia calculadas por el método de Kaplan-Meier para los 2 grupos de supervivencia después del cálculo del valor de umbral. El grupo representado en negro es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es inferior al valor de umbral (U_{ref}) y el grupo representado en gris es el conjunto de individuos cuyo valor de ΔCt es superior al valor de umbral (U_{ref}). Aquí, el grupo de larga supervivencia es el grupo en gris. El valor p de la prueba de rango logarítmico se indica en la parte superior del gráfico: $P=1,01 \cdot 10^{-08}$.

Ejemplo 1: Identificación de un conjunto de genes para el pronóstico del cáncer de páncreas

1.1 Preparación del ARN

Las muestras de sangre total de 61 pacientes extraídas antes del tratamiento, acondicionadas en tubos de PAXgene

en hielo seco (expedidor: LabConnect, Estados Unidos) fueron recibidas y almacenadas a -80 °C. Fueron nombradas "semana 0".

5 El ARN total se extrajo a partir de las 61 muestras de sangre total y se nombró "semana 0". El análisis del transcriptoma (búsqueda de biomarcadores) solo se realizó en estas muestras "semana 0".

10 Las 61 muestras de ARN fueron analizadas a fin de determinar su calidad. El control de la integridad del ARN se realizó con el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Estados Unidos) utilizando el nanochip "ARN eucariótica total 6000" (Nano Chip 6000 de ARN eucariótica total de Agilent Technologies). La cantidad de ARN fue controlada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (THERMO Scientific). Los ARN purificados fueron conservados a -80 °C.

Una muestra fue eliminada del estudio debido a la mala calidad del ARN ("Número de integridad del ARN" <8).

15 60 muestras de ARN de sangre total, que se corresponden con las muestras de sangre de referencia, se extrajeron a partir de la sangre previamente extraída (tubos de extracción de sangre PAXgene, BD) utilizando el kit de ARN de sangre PAXgene V.2 (PreAnalytix) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

20 Se llevaron a cabo experimentos de expresión génica digital (Digital Gene Expression (EGD)) para seleccionar un conjunto de biomarcadores putativos.

La validación de los biomarcadores se hizo utilizando una plataforma COBAS (LC480, Roche Diagnostics) y los enfoques bioestadísticos apropiados se utilizaron para filtrar los mejores biomarcadores.

Sujeto n.º	Tratamiento	Fallecidos	Supervivencia (días)	Supervivencia (meses)
110	Gemcitabina	SÍ	183	6,0
111	Gemcitabina	NO	744	24,4
112	Gemcitabina	SÍ	112	3,7
113	Gemcitabina	NO	589	19,4
207	Gemcitabina	SÍ	98	3,2
208	Gemcitabina	SÍ	87	2,9
211	Gemcitabina	SÍ	160	5,3
508	Gemcitabina	SÍ	253	8,3
805	Gemcitabina	SÍ	654	21,5
1104	Gemcitabina	SÍ	402	13,2
1203	Gemcitabina	SÍ	252	8,3
1612	Gemcitabina	SÍ	47	1,5
1613	Gemcitabina	SÍ	73	2,4
2009	Gemcitabina	SÍ	113	3,7
2403	Gemcitabina	SÍ	222	7,3
2703	Gemcitabina	SÍ	61	2,0
2704	Gemcitabina	SÍ	134	4,4
3110	Gemcitabina	SÍ	260	8,5
3111	Gemcitabina	SÍ	144	4,7
3308	Gemcitabina	SÍ	217	7,1
3309	Gemcitabina	SÍ	112	3,7
3407	Gemcitabina	SÍ	171	5,6
3408	Gemcitabina	SÍ	350	11,5
3706	Gemcitabina	NO	774	25,4
4407	Gemcitabina	SÍ	135	4,4
4409	Gemcitabina	SÍ	515	16,9
4410	Gemcitabina	NO	708	23,3
4411	Gemcitabina	SÍ	105	3,4
4414	Gemcitabina	SÍ	437	14,4
4415	Gemcitabina	SÍ	17	0,6
4503	Gemcitabina	NO	700	23,0
4702	Gemcitabina	SÍ	31	1,0
4902	Gemcitabina	SÍ	161	5,3
4903	Gemcitabina	NO	602	19,8

(continuación)

