

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102012902060544A1

Publication Date

20131215

Applicant

NATIMAB THERAPEUTICS S.R.L.

Title

PROCEDIMENTO E KIT PER LA DIAGNOSI IN VITRO
DELL'ADENOCARCINOMA DUTTALE PANCREATICO O PER
DETERMINARE LA PREDISPOSIZIONE ALL'ADENOCARCINOMA
DUTTALE PANCREATICO

Descrizione dell'invenzione industriale dal titolo:

"Procedimento e kit per la diagnosi *in vitro* dell'adenocarcinoma duttale pancreatico o per determinare la predisposizione all'adenocarcinoma duttale pancreatico"

Di: NATIMAB THERAPEUTICS S.R.L., nazionalità italiana, via Ribes 5, 10010 Colleretto Giacosa (TO), Italia.

Inventore designato: NOVELLI, Francesco; CAPPELLO, Paola; CAPELLO, Michela

Depositata il: 15 giugno 2012

* * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione si riferisce al settore della diagnosi di patologie tumorali, più specificamente dell'adenocarcinoma duttale pancreatico, altresì indicato come ACP.

Tra i tumori del pancreas, l'adenocarcinoma duttale (ACP) è il più frequente e rappresenta la quarta causa di morte negli Stati Uniti e in Europa. In uno stadio avanzato, l'adenocarcinoma pancreatico ha una prognosi molto sfavorevole con una sopravvivenza mediana di quattro mesi e una probabilità di sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi del 2%.

La prognosi estremamente severa di questa patologia dipende primariamente dall'elevata capacità proliferativa ed invasiva che caratterizza le cellule tumorali pancreatiche, nonché dal frequente ritardo diagnostico causato, nella maggioranza dei casi, dalla paucità di una sintomatologia specifica in una fase precoce della malattia. I sintomi iniziali della patologia, spesso limitati alla perdita di appetito e al dimagrimento, vengono di sovente sottovalutati, comportando un ritardo fatale nella diagnosi del tumore, generalmente ad uno stadio in cui non è più possibile operare l'asportazione radicale della massa tumorale.

Nonostante i notevoli sforzi compiuti nel settore della terapia oncologica, a tutt'oggi la resezione chirurgica rimane il trattamento principale dei pazienti affetti da ACP, e i risultati di diverse studi clinici hanno dimostrato una correlazione diretta tra la prognosi della malattia dopo pancreatectomia e la precoce stadiazione del tumore al momento dell'intervento. Complessivamente, la sopravvivenza a 5 anni dei pazienti resecati è pari al 10-20%, ma aumenta al 30-60% per i tumori operati di diametro inferiore

ai 2 cm o addirittura al 70% per i tumori di diametro inferiore ad 1 cm (Sohn TA et al,. *J Gastrointest Surg* 2000 4(6):567-79).

Sulla base di quanto precedentemente discusso, vi è pertanto l'urgenza di mettere a disposizione procedimenti idonei alla diagnosi precoce dell'adenocarcinoma duttale pancreatico, sin dagli stadi iniziali della trasformazione neoplastica, allo scopo di poter intervenire rapidamente, incrementando così significativamente le possibilità di sopravvivenza dei pazienti.

Nella consueta pratica diagnostica dell'ACP rientrano anche indagini sierologiche, basate principalmente sulla determinazione del marcatore antigene carboidratico 19.9 (CA 19.9), tradizionalmente utilizzato quale indicatore della presenza e della gravità del tumore. L'antigene CA 19.9 è una glicoproteina di membrana presente nel sangue a concentrazioni molto basse in condizioni fisiologiche; nel corso della patologia neoplastica i livelli sierici di questa proteina aumentano significativamente, a causa di alterazioni nei processi che regolano la produzione ed il passaggio in circolo delle mucine. Studi recenti hanno però rivelato che la determinazione dell'antigene CA

19.9 non consente di diagnosticare il tumore pancreatico nelle sue fasi di esordio, dal momento che i livelli ematici di questa proteina correlano con le dimensioni della massa tumorale e risultano difficilmente misurabili nei pazienti con tumori di diametro inferiore ai 3 cm. In aggiunta, la valenza dell'antigene CA 19.9 quale indicatore diagnostico dell'ACP è ulteriormente compromessa dal fatto che è possibile riscontrare un sensibile incremento del suo livello sierico anche nel corso di altre malattie dell'apparato digerente, ivi incluse la pancreatite acuta e cronica, la malattia infiammatoria cronica intestinale e l'ittero benigno. A conferma di quanto sopra discusso, diverse associazioni di esperti nel settore quali l'European Group on Tumour Markers, il National Academy of Clinical Biochemistry (NACB), e il National Cancer Comprehensive Network (Klapdor R, Aronsson AC, Duffy MJ, et al. *Tumor markers in gastrointestinal cancers, EGTM recommendations*. *Anticancer Res* 1999;19:2785-2820) raccomandano l'impiego diagnostico del marcatore CA19.9 soltanto come indagine complementare e di supporto alle consuete procedure radiologiche.

Le ricerche descritte in Tomaino B, *et al.* CIRCULATING AUTOANTIBODIES TO PHOSPHORYLATED ALPHA-ENOLASE ARE A HALLMARK OF PANCREATIC CANCER. J Proteome Res. 2011; 10:105-112 sui profili sieroproteomici di un'ampia coorte di pazienti affetti da ACP e relativi controlli hanno rivelato la presenza nel 62% delle neoplasie di autoanticorpi circolanti rivolti verso particolari isoforme dell'enzima glicolitico alfa-enolasi, più specificamente le isoforme fosforilate sulla serina in posizione 419 (ENOA1-2). Di converso, la suddetta immunoreattività era rilevabile soltanto nel 4% dei campioni di controllo. Ad ulteriore supporto della valenza clinica di questi risultati, gli autori hanno dimostrato che la risposta anticorpale verso le isoforme fosforilate dell'alfa-enolasi è correlata nella maggior parte dei casi con una prognosi più favorevole della malattia e con un incremento significativo della stima di sopravvivenza.

Nella domanda di brevetto italiano TO2009000697 è descritto l'impiego di dell'isoforma fosforilata dell'alfa-enolasi umana come biomarcatore per la diagnosi dell'APC, insieme a peptidi isolati da essa derivati e contenenti il

sito di fosforilazione e ad anticorpi capaci di legare specificamente l'epitopo fosforilato.

Nonostante, sulla base di quanto descritto, la determinazione di autoanticorpi verso l'epitopo fosforilato di ENOA 1,2 ricopra un importante significato diagnostico, in particolare prognostico, la sua applicazione nell'ambito della diagnosi precoce del carcinoma pancreatico rimane ancora limitata. Infatti, è stato verificato che nei pazienti portatori di tumore resecabile, e pertanto in una fase iniziale della malattia, la presenza di autoanticorpi verso l'enolasi fosforilata ha la capacità di discriminare la neoplasia pancreatica con una sensibilità non superiore al 61%.

La presente invenzione ha dunque lo scopo di mettere a disposizione un procedimento per la diagnosi dell'adenocarcinoma duttale pancreatico che superi gli svantaggi e le limitazioni della tecnica nota.

Più in particolare, uno scopo della presente invenzione è quello di mettere a disposizione un procedimento diagnostico che consenta di individuare con un elevato grado di accuratezza i pazienti affetti da ACP ad uno stadio iniziale

della malattia, e pertanto ancora trattabili chirurgicamente e/o terapeuticamente con un significativo margine di successo curativo.

Questo ed altri scopi sono raggiunti tramite il procedimento *in vitro* per la diagnosi dell'adenocarcinoma duttale pancreatico o per determinare la predisposizione all'adenocarcinoma duttale pancreatico come definito nell'annessa rivendicazione 1 e dal relativo kit come definito nell'annessa rivendicazione 13. Forme di attuazione preferite del procedimento e del kit dell'invenzione sono definite nelle rivendicazioni dipendenti.

Le annesse rivendicazioni indipendenti e dipendenti formano parte integrante della presente descrizione.

