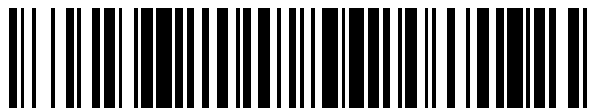


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 823**

21 Número de solicitud: 201330897

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

14.06.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.01.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070495

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (33.3%)
HOSPITAL REAL. C/ Hospicio, s/n
18071 Granada ES;
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%) y
UNIVERSIDAD DE JAEN (33.3%)**

72 Inventor/es:

**TORRES PERALES, Carolina;
PERALES ROMERO, Sonia;
DELGADO PÉREZ, Juan Ramón;
IRIGOYEN MEDINA, Antonio;
ALEJANDRE PÉREZ, María José;
IGLESIAS GÓMEZ, José;
PALOMINO MORALES, Rogelio;
CABA PÉREZ, Octavio;
PRADOS SALAZAR, José Carlos;
ARÁNEGA JIMÉNEZ, Antonia y
LINARES GIL, Ana**

74 Agente/Representante:

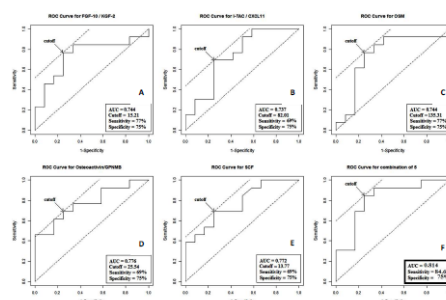
TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **BIOMARCADORES, MÉTODO Y KIT PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DEL
ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS**

57 Resumen:

Biomarcadores, método y kit para el diagnóstico temprano del adenocarcinoma ductal de páncreas. Biomarcadores, método y kit de diagnóstico temprano de cáncer de páncreas, en particular, de adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC).

Fig. 1



ES 2 526 823 A1

DESCRIPCIÓN**BIOMARCADORES, MÉTODO Y KIT PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DEL ADENOCARCINOMA DUCTAL DE PÁNCREAS****CAMPO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina. Específicamente, se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico temprano del adenocarcinoma ductal de páncreas. El diagnóstico precoz se realiza mediante el análisis de los biomarcadores *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El adenocarcinoma ductal de páncreas (PADC) posee una de las tasas de mortalidad más altas entre todos los tipos de cáncer. Los nuevos casos de este cáncer alcanzaron los 44.000 individuos el año pasado (2012) y de ellos, 37.400 murieron (el

15 85%). Hombres y mujeres tienen aproximadamente un riesgo similar de padecerlo (Siegel *et al.*, 2012. *C.A. Cancer J. Clin.* 62, 10-29). Entre los motivos de la escasa respuesta al tratamiento se encuentran el diagnóstico tardío dado que en la mayoría de los casos cuando el cáncer es detectado se ha producido metástasis y los mecanismos intrínsecos de resistencia a la quimioterapia (Hidalgo, 2010. *N. Engl. J.*

20 *Med.* 362, 1605-1617; Sakar *et al.* 2007. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 224, 326-336). Debido al impacto que el diagnóstico temprano tiene en la supervivencia de los pacientes (Agarwal *et al.*, 2008. *Pancreas* 36, 15-20), son necesarias mejores herramientas de diagnóstico sencillas para la detección y evaluación de la enfermedad. El suero es la mejor opción para obtener muestras donde estudiar los

25 tumores malignos ya que puede ser tomado por métodos no invasivos. En el caso del cáncer de páncreas es especialmente útil ya que el acceso al órgano diana es muy difícil. Por estas razones, los biomarcadores del cáncer basados en suero constituyen las pruebas de detección más sencillas. Hasta la fecha, el único biomarcador basado en suero para el PDAC usado es el antígeno carbohidrato 19-9 (CA), con sensibilidad

30 entre el 70 y 90% y especificidad entre el 70 y 98%, dependiendo del tamaño del tumor (Chan *et al.*, 2012. *J. Proteomics*). No obstante, este biomarcador no es detectado si el tamaño del tumor es menor a 2 centímetros y por la falta de expresión en el 10% de los pacientes. Esto también ocurre en otras patologías. Por ello y desde

hace poco, la Sociedad Americana de Oncología no recomienda CA 19-9 para las pruebas de detección del PADC (Duffy *et al.*, 2010. *Ann. Oncol.* 21, 441-447)