Sujeto n.º	Tratamiento	Fallecidos	Supervivencia (días)	Supervivencia (meses)
5008	Gemcitabina	SÍ	588	19,3
5201	Gemcitabina	SÍ	584	19,2
5202	Gemcitabina	SÍ	43	1,4
5331	Gemcitabina	SÍ	699	23,0
5336	Gemcitabina	SÍ	486	16,0
5339	Gemcitabina	SÍ	65	2,1
5340	Gemcitabina	SÍ	356	11,7
5341	Gemcitabina	SÍ	120	3,9
5342	Gemcitabina	SÍ	393	12,9
5344	Gemcitabina	SÍ	667	21,9
5345	Gemcitabina	SÍ	251	8,2
5346	Gemcitabina	SÍ	163	5,4
5703	Gemcitabina	SÍ	261	8,6
5901	Gemcitabina	SÍ	555	18,2
6201	Gemcitabina	SÍ	52	1,7
6303	Gemcitabina	SÍ	269	8,8
8001	Gemcitabina	SÍ	458	15,0
8003	Gemcitabina	SÍ	335	11,0
8106	Gemcitabina	SÍ	461	15,1
8901	Gemcitabina	SÍ	460	15,1
9312	Gemcitabina	SÍ	141	4,6
9508	Gemcitabina	SÍ	169	5,6
9509	Gemcitabina	SÍ	318	10,4
9901	Gemcitabina	SÍ	153	5,0
10303	Gemcitabina	SÍ	131	4,3
10304	Gemcitabina	SÍ	234	7,7
11207	Gemcitabina	SÍ	231	7,6

1.2. Construcción de la biblioteca de EGD y cartografía baliza-gen

Las muestras de ARN se dividieron en 2 grupos:

- M4: corresponde a los pacientes que recibieron, después de la toma de muestras de sangre de referencia, gemcitabina y fallecen antes del mes 4;
- M15: corresponde a los pacientes que recibieron, después de la toma de muestras de sangre de referencia, gemcitabina y viven después del mes 15.

Para cada grupo, se mezclaron cantidades equimolares de cada muestra de ARN total de los pacientes a fin de constituir un agrupamiento de ARN total.

6 bibliotecas de tipo EGD (técnica repetida tres veces para cada grupo) fueron construidas a partir de dichos agrupamientos.

Las bibliotecas se construyeron con el kit previsto a tal efecto de la sociedad Illumina (kit de perfilado con etiqueta EGD) de acuerdo con el protocolo del fabricante (versión 2.1B), utilizando 2 µg de ARN total.

La secuenciación y los análisis posteriores se realizaron utilizaron el dispositivo Pipeline de Illumina.

Se utilizó la plataforma MGX (Montpellier, Francia).

Los datos de cada biblioteca de EGD fueron analizados con el software de BIOTAG (Acobiom, Montpellier, Francia) para la detección y el recuento de las balizas, y la evaluación de la calidad de las bibliotecas de EGD (Piquemal *et al.*, 2002).

1.3. Marcado y selección de balizas

Una base de datos que compila las secuencias de *Homo sapiens* y las informaciones conexas se generó a partir de secuencias resultantes de la base de datos UniGene (construido n.º 232, marzo de 2012, NCBI).

Para cada secuencia de la base de datos, la baliza EGD esperada (baliza canónica) situada aguas arriba del sitio de

restricción NlaIII (CATG) más cercano al extremo 3' de la secuencia (R1), así como las balizas putativas situadas en posiciones interiores (etiquetada R2, R3 y R4 a partir del extremo 3' del transcrito), fueron extraídas (Piquemal *et al.*, 2002).

5 Las balizas experimentales obtenidas a partir de las bibliotecas de EGD fueron emparejadas y marcadas (coincidencias exactas para 17 pb) utilizando esta colección de balizas virtuales. En primer lugar se buscó una coincidencia para cada baliza experimental con las balizas canónicas virtuales (R1). A continuación, las balizas experimentales no emparejadas con las balizas R2, luego con R3 y R4 fueron marcadas.

10 Los análisis de los experimentos de EGD se realizaron utilizando el método edgeR (versión 2.6.9, Bioconductor). Los genes analizados fueron seleccionados en función de (1) filtros matemáticos con el mayor factor de variación diferencial, "differential Fold Change", >1,5).

15 La tasa de falsos positivos (FDR) es un valor p ("pvalue") ajustado (aquí se establece FDR < 10 %) que se calcula basándose en el error de tipo 1 ($\alpha=5\%$) notificado en las consideraciones generales. (J.R. Statist. Soc. B, 2010, Discovering the false discovery rate, Y Benjamini)
(2) filtros biológicos con la implementación de genes diana en procesos específicos y vías metabólicas conocidas.

1.4. Síntesis de ADNc para la qPCR

20 Se realizaron transcripciones inversas para cada una de las 60 muestras de ARN en 20 μ l de volumen de reacción final con 300 ng de ARN total utilizando 200 unidades de enzima SuperScript II (M-MLV tipo TA, Invitrogen) y 250 ng de cebadores aleatorios de acuerdo con las instrucciones del fabricante (25 °C, 10 min, 42 °C, 50 min, 70 °C 15 min), el mismo día con la misma pipeta y los mismos manipuladores.