Come verrà illustrato più in dettaglio nella parte sperimentale che segue, i presenti inventori hanno osservato che campioni di siero prelevati da pazienti affetti da carcinoma pancreatico presentano un incremento significativo dei livelli di autoanticorpi circolanti verso la proteina ezrina umana rispetto a campioni di controllo provenienti da soggetti sani o da pazienti affetti da differenti patologie quali tumori non

pancreatici, malattie autoimmuni o pancreatite cronica.

In particolare, l'esame sierologico condotto su una coorte di pazienti rappresentativa dei diversi stadi di sviluppo dell'ACP ha rivelato che l'immunoreattività verso l'ezrina è presente a livelli elevati sin dagli stadi più precoci della crescita tumorale. La presenza in campioni clinici di anticorpi autologhi anti-ezrina rappresenta dunque un biomarcatore ideale in quanto specifico e selettivo del tumore pancreatico nei suoi diversi stadi di sviluppo, consentendo l'allestimento di procedimenti diagnostici mirati all'identificazione di pazienti in uno stadio precoce della malattia oncologica, per i quali la rapidità dell'intervento chirurgico e/o terapeutico correla significativamente con le successive probabilità di sopravvivenza.

Pertanto, oggetto della presente invenzione è un procedimento *in vitro* per la diagnosi dell'adenocarcinoma duttale pancreatico o per la determinazione della predisposizione di un soggetto all'adenocarcinoma duttale pancreatico, comprendente il passaggio di determinare, in un campione biologico di un soggetto, la presenza,

l'assenza o il livello di anticorpi diretti verso l'eizrina, in cui la presenza di anticorpi diretti verso l'eizrina o il livello di anticorpi diretti verso l'eizrina oltre una soglia predeterminata è indicativa di adenocarcinoma duttale pancreatico o di predisposizione all'adenocarcinoma duttale pancreatico.

Secondo una forma di realizzazione, il soggetto è un paziente umano sospettato di essere affetto da adenocarcinoma duttale pancreatico.

Secondo un'altra forma di realizzazione, il soggetto è un essere umano di cui si desidera determinare il rischio di sviluppare adenocarcinoma duttale pancreatico o la predisposizione all'adenocarcinoma duttale pancreatico.

L'eizrina è una proteina parte della famiglia di molecole ERM (eizrina, radixina e moesina), che svolgono primariamente il ruolo di mediare la connessione tra recettori cellulari transmembrana e molecole di adesione con i filamenti di actina che compongono il citoscheletro. L'eizrina nella sua forma inattiva risiede nel citoplasma ma, in seguito ad attivazione mediata da fosforilazione, trasloca sulla membrana cellulare apicale dove lega i filamenti di actina corticale e prende parte alle

vie di trasduzione del segnale di Rho e PI3K/Akt (Fehon RG et al.; 2010 *Nat Rev Mol Cell Biol.* **11**(4):276-87). In condizioni fisiologiche, la proteina ezrina è essenzialmente coinvolta nei meccanismi di macropinocitosi, adesione cellulare ed increspatura delle membrane caratteristici delle cellule epiteliali, mentre può assumere un ruolo chiave nella regolazione dei processi metastatici nel corso di patologie neoplastiche (Niggli V. et al; 2008 *Int J Biochem Cell Biol* **40**(3):344-9). Studi recenti hanno dimostrato un incremento dei livelli di espressione della proteina ezrina in numerose tipologie tumorali.

Il percorso sperimentale che ha condotto i presenti inventori all'identificazione dell'associazione specifica tra la risposta anticorpale verso l'ezrina e l'adenocarcinoma duttale pancreatico, che sarà descritto più in dettaglio nella sezione sperimentale, ha fatto uso, in una prima fase, di modelli murini dell'ACP particolarmente sofisticati, basati su animali geneticamente modificati (GEM) in cui sono stati introdotti alleli Kras e p53 mutati (S. R. Hingorani et al., 2003 *Cancer Cell* **4**, 437; S. R. Hingorani et al., 2005 *Cancer Cell* **7**, 469-83). Più

specificamente, l'espressione condizionata del gene Kras mutato (G12D) induce inizialmente in questi animali la formazione di neoplasie pancreatiche intraepiteliali (PanIN) che, grazie all'azione congiunta delle mutazioni del gene p53(R172H), progrediscono rapidamente attraverso i successivi stadi di sviluppo del tumore sino a quello di carcinoma invasivo. In virtù di quanto precedentemente descritto, i modelli murini GEM sono capaci di sviluppare l'adenocarcinoma duttale pancreatico attraverso lesioni pre-maligne specifiche e successive tappe di progressione neoplastica, ricapitolando in tal modo il tumore umano e consentendone lo studio sin dagli stadi iniziali.

Allo scopo di analizzare specificamente la risposta umorale che lo sviluppo dell'ACP evoca nei topi GEM, i presenti inventori hanno impiegato un approccio proteomico comparativo basato sull'analisi dei profili di immunoreattività presenti nei campioni di siero prelevati dagli animali a diversi stadi di sviluppo del tumore pancreatico, e dai relativi controlli, quando saggiati su estratti proteici da cellule tumorali pancreatiche murine, precedentemente sottoposti a

separazione mediante elettroforesi bidimensionale (2-DE). Tale approccio ha consentito di rilevare negli animali GEM, in confronto al gruppo di controllo, una significativa risposta anticorpale verso l'antigene ezrina già a partire dal primo mese di età, quando la progressione neoplastica è ancora allo stadio di lesione precancerosa.

Nella successiva fase di validazione, i risultati dell'analisi proteomica condotta sui modelli murini sono stati confermati esaminando i livelli di autoanticorpi circolanti anti-ezrina in campioni di siero umano prelevati da pazienti affetti da ACP sia ad uno stadio avanzato che ad uno stadio in cui il tumore era ancora resecabile (stadio II e III), e dai relativi gruppi di controllo. Come illustrato dal grafico della figura 1, la risposta anticorpale verso l'ezrina misurata nei sieri di pazienti resecati presenta una frequenza pari a circa il 68% quando i campioni vengono testati su estratti proteici ottenuti dalla linea cellulare umana tumorale pancreatica CF-PAC-1, precedentemente sottoposti ad elettroforesi bidimensionale.

Ad ulteriore supporto dei risultati sperimentali precedentemente descritti, i presenti

inventori hanno verificato la valenza diagnostica degli autoanticorpi anti-ezrina in un immunosaggio ELISA impiegando come reagente di affinità la proteina ezrina umana ricombinante. In particolare, è stata eseguita un'analisi comparativa dei livelli di immunoreattività verso questa proteina misurati in campioni di siero da pazienti portatori di carcinoma pancreatico, sia in uno stadio ancora operabile che in fase avanzata, ed in una coorte di controllo comprendente soggetti sani (HS) e pazienti affetti da tumori non pancreatici (non-PDAC), da malattie autoimmuni (AD) o da pancreatite cronica (CP). Al fine di conseguire un maggior grado di completezza dello studio in esame, sono stati sottoposti al dosaggio ELISA anche campioni di siero raccolti nell'ambito del vasto studio multicentrico prospettico EPIC, per il quale, durante un lungo periodo di osservazione ("follow-up") protrattosi sino a 117 mesi a partire dal primo prelievo, è stata valutata l'incidenza di insorgenza del carcinoma pancreatico nei soggetti arruolati all'inizio dello studio in dieci diversi paesi europei in condizione di assenza di malattia o di qualsiasi relativa sintomatologia. I risultati dell'esame ELISA, illustrati nel grafico di

dispersione della figura 2, dimostrano la presenza di reattività specifica verso la proteina ezrina soltanto nei sieri da pazienti affetti da adenocarcinoma duttale pancreatico e nei soggetti "EPIC" che hanno sviluppato questa neoplasia durante il periodo di "follow-up" dello studio (PDAC-EPIC). Viceversa, non è stata rilevata la presenza di immunoreattività nei campioni di controllo e nei campioni "EPIC" da soggetti non affetti da tumore pancreatico al termine del periodo di osservazione (CNTRL-EPIC). L'analisi ROC ha mostrato che un cut-off di 0,1183 unità arbitrarie di densità ottica distingue i pazienti affetti da carcinoma pancreatico rispetto ai soggetti di controllo con una sensibilità del 93,2%, una specificità del 75,5%, area sotto la curva (AUC) $0,90 \pm 0,03$ (figura 3A). In aggiunta, la capacità discriminante del procedimento diagnostico dell'invenzione subisce un significativo incremento (sensibilità del 100%, specificità dell'80,3%, AUC del 0,95) quando l'analisi sierologica viene limitata ai campioni prelevati da pazienti affetti da tumore pancreatico in uno stadio ancora resecabile, comprovandone pertanto la sua valenza nell'ambito delle indagini precoci. Di contro,

l'accuratezza diagnostica basata esclusivamente sull'impiego del biomarcatore tradizionale CA 19.9 sui medesimi campioni ha registrato un sensibile decremento indicato da un valore AUC della curva ROC pari a 0,85.