Existe una estrecha relación entre los procesos inflamatorios y la carcinogénesis (Mantovani *et al.*, 2008. *Nature* 454, 436-444; Germano *et al.*, 2008. *Cytokine* 43, 374-379). El cáncer pancreático está caracterizado por una densa reacción desmoplásica, la cual representa una barrera importante que previene la liberación efectiva de los agentes quimioterapéuticos en el sitio principal de la enfermedad. Además, el microambiente del complejo tumoral nutre la invasión y metástasis del cáncer pancreático (Shields *et al.*, 2012. *Biochem J.* 441, 541-542; Nesse *et al.*, 2011. *Gut.* 60, 861-868; Luo *et al.*, 2012. *Biochim. Biophys Acta.* 1826, 170-178). Las citoquinas liberadas por células cancerosas o por células en el interior del microambiente tumoral son los arquitectos de esta reacción. Teniendo en cuenta lo anterior, consideramos que una modulación en los niveles de citoquinas podría reflejar los procesos que llevan al desarrollo de la enfermedad o a la quimioresistencia.

Los arrays basados en anticuerpos representan una herramienta útil para el descubrimiento de biomarcadores del cáncer. Esta metodología destaca por su capacidad de ofrecer percepciones rápidas y correctas para la detección temprana de biomarcadores del cáncer, aportando nuevos enfoques para terapias contra el cáncer (Bremann *et al.*, 2010. *Nat. Rev. Cancer* 10, 605-617)

Por tanto la identificación y validación de biomarcadores individuales o conjuntos de biomarcadores para la rápida detección del PDAC (biomarcadores diagnóstico) ayudaría a incrementar la supervivencia de los pacientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los genes (y/o proteínas) *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, para el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas. El uso puede ser simultáneo o puede elegirse cualquiera de los genes (y/o proteínas), o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC)

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

- a) Obtener una muestra aislada del individuo.
- b) cuantificar el producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que consiste en: *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*.

5 Se puede cuantificar el producto de expresión de todos los genes simultáneamente, o puede elegirse cualquiera de los genes (y/o proteínas), o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende:

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

10 En una realización preferida del método de la invención, los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer de páncreas que comprende los pasos (a)-(c) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos que
15 padecen cáncer de páncreas cuando presentan una cantidad de producto de expresión de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, superior a la cantidad de referencia.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC)

20 En una realización preferida del método de la invención, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es una muestra de sangre.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de expresión de cualquiera de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF* se realiza mediante un inmunoensayo.

25 En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*).

Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo para tratar un individuo que padece cáncer de páncreas (o alternativamente al uso de un anticuerpo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas),
30 identificable por un método de la invención, donde el anticuerpo se selecciona de entre anti-*FGF-10*, anti-*CXCL11*, anti-*OSM*, anti-*GPNM* y anti-*SCF*, o cualquiera de sus

combinaciones. Preferiblemente se emplea una combinación de todos los anticuerpos anteriores. En otra realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC).

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente modulador de al menos uno de los genes que se seleccionan de entre *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*; *GPNMB* y *SCF*, para tratar a un individuo que padece cáncer de páncreas (o alternativamente al uso de una composición farmacéutica que comprende un agente modulador de al menos uno de los genes que se seleccionan de entre *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF* en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas), y más preferiblemente del adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC), identificable por un método de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar la cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de entre *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF* o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida, el kit de la presente invención comprende los anticuerpos que se seleccionan de la lista que consiste en anticuerpos: anti-*FGF-10*, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*, anti- *GPNM* y anti-*SCF*, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el kit de la invención comprende simultáneamente al menos un anticuerpo de cada tipo: anti-*FGF-10*, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*, anti- *GPNM* y anti-*SCF*.