1.5. qPCR

La validación de los genes diana se llevó a cabo por qPCR en una plataforma de Roche Diagnostics.

30 Los experimentos de qPCR se realizaron utilizando una mezcla de LightCycler® 480 DNA SYBR Green Master (Roche Diagnostics) en un aparato LightCycler480® de Roche Diagnostics de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

35 Para las dosificaciones con SYBR Green, la mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera en un volumen final de 10 μ l: 5 μ l de LightCycler 480 DNA SYBR Green Master 2X (Roche), 4 μ l de pares de cebadores de 50 μ M (Eurogentec), 1 μ l de matriz de ADNc (1/15 de dilución final).

El programa de PCR consiste en una primera etapa de preincubación a 95 °C durante 10 minutos seguido de 45 ciclos de PCR (95 °C durante 10 s), 63 °C durante 15 s y 72 °C durante 15 s).

40 Para discriminar los productos específicos de los productos no específicos y dímeros de cebadores, se obtuvo una fusión por aumento progresivo de la temperatura de 65 a 97 °C.

Tabla 4: cebadores correspondientes a los 5 biomarcadores utilizados para la qPCR, así como los 2 genes de referencia (*genes ubicuos).

Biomarcador	Cebador sentido	Cebador antisentido
<i>NME4</i>	CATGATTGGACACACCGACTC (SEQ ID NO. 1)	GACGCTGAAGTCACCCCTTAT (SEQ ID NO. 2)
<i>ITPR3</i>	TCCTGGGGAAGAGTTGTACG (SEQ ID NO. 3)	AGGAGAAAAACAAGCGGTCA (SEQ ID NO. 4)
<i>SESN3</i>	TTGCCCTTTGTAGTCCTGTGC (SEQ ID NO. 5)	CATTAGTCCAGTCACGTGCTTC (SEQ ID NO. 6)
<i>ARL4C</i>	AAAGCCCTGTGGTGTATCAA (SEQ ID NO. 7)	GCTTCCTCTGTTGGGTCAGA (SEQ ID NO. 8)
<i>RPLP1</i>	TGGGCTTTGGTCTTTTGGAC (SEQ ID NO. 9)	CAGACCATTTTGCAGAGCA (SEQ ID NO. 10)
<i>B2M*</i>	GCTCAGTAAAGACACAACCATCC (SEQ ID NO. 11)	CATCTGTGGATTGAGCAAACC (SEQ ID NO. 12)
<i>GAPDH*</i>	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG (SEQ ID NO. 13)	GGGGTCATTGATGGCAACAATA (SEQ ID NO. 14)

Los datos de la qPCR se analizaron utilizando el método Delta.Ct (Δ Ct) (Livak y Schmittgen, 2001). Para todos los genes diana, los valores de Δ Ct se determinaron aplicando la fórmula

$$\Delta Ct = y(\text{gen}) - [Ct(B2M) + Ct(GAPDH)]/2$$

Los dos genes ubicuos son:

- *B2M* (NM_009735, beta-2 microglobulina de *Mus musculus*, ARNm) y
- *GAPDH* (NM_002046, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, variante de transcripción 1, ARNm + NM_001256799 gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Homo sapiens*, variante de transcripción 2, ARNm).

5 1.6. Resultados

Identificación de la huella genética

10 Por medio del método de EGD, se realizaron perfiles transcriptómicos de sangre total de los pacientes y se seleccionaron 169 genes con el método edgeR, como se describe en el punto 1.3.

En un ensayo de qPCR, una reacción positiva es detectada por una acumulación de una señal fluorescente.

15 El Ct se define como el número de ciclos de PCR necesarios para que la señal fluorescente cruce el ruido de fondo, el valor Ct es inversamente proporcional a la cantidad de ácido nucleico diana de la muestra. Así, cuanto más bajo es el valor de Ct, más elevada es la cantidad de ácido nucleico diana en la muestra.

20 También se realizó un estudio farmacogenómico auxiliar. Muestras de ARN de sangre de 61 pacientes fueron extraídas antes de cualquier tratamiento y analizadas por RT-PCR.

Una huella genética pro-metastásica ("genetic pro-metastatic fingerprint") presente en el 65 % de los pacientes, altamente predictiva de la supervivencia global, y, además, en interacción con el tipo de tratamiento, ha sido resaltada. Los pacientes tratados con gemcitabina, que presentan la huella genética pro-metastásica tienen una baja tasa de supervivencia general (OS) (5,0 meses).

25 Los genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1* fueron seleccionados por los inventores entre los 169 genes, de acuerdo con la naturaleza multifactorial de esta indicación.