Per l'esecuzione del procedimento diagnostico dell'invenzione può essere impiegata qualsiasi tipologia di campione biologico idoneo al dosaggio del contenuto proteico, preferibilmente campioni di sangue e suoi derivati quali siero e plasma.

Nella pratica clinico-diagnostica, l'impiego di combinazioni di biomarcatori associati ad una medesima patologia rappresenta uno strumento importante al fine di conseguire una superiore accuratezza del saggio di interesse. A tal fine, gli inventori hanno verificato un significativo incremento del potere discriminante del saggio dell'invenzione allorquando i valori relativi agli anticorpi anti-ezrina misurati nel sangue dei soggetti malati e dei controlli, categorizzati secondo un valore di "cut-off" predeterminato (preferibilmente pari a 0,1183 unità arbitrarie di densità ottica, O.D.), vengono impiegati in combinazione con i dati relativi alle concentrazioni sieriche dell'antigene CA 19.9

misurati nei medesimi soggetti (valore di "cut-off" preferibilmente pari a 37 IU/ml). Come si evince infatti dall'esame della curva ROC illustrata nella figura 3B e costruita sulla base della combinazione delle misurazioni sopra menzionate, il valore dell'area sottesa alla curva (AUC) subisce un significativo incremento a 0,92. Al fine di potenziare ulteriormente la valenza diagnostica del procedimento dell'invenzione, è stato inoltre accertato che l'impiego in combinazione con la determinazione degli autoanticorpi anti-ezrina di un altro biomarcatore già noto quale indicatore della neoplasia pancreaticata, più specificamente la presenza di autoanticorpi circolanti anti-ENOA1-2 fosforilata, in aggiunta o in alternativa alla determinazione dell'antigene CA 19.9, si rivela di importante ausilio nel conseguimento di una più accurata classificazione dei campioni clinici in esame, particolarmente nei casi in cui i valori misurati relativi ai livelli di autoanticorpi anti-ezrina e dell'antigene CA 19.9 sono discordanti, consentendo così di raggiungere un'accuratezza diagnostica pari a $0,97 \pm 0,02$ (sensibilità 100%, specificità 93,7%) (figura 3C).

Pertanto, in una forma di realizzazione

preferita il procedimento dell'invenzione comprende, in combinazione con la determinazione degli autoanticorpi anti-ezrina, la determinazione della presenza, assenza o del livello dell'antigene CA 19.9 e/o della presenza, assenza o del livello di anticorpi diretti verso l'alfa-enolasi fosforilata.

Tra le metodiche di più largo impiego per l'identificazione ed il dosaggio in un campione biologico di un antigene o alternativamente di un anticorpo specifico contro detto antigene, le procedure immunologiche rappresentano il metodo di elezione in quanto, poiché basate sulla formazione di un complesso antigene-anticorpo, consentono di conseguire un elevato grado di specificità. Pertanto, in una forma di realizzazione preferita, il procedimento dell'invenzione è un saggio immunologico.

Preferibilmente, la determinazione degli autoanticorpi anti-ezrina secondo il procedimento dell'invenzione viene realizzata impiegando un reagente di affinità, preferibilmente di natura proteica o peptidica, idoneo a legare selettivamente i suddetti anticorpi. In una forma di realizzazione preferita, il reagente di affinità

è la proteina eozrina umana o una sua porzione, quale ad esempio un peptide dell'eozrina.

In un'ulteriore forma di realizzazione preferita, il procedimento dell'invenzione prevede in aggiunta l'impiego di un reagente di affinità idoneo a rilevare nel campione in esame la presenza dell'antigene CA 19.9 e/o di un reagente di affinità idoneo a rilevare nel campione in esame la presenza di autoanticorpi verso l'ENO1-2 fosforilata. Ad esempio, a tale scopo sono idonei ad essere impiegati anticorpi monoclonali o policlonali capaci di legare specificamente l'antigene carboidratico 19.9 oppure antigeni proteici o peptidici atti a catturare anticorpi circolanti diretti verso l'alfa-enolasi fosforilata. Il procedimento dell'invenzione non è però limitato all'impiego di molecole anticorpali monoclonali o policlonali, bensì può fare uso di qualsiasi reagente di affinità idoneo a tale impiego, per esempio un aptamero, un frammento anticorpale monomerico (Fab) o dimerici (F(ab')₂), un frammento anticorpali a singola catena (scFv) o qualsiasi proteina legante derivata da uno scaffold anticorpale o non anticorpale; esempi non limitativi di scaffold non anticorpali sono

fibronectina 3, proteina A, lipocalin, tetranectin protein, ankyrin domains, etc. La selezione del reagente di affinità più idoneo ad essere impiegato nel procedimento dell'invenzione rientra nelle conoscenze e capacità del tecnico medio del settore.

Allo scopo di incrementare la specificità di un saggio immunologico, in una forma di realizzazione preferita viene usato un anticorpo secondario atto a legare selettivamente l'immunocomplesso formatosi tra l'antigene e l'anticorpo che sono in esame. Tipicamente, l'anticorpo secondario è diretto verso l'anticorpo che è parte dell'immunocomplesso bersaglio, cosiddetto anticorpo primario, ed è generato in una specie animale diversa da quella di origine dell'anticorpo primario. In una forma di realizzazione alternativa, l'anticorpo secondario si lega ad un epitopo sulla molecola antigene che è distinto dall'epitopo specificamente riconosciuto dall'anticorpo primario. Pertanto, in una forma di realizzazione preferita, il procedimento dell'invenzione è un saggio immunologico in cui viene impiegato almeno un anticorpo secondario come sopra definito.

L'anticorpo secondario impiegato nel procedimento dell'invenzione è marcato con un tracciante rivelabile preferibilmente scelto tra un isotopo radioattivo, un fluoroforo, un enzima, un composto chemiluminescente, un tracciante di affinità come ad esempio avidina o biotina. Tra i marcatori fluorescenti più comunemente usati nei saggi immunologici si citano a titolo di esempio la fluoresceina isotiocianato e la rodamina tetrametile, che sono in grado di conferire al marcato stabilità e potenza del segnale, misurabile in genere in tempo reale. Nell'ambito delle metodiche radioimmunologiche, è di largo impiego lo radioiodio che può essere incorporato nei residui tirosinici della catena proteica o aggiunto a quest'ultima sotto forma di residuo tirosino pre-marcato. I metodi immunoenzimatici si basano invece sulla rivelazione della reazione immunologica di riconoscimento dell'antigene/anticorpo mediante una reazione su un opportuno substrato catalizzata da un enzima coniugato chimicamente alla molecola anticorpale, ad esempio la fosfatasi alcalina e la perossidasi di rafano, con conseguente produzione di un segnale colorato. Nei metodi immunoenzimatici, l'effetto di amplificazione del

segnale dovuto alla trasformazione del substrato, consente di rivelare analiti presenti in tracce nel campione in esame.