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un soporte sólido, o chip de proteínas, que comprende al menos uno de los anticuerpos anti-*FGF-10*, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*, anti- *GPNM* y anti-*SCF*, o cualquiera de sus combinaciones, para llevar a cabo el cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un soporte sólido, o chip de DNA, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de al menos uno de los genes *FGF-10*, *CXCL11*,

OSM, *GPNM* y *SCF*. Preferiblemente, comprende los oligonucleótidos capaces de detectar el ARNm de todos los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNM* y *SCF*.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

5 Los autores de la presente invención han analizado los miembros de la familia de las citoquinas en individuos sanos, en individuos que padecen PDAC sin tratar y en individuos que padecen PDAC que han sido sometidos al tratamiento con Gemcitabina y Erlotinib. Han encontrado una serie de marcadores que les permite el diagnóstico temprano de los individuos con PDAC. Así la presente invención proporciona un
10 método de obtención de datos útiles para el diagnóstico temprano de individuos con PDAC.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los genes (y/o proteínas) *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, para el diagnóstico temprano del cáncer de páncreas. El uso puede ser simultáneo o puede elegirse cualquiera de los
15 genes (y/o proteínas), o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC)

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

- d) Obtener una muestra aislada del individuo.
- e) cuantificar el producto de expresión de los genes que se seleccionan de la lista que consiste en: *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*.

Se puede cuantificar el producto de expresión de todos los genes simultáneamente, o
25 puede elegirse cualquiera de los genes (y/o proteínas), o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende:

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

En una realización preferida del método de la invención, los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computarizada en el paso (c).

- 5 Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer de páncreas que comprende los paso (a)-(c) del primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos que padecen cáncer de páncreas cuando presentan una cantidad de producto de expresión de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, superior
- 10 a la cantidad de referencia. Puede presentar una cantidad de producto de expresión de cualquiera de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, o de todos ellos simultáneamente, superior a la cantidad de referencia.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por

15 un experto en la materia.

En una realización preferida del método de la invención, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es una muestra de sangre, y aún más preferiblemente suero

El término “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término “individuo” no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y

20 condición física.

La detección la cantidad de producto de expresión de *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF* puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la

25 cantidad o la concentración de anticuerpos frente a estas citoquinas de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diagnosticar de manera temprana a individuos que padecen adenocarcinoma ductal de páncreas.

Los niveles de expresión de los genes van a dar un determinado perfil de expresión

30 génica. El término “nivel de expresión”, también denominado “cantidad producto génico” o “cantidad de producto de expresión” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen. Se

entiende por “perfil de expresión génica” el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNNB* y *SCF*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes se realiza, preferiblemente, determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica.

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

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

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de los genes o de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de los productos de expresión de los genes de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La

comparación descrita en el apartado (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen la enfermedad.

A continuación se describen las características de las citoquinas que son objeto del estudio:

El gen *FGF-10* ó *fibroblast growth factor 10* (*KGF-2: keratinocyte growth factor 2*) se encuentra en el cromosoma 5 (5p13-p12). Este factor ha sido descrito como un promotor de la morfogénesis en etapas primarias de la organogénesis así como un regulador de la proliferación de células progenitoras epiteliales pancreáticas (*Bhushan et al.*, 2001. *Development* 128, 5109-5117). Recientemente, también se ha descrito un vínculo entre la señalización *FGF10/FGFR2-IIIb* y la migración y la invasión de las células de cáncer pancreático a través de la inducción de metaloproteinasas de matriz de membrana tipo 1 y transformando el factor de crecimiento *TGF-β1* el cual es un importante regulador de la transición epitelial mesenquimal (*Nomura et al.*, 2008. *Br. J. Cancer* 99, 305-313).

En el contexto de la presente invención, *FGF-10* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 8, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

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

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 8, y en las que el polipéptido codificado por dichos

ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína FGF-10. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 1.