Nombre	Descripción	Identificante Ensembl	Identificante Genbank (ejemplo de ARNm)
<i>NME4</i>	Homo sapiens NME/NM23 nucleósido difosfato quinasa 4	ENSG00000103202	ENSDG00000103202 (SEQ ID NO. 15) NM_001286433.1 (SEQ ID NO. 16) NM_001286439.1 (SEQ ID NO. 17) NM_001286440.1 (SEQ ID NO. 18) NM_001286438.1 (SEQ ID NO. 19) NM_001286436.1 (SEQ ID NO. 20) NM_005009.2 (SEQ ID NO. 21) NM_001286435.1 (SEQ ID NO.22)
<i>ITPR3</i>	inositol 1,4,5-trifosfato receptor, de tipo 3	ENSG00000096433	ENSG00000096433 (SEQ ID NO. 23) NM_002224.3 (SEQ ID NO. 24) XM_011514576.1 (SEQ ID NO. 25) XM_011514577.1 (SEQ ID NO. 26)
<i>SESN3</i>	sestrina 3	ENSG00000149212	ENSG00000149212 (SEQ ID NO. 27) NM_001271594.1 (SEQ ID NO. 28) NM_144665.3 (SEQ ID NO. 29)

(continuación)

Nombre	Descripción	Identificante Ensembl	Identificante Genbank (ejemplo de ARNm)
<i>ARL4C</i>	factor de ribosilación del ADP similar a 4C	ENSG00000188042	NM_005737 (SEQ ID NO. 30) AJ579850* (SEQ ID NO. 31) AJ57985* (SEQ ID NO. 32) NM_001282431.1 (SEQ ID NO. 33) NM_005737.3 (SEQ ID NO. 34)
<i>RPLP1</i>	Gran proteína ribosómica P1	ENSG00000137818	NM_001003 (SEQ ID NO. 35) NM_213725 (SEQ ID NO. 36) NM_001003.2 (SEQ ID NO. 37) NM_213725.1 (SEQ ID NO. 38)
<i>GAPDH</i>	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	ENSG00000111640	NM_002046 (SEQ ID NO. 39) NM_001256799 (SEQ ID NO. 40)
<i>B2M</i>	beta-2 microglobulina	ENSG00000166710	NM_009735 (SEQ ID NO. 41)
*: Variantes de empalme del transcrito del gen ARL7 (ARNm de Homo sapiens para la proteína 7 similar al factor de ribosilación del ADP (gen ARL7), variante de corte y empalme 1 (ENSG00000188042), conocidas como homónimos de ARL4C.			

La identificación de la huella genética descrita aquí abre una nueva vía para la terapia personalizada en esta indicación.

- 5 La huella genética pro-metastásica, basada en un valor específico de Delta.Ct (ΔCt) puede ser normalmente determinada por RT-PCT a partir de ARN de muestras de sangre. El valor ΔCt que ilustra el nivel de expresión de un gen determinado en un paciente determinado se obtiene por amplificación por RT-PCR del gen determinado y tras la normalización con respecto a los genes de referencia (B2M, GAPDH). Cuanto más bajo es el valor de ΔCt , más elevado es el nivel de expresión del gen.

- 10 Los pacientes con un alto pronóstico de supervivencia y/o elegibles para el tratamiento con gemcitabina presentan un valor ÍNDICE específico.

Determinación de ÍNDICE

- 15 Más precisamente, cada gen identificado (*NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*), se evaluó por su valor pronóstico de supervivencia global en una población tipo de pacientes que padecen cáncer de páncreas (población de referencia), antes de que dichos pacientes reciban tratamiento (véase el punto 1.1).

- 20 En dicha población de referencia y para los 5 genes identificados (*NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*), un valor de umbral de ΔCT ha sido definido por qPCR.

- 25 A continuación, para los 5 genes identificados (*NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*), un modelo de Mantel-Cox (o prueba de Log-Rank, "prueba de rango logarítmico") analizó la diferencia de supervivencia entre la supervivencia a largo plazo y la supervivencia a corto plazo, y estableció un "umbral de referencia" (U_{ref}) y un "coeficiente beta" para cada gen identificado. Esta prueba de rango logarítmico permite la comparación entre dos grupos cuyas curvas de supervivencia fueron calculadas por el método de Kaplan Meier. Se comprueba la hipótesis nula H_0 de igualdad de las funciones de supervivencia en los dos grupos considerados. Con H_0 , el riesgo de fallecimiento es el mismo en un momento dado T_i entre los dos grupos, por lo tanto, se espera una proporción de fallecimientos idéntica en estos (Bland y Altman, 2004).

- 30 La siguiente tabla 2 anterior presenta los valores del umbral de referencia (U_{ref}) y del coeficiente beta obtenidos para los 5 genes *NME4*, *ITPR3*, *SESN3*, *ARL4C* y *RPLP1*, en la población de referencia.