Naturalmente, nei casi in cui il procedimento dell'invenzione mira alla determinazione di uno o più ulteriori biomarcatori in aggiunta agli autoanticorpi anti-ezrina, ossia l'antigene CA 19.9 ed eventualmente gli anticorpi anti-ENOA fosforilata, e comporta pertanto la formazione di due diversi immunocomplessi oppure tre diversi immunocomplessi, i rispettivi anticorpi secondari eventualmente impiegati nel saggio sono marcati ciascuno con un differente tracciante rivelabile, al fine di consentire di distinguere tra i suddetti immunocomplessi. I traccianti rivelabili differiscono tra loro per la natura del segnale di rivelazione emesso, ad esempio chemiluminescente o fluorescente, oppure nell'ambito della medesima tipologia di segnale, per altre caratteristiche distintive quali ad esempio lo spettro di emissione/assorbimento o la colorazione prodotta. La selezione del tracciante rivelabile più adatto ad essere utilizzato nel procedimento dell'invenzione rientra ampiamente nelle capacità del tecnico medio del settore.

In una forma di realizzazione preferita, il procedimento dell'invenzione è un saggio immunologico di immunoassorbimento con enzima coniugato, noto come ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbement Assay"). Questa tipologia di saggio ricopre un ruolo primario nell'ambito delle metodiche immunoenzimatiche ed è caratterizzata dalla formazione dell'immunocomplesso su fase solida, in genere una piastra multipozzetto, mediante immobilizzazione su quest'ultima di un antigene o di un anticorpo di cattura a seconda che il ligando bersaglio del saggio sia rispettivamente un anticorpo o un antigene. La successiva aggiunta di un secondo anticorpo coniugato con un enzima, porta alla formazione di un complesso cosiddetto "sandwich" la cui presenza viene rivelata mediante aggiunta del substrato cromogeno e sviluppo di colore nel pozzetto.

In una forma di realizzazione alternativa, il procedimento dell'invenzione è un saggio immunologico Western blot, tecnica comunemente usata per identificare una proteina all'interno di una miscela proteica complessa che è stata sottoposta a separazione analitica mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide. In una fase

successiva alla separazione, le proteine vengono trasferite su una membrana di supporto, comunemente di nitrocellulosa, e le molecole proteiche presenti sulla membrana possono essere identificate mediante una reazione immunomediata impiegando un anticorpo marcato capace di riconoscere specificamente la proteina di interesse.

Naturalmente nell'ambito della presente invenzione rientra l'impiego di qualsiasi tipologia di formato di saggio immunologico, la cui selezione rientra nelle capacità del tecnico medio del settore.

Al fine di facilitarne l'impiego, i mezzi idonei ad eseguire il procedimento dell'invenzione sono assemblati in un kit. Pertanto un ulteriore oggetto dell'invenzione è un kit per la diagnosi *in vitro* dell'adenocarcinoma duttale pancreatico, come definito nella rivendicazione 13.

Il kit dell'invenzione comprende almeno un reagente di affinità, preferibilmente un antigene proteico o peptidico, atto a legare gli anticorpi anti-ezrina, e in aggiunta opzionalmente contiene reagenti di affinità idonei a riconoscere l'antigene CA 19.9 e/o gli autoanticorpi verso l'ENOA1-2 fosforilata nonché i relativi mezzi di

rivelazione. I reagenti contenuti nel kit sono come sopra descritti in relazione al procedimento.

In una forma di realizzazione preferita, il kit dell'invenzione comprende inoltre un supporto solido, preferibilmente scelto tra piastra multipozzetto, microsfera, membrana, vetrino, resina, chip sensore, bead. Tale supporto è impiegato, ad esempio, per immobilizzare una o più molecole antigeniche e/o anticorpali. Nella pratica comune vengono in genere utilizzate piastre di polivinile o polistirene contenenti 96 o 384 pozzetti, che consentono l'analisi simultanea di un numero elevato di campioni. I materiali di cui sono costituite le piastre multipozzetto favoriscono inoltre l'adsorbimento passivo di macromolecole mediante legami elettrostatici ed interazioni idrofobiche. In alternativa, il supporto solido del kit dell'invenzione è una microsfera, per esempio una microsfera di polistirene o Sephadex, sulla cui superficie avviene la formazione dell'immunocomplesso e il dosaggio immunometrico. Le microsfere del kit dell'invenzione possono presentare superfici funzionalizzate, ad esempio mediante rivestimento con anticorpi, oppure essere microsfere di composizione magnetica al fine di

rendere più facile la loro separazione dalla soluzione in cui sono in sospensione utilizzando un magnete. La selezione del supporto solido più adeguato ad essere utilizzato nel kit dell'invenzione rientra ampiamente nelle capacità del tecnico medio del settore.

Gli esempi che seguono sono forniti a scopo illustrativo e non limitativo della portata dell'invenzione come definita nelle annesse rivendicazioni.

ESEMPIO 1: Modello murino dell'adenocarcinoma duttale pancreatico e raccolta dei campioni di siero

Gli animali impiegati negli esperimenti sono stati trattati in accordo con le linee guida istituzionali ed europee (decreto legislativo No. 116/92). I topi 129SvJae H-2D^b che esprimono i due oncogeni mutati Kras^{G12D} e Trp53^{R172H} sotto il controllo del promotore endogeno e in cui, a monte del primo esone, è presente una cassetta di stop fiancheggiata da siti lox P (LSL) (*LSL-Kras^{G12D/+}*, *LSL-Trp53^{R172H/+}*) sono stati gentilmente forniti dal Dr. David Tuveson (Cancer Research UK, Cambridge Research Institute, Cambridge, Regno Unito). I topi C57BL/6 che esprimono l'enzima Cre ricombinasi

sotto il controllo del promotore Pdx1 specifico del pancreas (*Pdx-1-Cre*) sono stati gentilmente forniti dal Dr. Andrew Lowy (University of San Diego, San Diego, CA, Stati Uniti d'America). I due ceppi *LSL-Kras^{G12D/+}*, *LSL-Trp53^{R172H/+}* e *Pdx-1-Cre* sono stati incrociati per ottenere il modello *LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre* (KPC) (S. R. Hingorani et al., 2003 *Cancer Cell* **4**, 437; S. R. Hingorani et al., 2005 *Cancer Cell* **7**, 469-83). Al fine di prelevare campioni di siero dagli animali, i topi sono stati sacrificati ed il sangue è stato raccolto mediante puntura intracardiaca. La presenza di tumore pancreatico e di eventuali metastasi è stata confermata mediante analisi anatomopatologica dei topi sacrificati.

ESEMPIO 2: Raccolta dei campioni di siero da pazienti e controlli

Lo studio è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale Universitario San Giovanni Battista, Università di Torino, Torino (autorizzazione No. 54810). I campioni di siero sono stati isolati da sangue venoso prelevato, al momento della diagnosi, da pazienti affetti da ACP e donatori sani, con il loro consenso informato. I campioni di siero sono stati suddivisi in aliquote e conservati a -80°C.

Per ciascun caso clinico, la diagnosi di adenocarcinoma duttale pancreatico è stata confermata mediante analisi istologica o citologica. Allo scopo di esaminare la risposta umorale evocata dallo sviluppo dell'ACP, sono stati analizzati mediante la metodica SERPA 120 sieri di pazienti affetti da ACP (M/F: 67/53; età media, 67 anni; intervallo di età, 32-86) le cui caratteristiche cliniche sono state precedentemente descritte in Tomaino B, et al. CIRCULATING AUTOANTIBODIES TO PHOSPHORYLATED ALPHA-ENOLASE ARE A HALLMARK OF PANCREATIC CANCER. J Proteome Res. 2011; 10:105-112, e 69 sieri mediante approccio EISA. L'immunoreattività presente nei campioni analizzati è stata paragonata a quella dei seguenti sieri di controllo: 60 sieri prelevati da soggetti sani senza precedente storia di cancro o patologie autoimmuni (HS, M/F: 25/35; età media, 70 anni; intervallo di età, 49-90); 50 sieri di pazienti affetti da altri tipi di neoplasie (9 pazienti con epatocarcinoma, 12 con carcinoma mammario, 9 con cancro colon-rettale, 19 con cancro al polmone e 1 con cancro all'ovaio; M/F: 24/26; età media: 69 anni; intervallo di età: 44-86); 46 sieri prelevati da pazienti con pancreatite cronica (CP, M/F:

26/20; età media 58 anni; intervallo di età: 22-74) e 12 sieri di pazienti affetti da malattie autoimmuni (AD, 3 con crioglobulinemia mista, 2 con sindrome di Meniere, 4 con artrite reumatoide, 2 con lupus eritematoso sistemico e 1 con pancreatite autoimmune; M/F: 3/9; età media: 49 anni; intervallo di età: 38-79).