El gen *CXCL11* ó *hemokine (C-X-C motif) ligand 11* (C-X-C motif chemokine 11; beta-R1; interferon gamma-inducible protein 9; interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant; small inducible cytokine B11; small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 11; small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 9B; small-inducible cytokine B11, H174, I-TAC, IP-9, IP9, SCYB11, SCYB9B, b-R1) se encuentra en el cromosoma 4 (4q21.2). *CXCL11* es una quimioquina que interactúa específicamente con el receptor CXCR3. Estimula la fosforilación de las vías de las quinasas MAPK conduciendo a la proliferación y prevención de la apoptosis (Miekus *et al.*, 2010. *Folia Histochem. Cytobiol.* 48, 104-111) Además, se ha descrito su papel en varios tipos de tumorigénesis cancerosas (Lo *et al.*, 2010. *Am. J. Pathol.* 176, 2435-2446; Furuya *et al.*, 2011. *Gynecol. Oncol.* 122, 648-655). Aunque aquí presentamos, por primera vez, *CXCL11* como un posible biomarcador en pacientes con PDAC, ha sido recientemente propuesto como un biomarcador sérico para adenocarcinoma de próstata (Klee *et al.*, 2012. *Clin. Chem.* 58, 599-609)

En el contexto de la presente invención, *CXCL11* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 9, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

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

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 9, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína *CXCL11*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 2.

El gen *OMS* ó *oncostatin M* (C-X-C motif chemokine 11; beta-R1; interferon gamma-inducible protein 9; interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant; small inducible cytokine B11; small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 11; small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 9B; small-inducible cytokine B11, H174, I-TAC, IP-9, IP9, SCYB11, SCYB9B, b-R1) se encuentra en el cromosoma 4 (4q21.2). La oncostatina M pertenece a la misma familia que la interleuquina-6 y estimula varias funciones implicadas en reparación de heridas. Aunque inicialmente se describió como un inhibidor del crecimiento de células de leucemia (Zarling *et al.*, 1986. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 83, 9739-43), recientemente se ha comprobado que puede albergar un doble papel, también como promotor en la proliferación, migración celular e invasión (Fossey *et al.* 2011, *BMC Cancer* 11, 125; Li *et al.*, 2011. *Int. J. Mol. Med.* 28, 101-108; Winder *et al.*, 2011. *J. Pathol.* 225, 448-462; Tiffen *et al.*, 2008. *Mol. Endocrinol.* 22, 2677-2688). Una vez OMS se une a su receptor, promueve la fosforilación recíproca y la activación de la vía de la familia Janus quinasa (JAK)/STAT. Varios objetivos transcripcionales de STAT3 son importantes contribuidores a la biología del PDAC (Corcoran *et al.*, 2011. *Cancer Res.* 71, 5020-5029)

En el contexto de la presente invención, *OMS* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 10, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

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

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 10, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína OMS. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 3.

El gen *GNMB* ó *glycoprotein (transmembrane) nmb* (UNQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB, glycoprotein NMB; glycoprotein nmb-like protein; osteoactivin; transmembrane

glycoprotein HGFIN; transmembrane glycoprotein, NMB NQ1725/PRO9925, HGFIN, NMB) se encuentra en el cromosoma 7 (7p15). La glicoproteína GPNMB, también conocida como osteoactivina (OA), DC-HIL o HGFIN es una proteína transmembrana tipo 1, la cual se describió al principio como bajo a nivel indetectable en células malignas (Weternan *et al.*, 1995. *Int. J. Cancer* 60, 73-81) Sin embargo, estudios más recientes han descrito GPNMB/osteoactivina como un promotor de la metástasis y la invasión (Rose *et al.*, 2010. *PLoS One* 5, 12093) en algunos cánceres como el melanoma (Tomihari *et al.*, 2010. *Cancer Res* 70, 5778-5787; Tse *et al.*, 2006. *Clin. Cancer Res.* 12, 1373-1382), melanoma uveal (Williams *et al.*, 2010. *Melanoma res.* 20, 184-190), glioma (Kuan *et al.*, 2006. *Clin. Cancer Res.* 12, 1970-1982), carcinoma hepatocelular (Onaga *et al.*, 2003. *J. Hepatol.* 39, 779-785 y cáncer de mama, en los cuales se ha descrito también como un indicador pronóstico de recurrencia (Rose *et al.*, 2010. *Clin. Cancer Res.* 16, 2147-2156). Recientemente se ha descrito una inducción de GPNMB en la médula espinal de pacientes con esclerosis lateral

5
10
15

amiotrófica como un inductor de la degeneración de las neuronas motoras (Tanaka *et al.*, 2012. *Sci. Rep.* 2, 573).