35

Tabla 2: umbral y coeficiente beta (coeficiente β) para los 5 genes identificados

Nombre	U_{ref}	Coeficiente β
<i>NME4</i>	3,1864	-1,3207
<i>ITPR3</i>	6,4014	1,0850
<i>SESN3</i>	3,6262	1,0301
<i>ARL4C</i>	2,6286	1,3577
<i>RPLP1</i>	6,3748	1,0101

Un nivel de expresión normalizado ΔCt de NME4 superior a 3,1864, y/o

- 5 - un nivel de expresión normalizado ΔCt de ITPR3, SESN3, ARM4C y/o RPLP1 inferior respectivamente a 6,4015; 3,6262; 2,6286 y 6,3748, indica un pronóstico de supervivencia a largo plazo, mientras que
- un nivel de expresión normalizado ΔCt de NME4 inferior a 3,1864, y/o
- un nivel de expresión normalizado ΔCt de ITPR3, SESN3, ARM4C y/o RPLP1 superior respectivamente a 6,4015; 3,6262; 2,6286 y 6,3748, indica un pronóstico de supervivencia a corto plazo.

10

El pronóstico puede ser perfeccionado tomando una combinación de los 5 genes de la tabla 2.

El valor ΔCT obtenido se corrige entonces a una variable que puede tomar dos valores:

- 15 - +1 si el valor ΔCT de las muestras es estrictamente superior al valor de U_{ref} definido para el gen considerado;
- -1 si el valor ΔCT de las muestras es estrictamente inferior al valor de U_{ref} definido para el gen considerado.

Esto permite entonces definir para cada gen considerado un valor ÍNDICE que se calcula de acuerdo con: $\text{ÍNDICE} = (+1 \text{ o } -1) \times (\text{coeficiente } \beta)$.

20

De esta forma, para los genes considerados, el ÍNDICE calculado sobre la población de referencia de pacientes que padecen cáncer de páncreas puede tomar los valores dados en la siguiente tabla 3:

Tabla 3

$\text{ÍNDICE } NME4 = (+1 \text{ o } -1) \times (-1,3207) = +/- 1,3207$
$\text{ÍNDICE } ITPR3 = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,0850) = +/- 1,0850$
$\text{ÍNDICE } SESN3 = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,0301) = +/- 1,0301$
$\text{ÍNDICE } ARL4C = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,3577) = +/- 1,3577$
$\text{ÍNDICE } RPLP1 = (+1 \text{ o } -1) \times (+1,0101) = +/- 1,0101$

25

Es el ÍNDICE de la combinación de genes escogido para evaluar el pronóstico de supervivencia del paciente que permitirá establecer el pronóstico.

- 30 El modelo de Mantel-Cox (o prueba de rango logarítmico) que tiene en cuenta los ÍNDICE calculados permitió determinar un "umbral final de referencia" para cada una de las combinaciones, que permitirá establecer el pronóstico de supervivencia del paciente sometido a ensayo.

El valor del umbral final de referencia para la combinación de los 5 genes considerados es igual a 1,102.

- 35 Sobre la base del valor de umbral final de referencia definido para cada gen o para combinación, es posible establecer el pronóstico de supervivencia del paciente sometido a ensayo:

- si el $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ calculado en el paciente sometido a ensayo es inferior al valor de umbral final de referencia, entonces el pronóstico es una supervivencia a largo plazo y
- 40 - si el $\text{ÍNDICE}_{\text{paciente}}$ calculado en el paciente sometido a ensayo es superior al valor de umbral final de referencia, entonces el pronóstico es una supervivencia a corto plazo.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para establecer un pronóstico de supervivencia en un paciente que padece cáncer de páncreas, que comprende las siguientes etapas:
 - a) medir el nivel de expresión de cada gen de una combinación de genes marcadores seleccionados entre el grupo constituido por genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos el 90 % con el gen *NME4* o *ARL4C*, respectivamente, en una muestra de sangre de dicho paciente previamente extraída;
 - b) comparar el nivel de expresión medido de los genes marcadores seleccionados en la etapa a) en dicho paciente con un umbral de referencia;
 - c) evaluar el tiempo de supervivencia en dicho paciente.
2. Procedimiento *in vitro* para predecir o evaluar la eficacia y/o el beneficio de un tratamiento para el cáncer de páncreas en un paciente que padece dicha patología, que comprende las siguientes etapas:
 - a) medir el nivel de expresión de cada gen de una combinación de genes marcadores seleccionados entre el grupo constituido por genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos el 90 % con el gen *NME4* o *ARL4C*, respectivamente, en una muestra de sangre de dicho paciente previamente extraída;
 - b) comparar el nivel de expresión medido de los genes marcadores seleccionados en la etapa a) en dicho paciente con un umbral de referencia;
 - c) evaluar el tiempo de supervivencia en dicho paciente.
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** dicho tratamiento es un tratamiento con gemcitabina.
4. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** en la etapa a) se mide el nivel de expresión de cada gen de una combinación de genes marcadores seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo, *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, *ITPR3* o un gen homólogo del mismo, *SESN3* o un gen homólogo del mismo y *RPLP1* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos el 90 % con el gen *NME4*, *ARL4C*, *ITPR3*, *SESN3* o *RPLP1*, respectivamente.
5. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de sangre total periférica.
6. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se mide el nivel de expresión de los genes por la medición de la cantidad de las proteínas codificadas por dichos genes presentes en la muestra de sangre.
7. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que se mide el nivel de expresión de los genes por el nivel de transcripción del ARN o del ADNc de dichos genes.
8. Método de seguimiento de la eficacia de un tratamiento para el cáncer de páncreas, ventajosamente de un tratamiento con gemcitabina, por la implementación del procedimiento descrito en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, ventajosamente a intervalos de tiempo de tratamiento.
9. Uso *in vitro* de una combinación de genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, o una combinación de 5 genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo, *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, *ITPR3* o un gen homólogo del mismo, *SESN3* o un gen homólogo del mismo y *RPLP1* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos el 90 % con el gen *NME4*, *ARL4C*, *ITPR3*, *SESN3* o *RPLP1*, respectivamente, para el pronóstico de un cáncer de páncreas, en un paciente.
10. Uso *in vitro* de una combinación de genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo y *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, o una combinación de 5 genes seleccionados entre el grupo constituido por los genes *NME4* o un gen homólogo del mismo, *ARL4C* o un gen homólogo del mismo, *ITPR3* o un gen homólogo del mismo, *SESN3* o un gen homólogo del mismo y *RPLP1* o un gen homólogo del mismo, siendo dichos genes homólogos genes que presentan un grado de identidad de secuencia de al menos el 90 % con el gen *NME4*, *ARL4C*, *ITPR3*, *SESN3* o *RPLP1*, respectivamente, para el seguimiento de la eficacia de un tratamiento para el cáncer de páncreas, ventajosamente de un tratamiento con gemcitabina en un paciente.