Al fine di verificare il valore predittivo del saggio dell'invenzione, sono stati inclusi nello studio anche campioni di siero prelevati prima della comparsa della sintomatologia dell'adenocarcinoma duttale pancreatico e della conseguente diagnosi della malattia. I suddetti campioni ed i controlli appaiati sono stati ottenuti dalla coorte torinese dello studio EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) che include i campioni di 10604 donatori sani al momento dell'arruolamento (6047 maschi e 4557 femmine, età 35-65 anni). Il reclutamento è avvenuto tra il 1993 e il 1998 e ha coinvolto donatori di sangue e volontari sani. La cooperazione con i registri di cancro locali e le autorità sanitarie locali ha permesso di monitorare nel tempo l'insorgenza di diverse tipologie di cancro e di altre patologie nonché i decessi. Il

disegno dello studio, la popolazione ed i dati raccolti sono stati descritti in dettaglio precedentemente (Riboli E et al, Public Health Nutrition (2002), 5: p. 1113-1124). Nell'ambito dello studio EPIC, i controlli sono rappresentati da donatori arruolati che non hanno sviluppato alcun tipo di tumore o patologia autoimmune durante il periodo di "follow-up". Essi sono stati scelti ed appaiati sulla base di parametri diversi, inclusi il centro di raccolta, l'età, il sesso, la data di arruolamento nello studio e non. Anche per lo studio EPIC, la raccolta dei campioni è avvenuta con il consenso informato dei partecipanti allo studio e con l'approvazione dei comitati etici locali.

ESEMPIO 3: Elettroforesi bidimensionale ed analisi di Western blot

Allo scopo di esaminare l'immunoreattività specificamente indotta dallo sviluppo e progressione del carcinoma pancreatico sia nei topi che nei pazienti umani, i campioni di siero da questi prelevati sono stati saggiati su estratti da cellule cancerose pancreatiche. In particolare, nello studio sono state utilizzate due diverse linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico

duttale: la linea umana CF-PAC-1 (ECACC No. 91112501) e la linea murina K8484 (isolata da un topo *KPC* e gentilmente concessa dal Dr. Tuveson, Università di Cambridge). Le cellule di entrambe le linee sono state coltivate in terreno DMEM in presenza del 10% di siero bovino fetale (FBS), glutammina (20mM) e gentamicina (50 µg/ml). Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore termostato a 37°C, con atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Allo stadio di crescita opportuno, le cellule sono state raccolte, lavate con PBS, isolate dal mezzo di coltura mediante centrifugazione e conservate a -80°C. Per ciascuna delle due linee cellulari impiegate nello studio, sono state risospese 10⁷ cellule in 1 ml di tampone lisante composto da urea (5 M), tiourea (2 M), CHAPS (4% w/v), Na₃VO₄ (1 mM), PMSF (1 mM), DTT (80 mM), miscela di inibitori delle proteasi (10 µl/ml) e Nuclease Mix (10 µl/ml). Il campione è stato lasciato per 1 ora in ghiaccio e successivamente sottoposto a sonicazione (Hielscher UP200S, 3 × 40 s, ampiezza 40 %, cicli 0,5). Dopo centrifugazione a 13200 rpm/min per 30 min, il surnatante è stato prelevato e la sua concentrazione proteica è stata determinata mediante il saggio Bradford.

In aggiunta, sono stati esaminati otto campioni di tessuto tumorale prelevati da pazienti affetti da APC che hanno subito resezione chirurgica (stadio II di tumore). I suddetti campioni tissutali sono stati ottenuti dal Dipartimento di Chirurgia e Gastroenterologia dell'Università di Verona. Per ciascun campione, un totale di 30-50 mg di tessuto è stato omogeneizzato in ghiaccio in tampone lisante come sopra descritto.

Il contenuto proteico dei lisati cellulari ottenuti secondo le procedure precedentemente illustrate è stato separato mediante isoelettrofocalizzazione impiegando strisce di poliacrilammide lunghe 7 cm (IPG strip) con gradiente di pH non lineare compreso tra 3 e 10. Al fine di ottenere gel analitici e preparativi, ciascuna striscia è stata caricata con 100 ug di lisato proteico risospeso in un tampone di reidratazione composto da urea (5 M), tiourea (2 M), CHAPS (4% w/v), IPG buffer 3-10 NL (2% w/v), DTT (80 mM) e tracce di Blu di Bromofenolo. Le proteine sono state separate in un gradiente di voltaggio di 5000V, per un totale di 16000Vh. L'isoelettrofocalizzazione è stata effettuata utilizzando il sistema IPGphor Isoelectric Focusing

System (GE Healthcare Bio-Sciences GmbH, Uppsala, Svezia). Prima di effettuare l'SDS-PAGE, le strisce sono state ridotte per 15 min con un tampone (Tris/HCl [50 mM; pH 8.8], urea [6 M], glicerolo [30% v/v], SDS [2% w/v], e Blu di Bromofenolo) contenente DTT (2% w/v) e successivamente alchilate per 5 min nella stessa soluzione contenente iodacetamide (2.5% w/v) al posto del DTT. L'SDS-PAGE è stato effettuato su mini-gel NuPAGE® Novex® 4-12% Bis-Tris Zoom® utilizzando il sistema Novex X-Cell II™ Mini-cell (Invitrogen, Groningen, Paesi Bassi) a 200V costanti. La mappa bidimensionale così ottenuta è stata colorata con colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 oppure trasferita su membrana di nitrocellulosa per l'analisi sierologica. Il valore di punto isoelettrico degli spot proteici è stato stimato in base alla loro posizione sul gel bidimensionale mediante i grafici del gradiente di pH forniti da GE Healthcare Bio-Sciences GmbH. Il peso molecolare delle proteine è stato calcolato paragonandolo con la migrazione di una miscela di proteine a peso molecolare noto, il SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard.

I gel preparativi per la spettrometria di massa sono stati dapprima lavati con acqua deionizzata e

successivamente lasciati per 14 ore a 4°C in una soluzione al 40% di metanolo e al 10% di acido acetico. Infine sono stati colorati con una miscela composta da Coomassie Brilliant Blue G-250 (1 litro di soluzione: 1,5 g di Coomassie Brilliant Blue G-250, 100g di Ammonio solfato e 23,6 ml di Acido Fosforico) con il 20% di metanolo. Le immagini dei gel bidimensionali sono state acquisite tramite lo scanner ProXPress 2D Proteomic Imaging System (PerkinElmer, Boston, MA, Stati Uniti d'America) e salvate in formato TIFF mediante il programma ProScan 4.0 (PerkinElmer, Boston, MA, Stati Uniti d'America).