En el contexto de la presente invención, *GPNMB* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, y que comprendería diversas

20

variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 11 o de la SEQ ID NO: 12,

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, y en las que el polipéptido

30

codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína GPNMB. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 4 o en la SEQ ID NO: 5.

El gen *SCF* ó *KIT ligand* (KITLG, FPH2, KL-1, Kitl, MGF, SCF, SF, SHEP7, c-Kit ligand; familial progressive hyperpigmentation 2; kit ligand; mast cell growth factor; steel factor; stem cell factor) se encuentra en el cromosoma 12 (12q22). SCF es el principal ligando para el receptor de la tirosina quinasa c-kit (KIT). Sus uniones apoyan la proliferación, diferenciación y supervivencia en las células que expresan KIT, tanto células normales como en células tumorales, incluyendo células de cáncer pancreático (Yasuda *et al.*, 2006. *Mol. Cancer* 5, 46) a través de la activación de las vías (PI3K)/Akt; MAPK y STAT (Yasuda *et al.*, 2007. *Dig. Dis. Sci.* 52, 2292-2300). Análisis previos han descrito los elevados niveles de factor de célula madre (FCM) en los sueros de cáncer colorrectal y PDAC (Mroczko *et al.*, 2005. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43, 146-150; Mroczko *et al.*, 2004. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, 256-260; Mroczko *et al.*, 2005. *Int.J. Colorectal Dis.* 22,33-38).

En el contexto de la presente invención, *SCF* se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 13 o en la SEQ ID NO: 14, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 13 o de la SEQ ID NO: 14,

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 13 o con la SEQ ID NO: 14, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína SCF. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia SEQ ID NO: 6 o en la SEQ ID NO. 7.

Como PDAC presenta múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas e implica a varias vías de señalización, una combinación de CA 19-9 con diversos biomarcadores podría representar un nuevo enfoque para establecer nuevos biomarcadores

diagnóstico. *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF* se han seleccionado por los autores de la presente invención para un diagnóstico temprano de la enfermedad.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de expresión de cualquiera de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF* se realiza mediante un
 5 inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de una anticuerpo con un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA),
 10 radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.

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

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la
 20 cantidad de anticuerpos frente a *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de
 25 compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo para tratar un individuo que
 30 padece cáncer de páncreas (o alternativamente al uso de un anticuerpo en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas), identificable por un método de la invención, donde el anticuerpo se selecciona de entre anti-*FGF-10*, anti-*CXCL11*, anti-*OSM*, anti-*GPNM* y anti-*SCF*, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente se emplea una combinación de todos los anticuerpos

anteriores.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un agente modulador de al menos uno de los genes que se seleccionan de entre *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*; *GNMB* y *SCF*, para tratar a un individuo que padece

5 cáncer de páncreas (o alternativamente al uso de una composición farmacéutica que comprende un agente modulador de al menos uno de los genes que se seleccionan de entre *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*; *GNMB* y *SCF* en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer de páncreas), identificable por un método de la invención. Preferiblemente, la composición comprende uno o más agentes

10 moduladores de todos los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*; *GNMB* y *SCF* simultáneamente. - Aún más preferiblemente, la composición farmacéutica además comprende otro principio activo. En otra realización más preferida, el agente modulador es un anticuerpo que se selecciona de entre anti-*FGF-10*, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*, anti- *GNM* y anti-*SCF*, o cualquiera de sus combinaciones.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar la cantidad de producto de expresión de los genes que se seleccionan de entre *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GNMB* y *SCF* o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida, el kit de la presente invención comprende los anticuerpos que se seleccionan de la lista que consiste en anticuerpos: anti-*FGF-10*, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*, anti- *GNM* y anti-*SCF*, o cualquiera de sus combinaciones. Preferiblemente, el kit de la invención comprende simultáneamente al menos un anticuerpo de cada tipo: anti-*FGF-10*, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*, anti- *GNM* y anti-*SCF*.