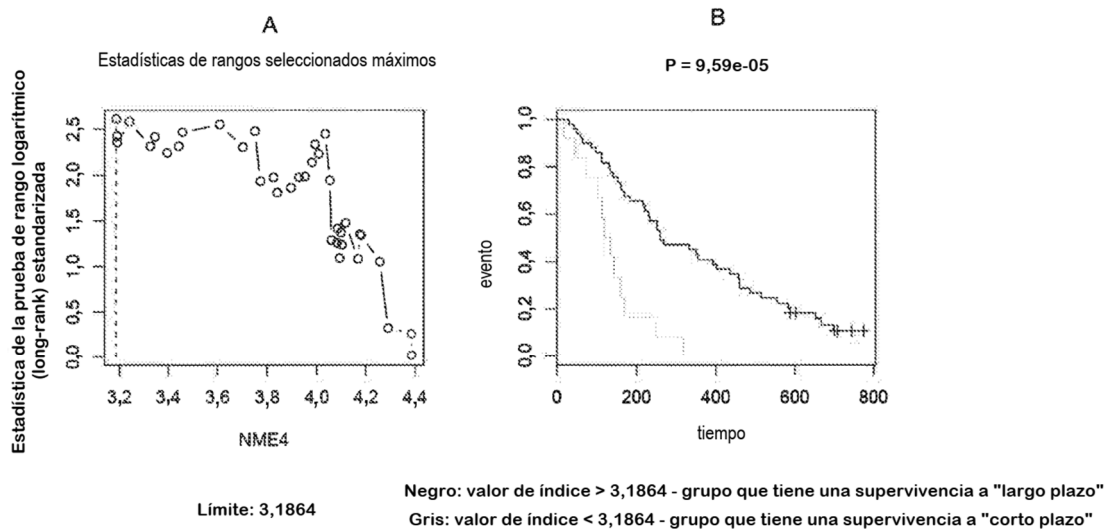


Fig. 1

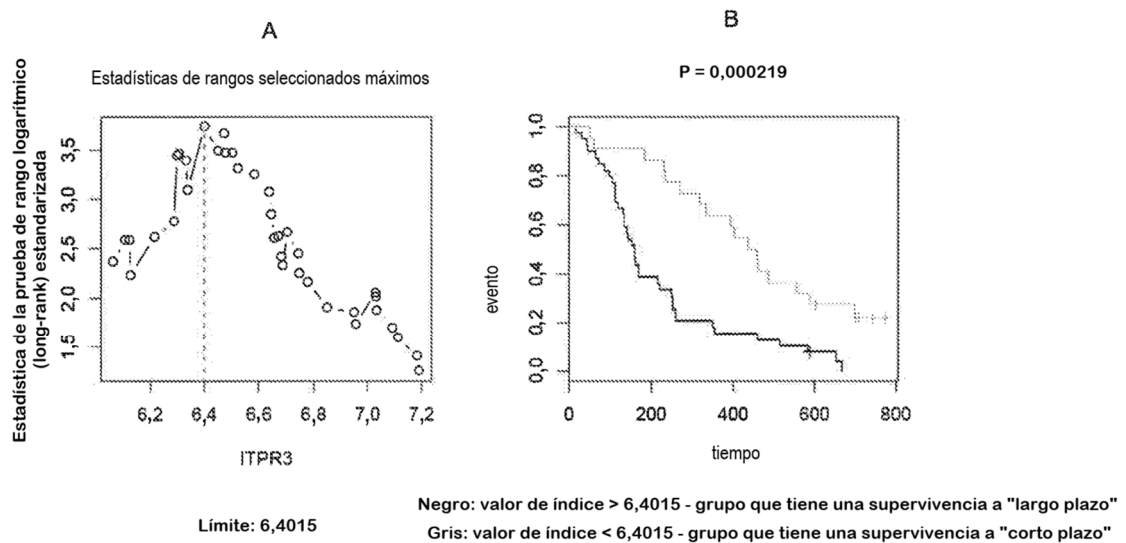


Fig.2

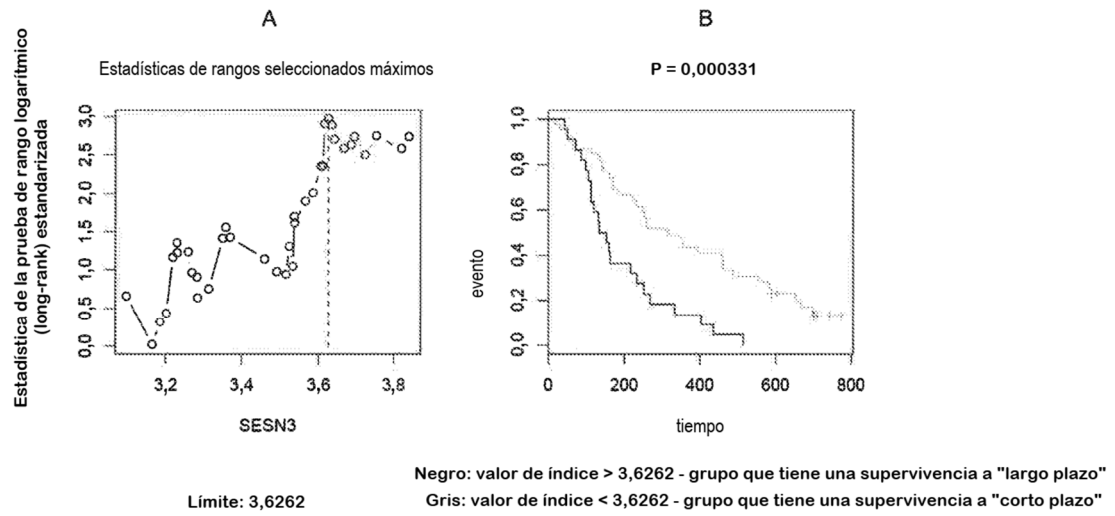


Fig. 3