Per l'analisi sierologica le mappe di entrambe le linee (CF-PAC-1 e K8484) sono state trasferite su membrane di nitrocellulosa Hybond ECL tramite il sistema Novex X-Cell IITM Blot Module (Invitrogen, Groningen, Paesi Bassi) a 30V costanti. Dopo un'incubazione di 1 ora con TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM) contenete il 5% di latte scremato in polvere, le membrane sono state incubate a 4°C per 14 ore con i sieri (diluizione: 0,1 mg IgG/ml) in TBS con 0,05% di Tween 20 (TTBS) al 5% di latte scremato in polvere. Ogni membrana contenente l'estratto di CFPAC-1 è stata incubata con un solo

siero umano, similmente, ogni membrana contenente l'estratto di K8484 è stata incubata con un solo siero murino. Dopo tre lavaggi da 15 min con TTBS, le membrane sono state incubate per 90 min a temperatura ambiente con un anticorpo di coniglio anti-immunoglobuline G (IgG) umane (1:1000) o con un anticorpo di pecora anti-immunoglobuline G (IgG) murine (1:5000) entrambi coniugati alla perossidasi di rafano e diluiti in TTBS. La reattività del siero è stata messa in evidenza mediante la reazione di chemiofluorescenza usando l'ECL Plus. Le immagini sono state acquisite mediante lo scanner ProXPress 2D Proteomic Imaging System (PerkinElmer) alla lunghezza d'onda di 460 nm per l'eccitazione e di 530 nm per l'emissione e sono state salvate in formato TIFF mediante il programma ProScan 4.0 (PerkinElmer). Le immagini dei Western blot sono state successivamente confrontate con quelle dei rispettivi gel di CF-PAC-1 o di K8484 utilizzando il programma ProFinder 2D (PerkinElmer). Mediante tali analisi le proteine riconosciute dai sieri sono state localizzate sui corrispondenti gel colorati per poi procedere con l'identificazione mediante spettrometria di massa.

ESEMPIO 4: Identificazione delle proteine mediante spettrometria di massa

Le proteine di interesse sono state estratte dai gel preparativi di CF-PAC-1 e di K8484 e decolorate per 15 ore con una soluzione di ammonio bicarbonato 5 mM e 50% acetonitrile. Successivamente le proteine sono state digerite *in gel* con tripsina e analizzate mediante spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight (MALDI-TOF). Per l'analisi tramite MALDI-TOF MS, 1.5 μ l di ciascuna miscela peptidica sono stati uniti con 1,5 μ l di soluzione di matrice (1%w/v acido α -ciano-4 idrossicinnamico in 40% acetonitrile e 60% TFA allo 0.1%) e sono stati applicati su di una piastra target lasciata asciugare all'aria.

Gli spettri sono stati ottenuti utilizzando uno spettrometro Bruker Reflex III MALDI-TOF (Bremen, Germania). L'interpretazione degli spettri dei digeriti triptici è stata effettuata mediante "*peptide mass fingerprinting*" (PMF) usando il programma MassScot (www.matrixscience.com).

ESEMPIO 5: Saggio ELISA

La proteina Ezrina è stata immobilizzata (0,5 μ g/ml in PBS) in micropiastre da 96 pozzetti per

una notte a temperatura ambiente; successivamente si è provveduto a saturare i siti liberi con PBS contenente il 4% di albumina sierica bovina per 2 ore a temperatura ambiente. I sieri dei pazienti (diluizione 0,01 mg/ml) diluiti in PBS, 1% BSA, 0.05% Tween-20 sono stati aggiunti ai pozzetti ed incubati per 2 ore a temperatura ambiente. In seguito ai lavaggi, le micropiastre sono state incubate con l'anticorpo di coniglio anti-immunoglobuline G (IgG) di uomo coniugato a perossidasi di rafano (HRP) (diluizione 1:1000) per 1 ora a temperatura ambiente; successivamente il TMB è stato aggiunto a ciascun pozzetto. La reazione è stata arrestata con HCl 2 N e il valore di densità ottica (OD) è stato misurato a 450 nm. Tutti i campioni sono stati analizzati in triplicato ed i risultati rappresentano i valori medi sottratti del background rilevato nei pozzetti in cui la proteina non era stata immobilizzata.

ESEMPIO 6: Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante i programmi GraphPad (Versione 4, San Diego, CA), MedCalc (Versione 11.4.2.0, Mariakerke, Belgio) e SPSS (Versione 18.0, Chicago, IL, Stati Uniti d'America). La distribuzione di età e sesso

dei pazienti e dei controlli è stata analizzata rispettivamente mediante i test t di Student e test di Fisher. L'analisi statistica delle frequenze di riconoscimento da parte dei sieri di pazienti e controlli nei confronti degli antigeni tumorali è stata effettuata mediante il test di Fisher nell'analisi SERPA ed il test t di Student durante l'analisi ELISA. La curva ROC (Receiver Operating Characteristics) è stata effettuata al fine di stabilire i valori soglia ottimali in grado di discriminare pazienti e controlli. Le correlazioni e associazioni tra le variabili sono state analizzate mediante i test di Pearson, del Chi-Quadro o di Fisher, come più appropriato. In tutti i test sono stati considerati come statisticamente significativi valori di $P < .05$ (*), $P < .005$ (**) e $P < .0005$ (***).

RIVENDICAZIONI

1. Procedimento *in vitro* per la diagnosi dell'adenocarcinoma duttale pancreatico in un soggetto o per la determinazione della predisposizione di un soggetto all'adenocarcinoma duttale pancreatico, comprendente il passaggio di determinare, in un campione biologico del soggetto, la presenza, l'assenza o il livello di anticorpi diretti verso l'ezrina, in cui la presenza di anticorpi diretti verso l'ezrina o il livello oltre una soglia predeterminata di anticorpi diretti verso l'ezrina è indicativa/o di adenocarcinoma duttale pancreatico o di predisposizione all'adenocarcinoma duttale pancreatico.
2. Procedimento secondo la rivendicazione 1, in cui il passaggio di determinare la presenza, l'assenza o il livello di anticorpi diretti verso l'ezrina è eseguito mediante saggio immunologico.
3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui il saggio immunologico è eseguito mediante l'impiego di almeno un reagente di affinità atto a legare anticorpi diretti verso l'ezrina formando in tal modo un primo immunocomplesso.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 3, in cui il reagente di affinità è eozina umana o una sua porzione.

5. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 4, comprendente inoltre il passaggio di determinare la presenza, l'assenza o il livello dell'antigene carboidratico 19.9 nel campione biologico del soggetto.

6. Procedimento secondo la rivendicazione 5, in cui il passaggio di determinare la presenza, l'assenza o il livello dell'antigene carboidratico 19.9 è eseguito mediante saggio immunologico.

7. Procedimento secondo la rivendicazione 6, in cui il saggio immunologico è eseguito mediante l'impiego di almeno un reagente di affinità atto a legare l'antigene carboidratico 19.9 formando in tal modo un secondo immunocomplesso, il reagente di affinità essendo preferibilmente scelto fra un anticorpo monoclonale o policlonale, un frammento anticorpale, un aptamero, una proteina legante derivata da uno scaffold anticorpale o non anticorpale.

8. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 7, comprendente inoltre il passaggio di determinare la presenza, l'assenza o il

livello di anticorpi diretti verso l'alfa-enolasi fosforilata nel campione biologico del soggetto.

9. Procedimento secondo la rivendicazione 8, in il passaggio di determinare la presenza, l'assenza o il livello di anticorpi diretti verso l'alfa-enolasi fosforilata è eseguito mediante saggio immunologico.

10. Procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui il saggio immunologico è eseguito mediante l'impiego di almeno un reagente di affinità atto a legare gli anticorpi diretti verso l'alfa-enolasi fosforilata formando in tal modo un terzo immunocomplesso.

11. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, che è un saggio immunologico ELISA.

12. Procedimento secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 10, che è un saggio immunologico Western blot.

13. Kit per la diagnosi *in vitro* dell'adenocarcinoma duttale pancreatico in un soggetto o per la determinazione della predisposizione di un soggetto all'adenocarcinoma duttale pancreatico, comprendente almeno un reagente di affinità atto a legare anticorpi diretti verso l'ezrina formando in tal modo un primo immunocomplesso, nonché mezzi per la rivelazione del primo immunocomplesso.

14. Kit secondo la rivendicazione 13, in cui il reagente di affinità è eizrina umana o una sua porzione.

15. Kit secondo la rivendicazione 13 o 14, in cui i mezzi per la rivelazione del primo immunocomplesso comprendono un anticorpo secondario atto a legare il primo immunocomplesso, l'anticorpo secondario essendo preferibilmente marcato con un primo tracciante rivelabile preferibilmente scelto dal gruppo che consiste di traccianti enzimatici, chemiluminescenti, fluorescenti, radioattivi, di affinità.

16. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13 a 15, comprendente almeno un reagente di affinità atto a legare l'antigene carboidratico 19.9 formando in tal modo un secondo immunocomplesso, nonché mezzi per la rivelazione del secondo immunocomplesso, il reagente di affinità essendo preferibilmente scelto fra un anticorpo monoclonale o policlonale, un frammento anticorpale, un aptamero, una proteina legante derivata da uno scaffold anticorpale o non anticorpale.

17. Kit secondo la rivendicazione 16, in cui i mezzi per la rivelazione del secondo immunocomplesso comprendono un anticorpo secondario atto a legare il secondo immunocomplesso, l'anticorpo secondario

essendo preferibilmente marcato con un secondo tracciante rivelabile preferibilmente scelto dal gruppo che consiste di traccianti enzimatici, chemiluminescenti, fluorescenti, radioattivi, di affinità.

18. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13 a 17, comprendente almeno un reagente di affinità atto a legare anticorpi diretti verso l'alfa-enolasi fosforilata formando in tal modo un terzo immunocomplesso, nonché mezzi per la rivelazione del terzo immunocomplesso.

19. Kit secondo la rivendicazione 18, in cui i mezzi per la rivelazione del terzo immunocomplesso comprendono un anticorpo secondario atto a legare il terzo immunocomplesso, l'anticorpo secondario essendo preferibilmente marcato con un secondo tracciante rivelabile preferibilmente scelto dal gruppo che consiste di traccianti enzimatici, chemiluminescenti, fluorescenti, radioattivi, di affinità.

20. Kit secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13 a 19, comprendente un supporto solido preferibilmente scelto dal gruppo che consiste di piastra multipozzetto, microsfera, membrana, vetrino, resina, chip sensore, *bead*.

21. Ezrina o una sua porzione per l'uso in un procedimento per la diagnosi dell'adenocarcinoma duttale pancreatico in un soggetto o per la determinazione della predisposizione di un soggetto all'adenocarcinoma duttale pancreatico.

CLAIMS

1. A method for the *in vitro* diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma in a subject or for determining the predisposition of a subject to pancreatic ductal adenocarcinoma, comprising the step of determining in a biological sample from the subject, the presence, the absence or the level of antibodies against ezrin, wherein the presence of antibodies against ezrin or the level of antibodies against ezrin above a predetermined threshold is indicative of pancreatic ductal adenocarcinoma or of a predisposition to pancreatic ductal adenocarcinoma.
2. The method according to claim 1, wherein the step of determining the presence, the absence or the level of antibodies directed against ezrin is performed by an immunoassay.
3. The method according to claim 2, wherein the immunoassay is performed by the use of at least one affinity reagent suitable to bind antibodies against ezrin thereby forming a first immunocomplex.
4. The method according to claim 3, wherein the affinity reagent is human ezrin or a portion thereof.

5. The method according to any of claims 1 to 4, further comprising the step of determining the presence, the absence or the level of carbohydrate antigen 19.9 in the biological sample from the subject.

6. The method according to claim 5, wherein the step of determining the presence, the absence or the level of carbohydrate antigen 19.9 is performed by an immunoassay.

7. The method according to claim 6, wherein the immunoassay is performed by the use of at least one affinity reagent suitable to bind carbohydrate antigen 19.9 thereby forming a second immunocomplex, wherein the affinity reagent is preferably selected from a monoclonal or polyclonal antibody, an antibody fragment, an aptamer, a binding protein derived from an antibody or non-antibody scaffold.

8. The method according to any of claims 1 to 7, further comprising the step of determining the presence, the absence or the level of antibodies directed against phosphorylated alpha-enolase in the biological sample from the subject.

9. The method according to claim 8, wherein the step of determining the presence, the absence or

the level of antibodies directed against phosphorylated alpha-enolase is performed by an immunoassay.

10. The method according to claim 9, wherein the immunoassay is performed by the use of at least one affinity reagent suitable to bind antibodies directed against phosphorylated alpha-enolase thereby forming a third immunocomplex.

11. The method according to any of claims 1 to 10, which is an ELISA immunoassay.

12. The method according to any of claims 1 to 10, which is a Western Blot immunoassay.

13. A kit for the *in vitro* diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma in a subject or for determining the predisposition of a subject to pancreatic ductal adenocarcinoma, comprising at least one affinity reagent suitable to bind antibodies against ezrin thereby forming a first immunocomplex, as well as means of detecting the first immunocomplex.

14. The kit according to claim 13, wherein the affinity reagent is human ezrin or a portion thereof.

15. The kit according to claim 13 or 14, wherein the means of detecting the first immunocomplex

comprise a secondary antibody suitable to bind the first immunocomplex, wherein the secondary antibody is preferably labeled with a first detectable label preferably selected from the group consisting of enzyme labels, chemiluminescent labels, fluorescent labels, radioactive labels, affinity labels.

16. The kit according to any of claims 13 to 15, comprising at least one affinity reagent suitable to bind carbohydrate antigen 19.9 thereby forming a second immunocomplex, as well as means of detecting the second immunocomplex, wherein the affinity reagent is preferably selected from a monoclonal or polyclonal antibody, an antibody fragment, an aptamer, a binding protein derived from an antibody or non-antibody scaffold.

17. The kit according to claim 16, wherein the means of detecting the second immunocomplex comprise a secondary antibody suitable to bind the second immunocomplex, wherein the secondary antibody is preferably labeled with a second detectable label preferably selected from the group consisting of enzyme labels, chemiluminescent labels, fluorescent labels, radioactive labels, affinity labels.

18. The kit according to any of claims 13 to 17, comprising at least one affinity reagent suitable to bind antibodies against phosphorylated alpha-enolase thereby forming a third immunocomplex, as well as means of detecting the third immunocomplex.

19. The kit according to claim 18, wherein the means of detecting the third immunocomplex comprise a secondary antibody suitable to bind the third immunocomplex, wherein the secondary antibody is preferably labeled with a third detectable label which is preferably selected from the group consisting of enzyme labels, chemiluminescent labels, fluorescent labels, radioactive labels, affinity labels.

20. The kit according to any of claims 13 to 19, which comprises a solid support preferably selected from a multiwell plate, a microsphere, a membrane, a slide, a resin, a sensor chip, a bead.

21. Ezrin or a portion thereof for use in a method of diagnosing pancreatic ductal adenocarcinoma in a subject or in a method of determining the predisposition of a subject to pancreatic ductal adenocarcinoma.