25 En otra realización preferida, el kit de la invención comprende anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su

30 puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un soporte sólido, o chip de proteínas, que comprende al menos uno de los anticuerpos anti-*FGF-10*/, anti- *CXCL11*, anti-*OSM*,

anti- GPNM y anti-SCF, o cualquiera de sus combinaciones, para llevar a cabo el cualquiera de los métodos de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un soporte sólido, o chip de DNA, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una
 5 secuencia conocida o un ARNm de al menos uno de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNM* y *SCF*. Preferiblemente, comprende los oligonucleótidos capaces de detectar el ARNm de todos los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNM* y *SCF*.

Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie del chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un
 10 sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más
 15 preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

La síntesis in situ sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los
 20 soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas), silicio, o portaobjetos de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. La diana es la muestra a analizar: ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un
 25 ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos
 30 de cualquiera de los métodos de la invención.

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

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

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o
10 pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Análisis de las curvas ROC para cada una de las cinco citoquinas séricas, encontró que estaban diferencialmente expresadas entre los pacientes con PADC. Las
15 curvas ROC resumen la precisión de las citoquinas en la predicción de pacientes con PDAC. El área bajo la curva (ABC) es la sensibilidad media del biomarcador. Un biomarcador con valores no predictivos tendría un ABC de 0,5, mientras que un biomarcador con una habilidad perfecta para predecir la enfermedad, tendría un ABC
20 de 1. **A** muestra los valores de ABC, valor de corte, sensibilidad y especificidad para FGF-10; **B** muestra los valores de ABC, valor de corte, sensibilidad y especificidad para I-CXCL11; **C** muestra los valores de ABC, valor de corte, sensibilidad y especificidad para OSM; **D** muestra los valores de ABC, valor de corte, sensibilidad y especificidad para la GPNMB; **E** muestra los valores de ABC, valor de corte,
25 sensibilidad y especificidad para SCF; **F** muestra los valores de ABC, valor de corte, sensibilidad y especificidad para las cinco citoquinas combinadas. Los valores de corte (valores de señal de intensidad) seleccionados fueron aquellos tanto con la mayor sensibilidad como especificidad.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

30 Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el estudio participaron 39 pacientes. Se establecieron 3 grupos diferentes:

- 1) 12 pacientes sanos, como grupo control.
- 2) 14 pacientes con PDAC que no habían recibido ningún tratamiento (denominado como pre-tratados).
- 3) 13 pacientes con PDAC bajo 2 semanas de tratamiento con la terapia combinada Gemcitabina + Erlotinib (denominados como post-tratados)

Todos los pacientes fueron diagnosticados con PDAC en el Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España) entre 2008 y 2011. Se registró toda la información de los pacientes, incluyendo género, edad, grado de la enfermedad y síntomas. La edad media de los pacientes fue de 66 años (rango 41-79 años) con un ratio entre hombres y mujeres de 50:50. La clasificación clínica de los pacientes con adenocarcinoma pancreático fue como sigue: estado III (28%) y estado IV (72%; Tabla 1).

Tabla 1. Características clinicopatológicas de la población de estudio (n=14)	
Edad de diagnóstico, años (media $\pm$ SD)	66 $\pm$ 10,5
Género	M: 50% F: 50%
Etapas de la enfermedad	III (28%) IV (72%)
Tipo de quimioterapia	Gemcitabine + Erlotinib
Respuesta clínica	PR (14,29%) SD (21,43%) PD (64,29%)
Tiempo de supervivencia, meses (media $\pm$ SD)	12,6 $\pm$ 12,6
Nivel de CEA [μg/l] (media $\pm$ SD)	2219 $\pm$ 5017

	Saludable: 0-37
Nivel de CA 19-9 [U/l] (media $\pm$ SD)	899 $\pm$ 3185
	Saludable: 0-5
<i>PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable; PD: enfermedad progresiva; SD: desviación estándar.</i>	

Tabla 1. Características clínico-patológicas de la población de estudio (n=14). Información recopilada de todos los pacientes PDAC, participantes en el estudio.