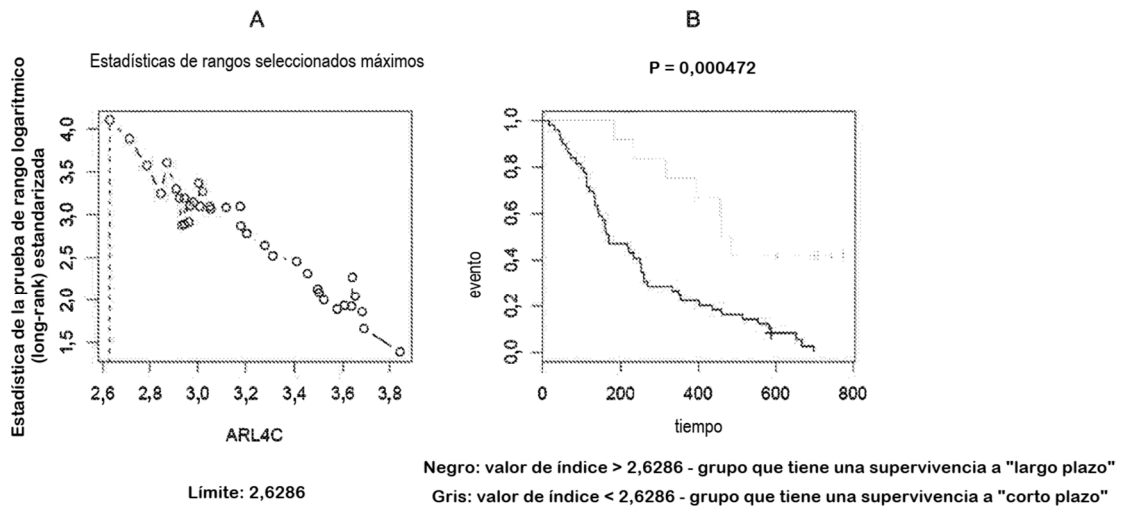


Fig. 4

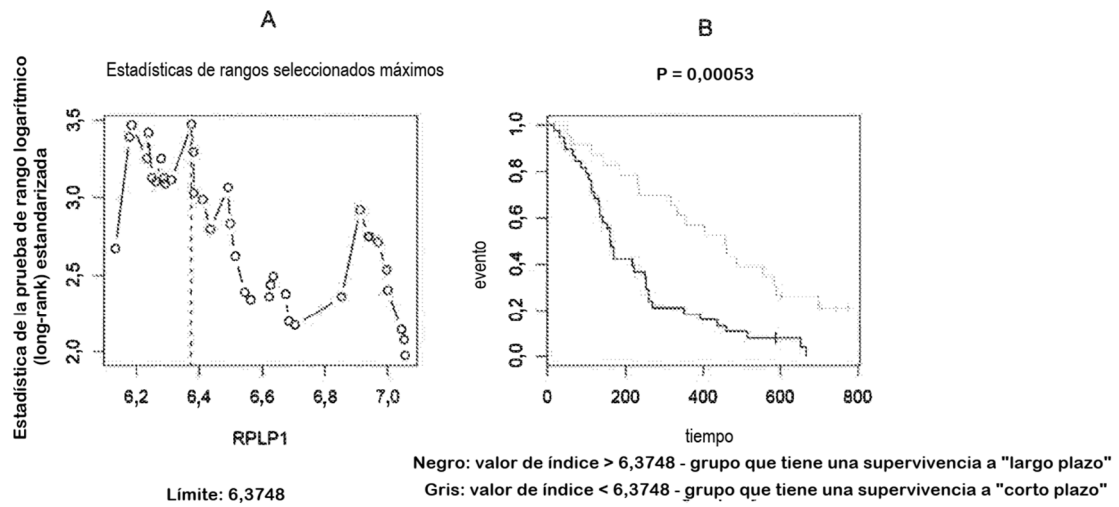


Fig. 5

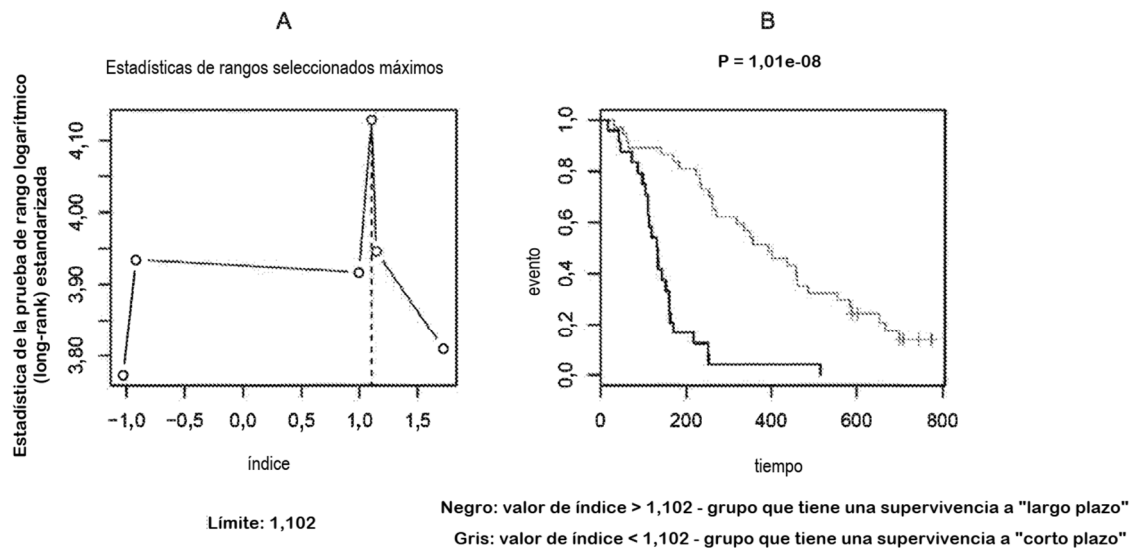


Fig. 6