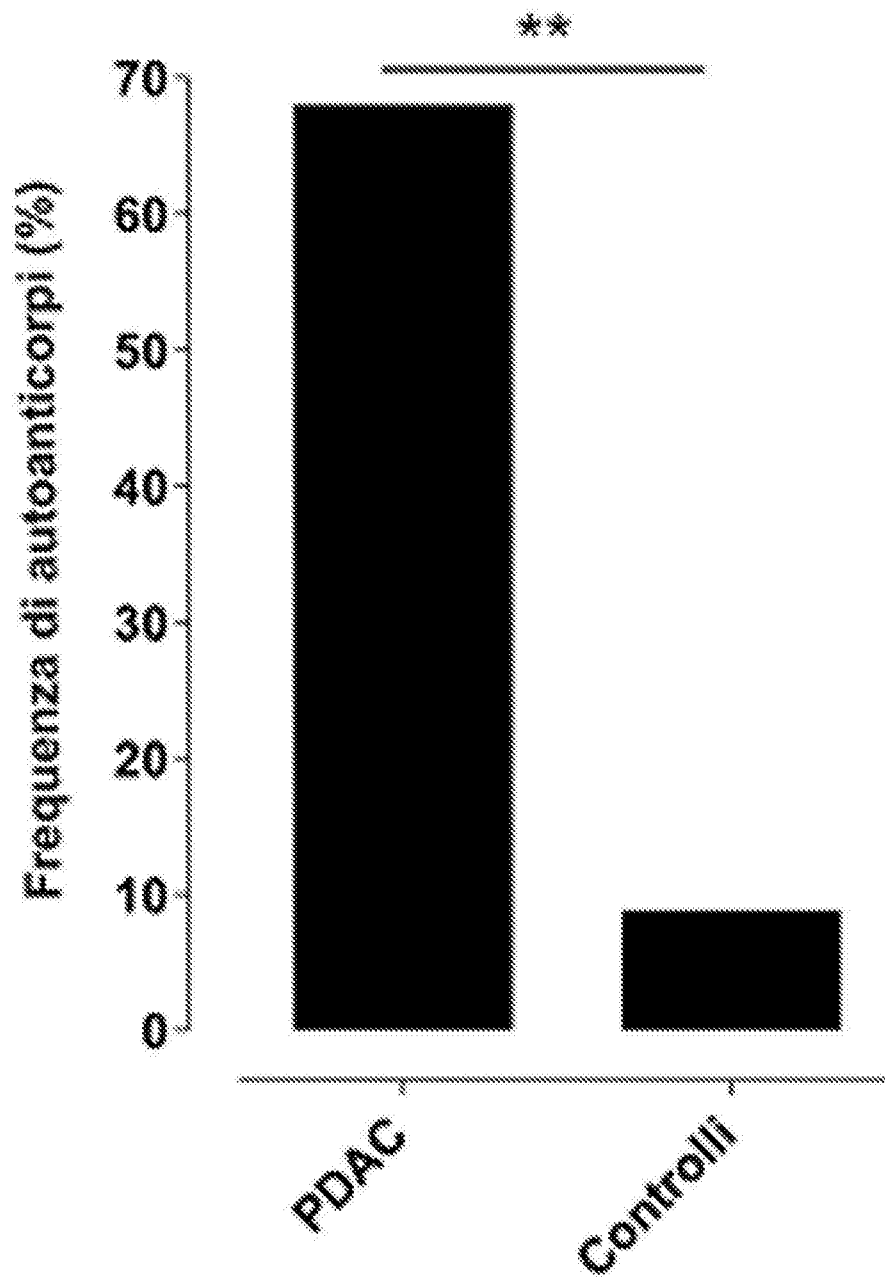


FIG.1

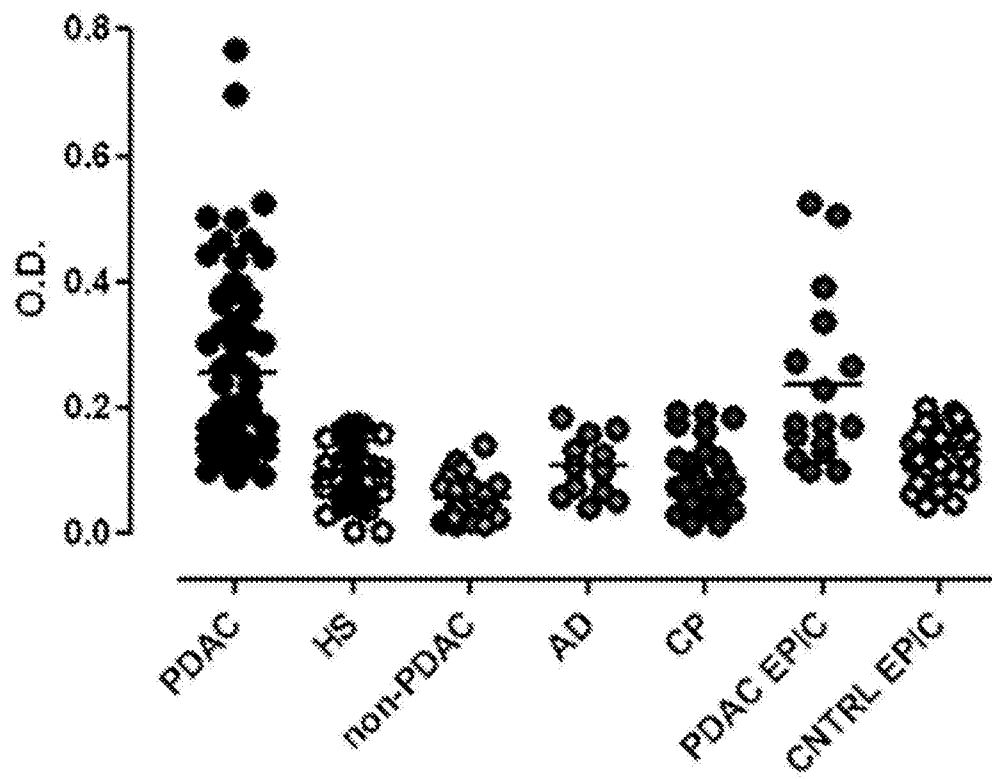


FIG.2

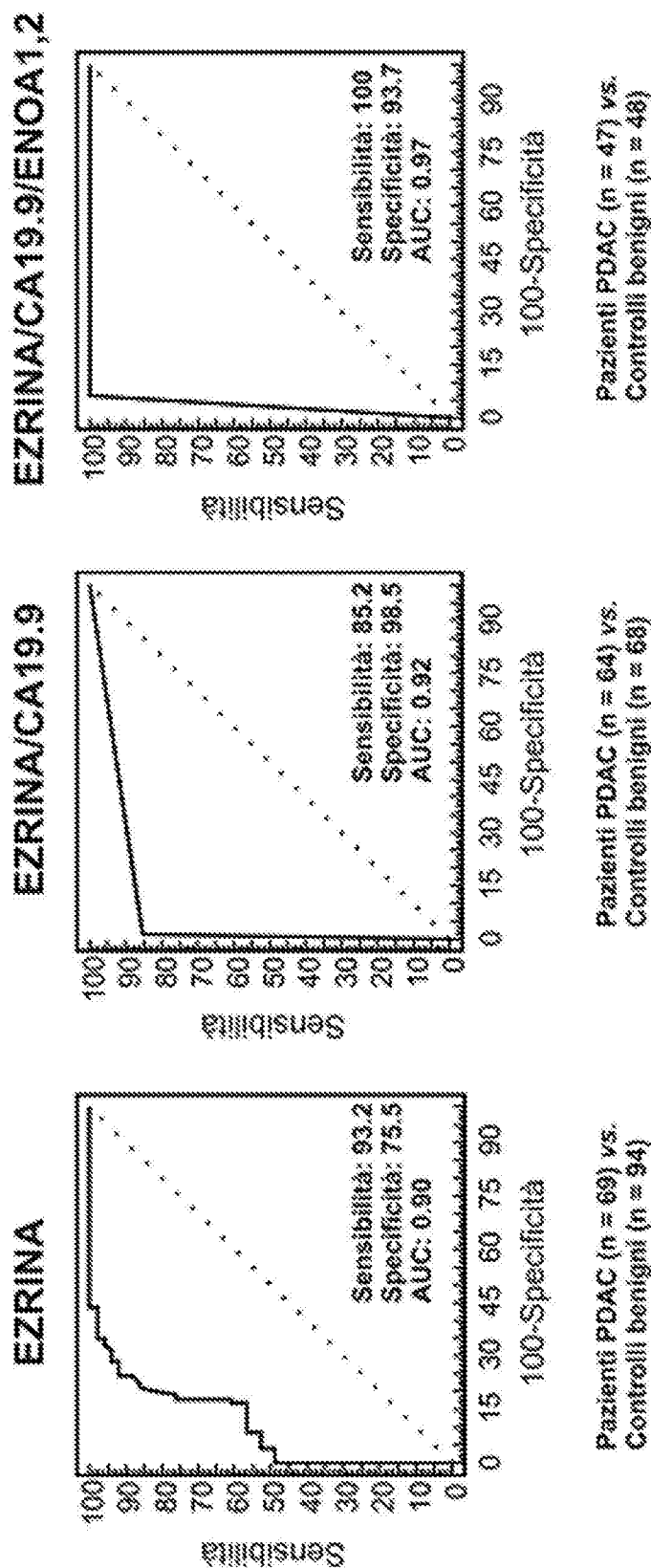


FIG.3