5 Procedencia de las muestras.

Las muestras de sangre fueron recogidas después de obtener la aprobación de comités éticos relevantes y consentimientos firmados por los pacientes. Se recogieron un total de 39 muestras de suero desde 2009 hasta 2011, usando los procedimientos estándares del Servicio de Oncología del Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España). Las muestras de sangre fueron obtenidas de pacientes diagnosticados con PDAC al inicio del estudio y 2 semanas después del inicio de la terapia (Gemcitabina + Erlotinib) y también de individuos sanos. El suero fue obtenido después de la centrifugación de la sangre a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Las muestras fueron alicu

otadas y almacenadas a -80°C.

Ensayo de anticuerpos de citoquinas

Las proteínas solubles en suero de pacientes con PADC, fueron medidas usando un array de anticuerpos humanos etiquetados con biotina (*Human Antibody L-series 507 Array (RayBiotech, Norcross, GA, USA)*), de acuerdo a las protocolos recomendados. Brevemente, las muestras se biotinizaron. Los anticuerpos se inmovilizaron en sitios puntuales en portaobjetos de vidrio. La incubación de los arrays con las muestras biológicas consistía en la unión de las citoquinas a sus correspondientes anticuerpos. Las señales se visualizan usando conjugados estreptavidina-HRP y colorimetría. Las

intensidades finales se midieron como las intensidades originales menos el fondo. Los datos fueron normalizados al control positivo para cada resultado individual

Análisis estadístico

Toda la estadística y los análisis de datos se realizaron usando el software IBM SPSS
 5 Statistic 20 o el lenguaje estadístico R. El análisis de calidad se desarrolló usando el pack “ArrayQualityMetrics” en R, para eliminar cualquier valor atípico posible (Kauffmann *et al.*, 2009. *Bioinformatics* 25, 415-416) Como las citoquinas en todos los grupos no presentaron una distribución normal, se utilizó el test de Mann-Whitney para destacar las diferencias entre grupos ($p < 0.05$). Además, se calculó la tasa de cambio
 10 (*fold change*, FC). Los valores de tasa de cambio de citoquinas se comprobaron para indicar sus relativos niveles de expresión. Ni $FC \leq 1,5$ ni $FC \geq 1,5$ en la señal de intensidad entre los grupos, fueron considerados relevantes. Se calculó el área bajo la curva (ABC) de la característica operativa del receptor (ROC) de cada marcador para evaluar su significancia diagnóstica representando la tasa de verdaderos positivos
 15 (sensibilidad) frente a la tasa de falsos positivos (1-especificidad). Además, se generó un índice de combinación de marcadores y se trazó la curva ROC también para esta combinación. Los valores de corte se seleccionaron para mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad. Adicionalmente, se representaron diagramas de caja que muestran la modulación de la expresión de aquellas citoquinas comunes modificadas
 20 significativamente entre post-tratados frente a pre-tratados y entre pre-tratados y control.

RESULTADOS

Análisis de los biomarcadores séricos de diagnóstico en pacientes con PDAC y sanos (control).

25 Con el fin de encontrar marcadores que ayudaran a la detección temprana del PDAC, se realizó un extenso cribado con un array de anticuerpos para 507 citoquinas humanas para identificar aquellas citoquinas expresadas diferencialmente entre los individuos sanos y los que padecían PDAC. Las características clínico patológicas de los pacientes con PDAC están resumidas en la Tabla 1. Como se muestra en la tabla
 30 2, existen 5 citoquinas sobreexpresadas en pacientes con PDAC no tratados al compararlos con los voluntarios sanos ($p < 0,05$). Las citoquinas FGF-10, CXCL11, OSM, GPNMB y SCF podrían representar un perfil sérico alterado en pacientes con PDAC.

Tabla 2: Citoquinas significativamente sobreexpresadas en pacientes de PDAC.			
ID	P-Valor	Log FC	FC
FGF-10	0,040	1,10	2,15
CXCL11	0,046	0,93	1,91
OSM	0,040	0,96	1,95
GPNMB	0,019	1,36	2,56
SCF	0,022	1,51	2,85

Tabla 2. Las 5 citoquinas significativamente sobreexpresadas. Las diferencias fueron obtenidas por el test Mann-Whitney ($p < 0,05$). Sus niveles de expresión relativa se dan por su correspondiente FC. Cada $FC \geq 1,5$ o $\leq 1/1,5$ en la intensidad de señal entre grupos se consideró relevante.

Análisis de sensibilidad y especificidad de los biomarcadores séricos para el diagnóstico temprano de PDAC.

Para determinar si estas 5 citoquinas podrían ser usadas como marcadores para la detección temprana del PDAC, se evaluó el valor diagnóstico (la habilidad de diferenciar entre salud y enfermedad) de cada biomarcador, por si sólo y en combinación. La sensibilidad y especificidad para cada biomarcador se analizaron usando el método del área bajo la curva de las características operativas del receptor (ROC). Las curvas están basadas en los niveles de citoquinas en individuos sanos e individuos antes y después del tratamiento. Se probó cada biomarcador candidato independientemente fue investigado (Figura 1A-E). Todos los posibles nuevos marcadores mostraron valores AUC entre 0,74 y 0,78 para diferenciar pacientes sanos y pacientes con PDAC. Las áreas bajo la curva ROC para las citoquinas FGF-10, CXCL11, OSM, GPNMB y SCF fueron 0,744, 0,737, 0,744, 0,776 y 0,772 respectivamente. La osteoactivina destacó por desarrollar la mayor sensibilidad para la predicción del PDAC. Seguidamente, para determinar si estas 5 citoquinas en su conjunto podrían ser usadas como grupo de biomarcadores para la detección del PDAC, se analizó una combinación de estos 5 marcadores para obtener una curva ROC integrada. El grupo combinado de estas citoquinas mejoró significativamente la habilidad de todos los biomarcadores por separado en aislamiento para distinguir pacientes con cáncer pancreático de los controles sanos, el valor de la AUC mejoró hasta 0,841 (figura 1F).

Para determinar la sensibilidad y especificidad de cada biomarcador, se establecieron aquellos puntos de corte que proporcionan los mejores puntos de renuncia entre la mayor sensibilidad y la mayor especificidad (Figura 1). Todos mostraron una especificidad del 75% y una sensibilidad con un rango entre 69-77%. El grupo de las 5 citoquinas mostró el mejor rendimiento para detectar PDAC en muestras séricas, reflejando también una sensibilidad del 77% pero una especificidad del 83%, más alta que por separado.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso simultáneo de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, para el diagnóstico del cáncer de páncreas.
- 5 2.- El uso, según la reivindicación anterior, donde el cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PDAC).
- 3.- Un método de obtención de datos útiles, para el diagnóstico del cáncer de páncreas, que comprende:
 - a) obtener una muestra aislada del individuo.
 - 10 b) cuantificar la cantidad de producto de expresión de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*.
- 4.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:
 - c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 15 5. El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, donde los pasos (b) y/o (c) pueden ser total o parcialmente automatizados.
- 6.- Un método de diagnóstico del cáncer de páncreas que comprende los paso (a)-(c) según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, y además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos que padecen cáncer de páncreas cuando
20 presentan una cantidad de producto de expresión de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNMB* y *SCF*, superior a la cantidad de referencia.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde cáncer de páncreas es el adenocarcinoma ductal de páncreas (PADC).
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde la muestra biológica
25 es una muestra de sangre, y preferiblemente suero.
- 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde la cuantificación se hace mediante inmunoensayo.
- 10.- El uso de un anticuerpo en la elaboración de un medicamento para tratar un individuo que padece cáncer de páncreas, identificable por un método según

cualquiera de las reivindicaciones 3-9, donde el anticuerpo se selecciona de entre anti-FGF-10, anti- CXCL11, anti-OSM, anti- GPNM y anti-SCF.

11.- Un kit o dispositivo que comprende los anticuerpos anti-FGF-10, anti- CXCL11, anti-OSM, anti- GPNM y anti-SCF.

- 5 12.- Un soporte sólido, o chip de proteínas, que comprende al menos uno de los anticuerpos anti-FGF-10/, anti- CXCL11, anti-OSM, anti- GPNM y anti-SCF, o cualquiera de sus combinaciones, para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9.

- 10 13.- Un soporte sólido, o chip de DNA, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de al menos uno de los genes *FGF-10*, *CXCL11*, *OSM*, *GPNM* y *SCF*, o cualquiera de sus combinaciones, para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 3-9.

Fig. 1

