



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 300 156**

⑫ Número de solicitud: 200302357

⑮ Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **10.10.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2008**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.06.2008

⑰ Solicitante/s: **PROGENIKA BIOPHARMA, S.A.**
Parque Tecnológico, Edificio 801, A-2
48160 Derio, Vizcaya, ES

⑱ Inventor/es: **Amo Iribarren, Jokin del;**
Junquera Sánchez-Vallejo, Corina;
Ochoa Garay, Jorge;
Escudero García de Galdeano, Pedro;
Argüelles Sánchez, María Eladia;
Toyos González, Juan Ramón de los;
Santa Cruz, Simón;
Martínez Martínez, Antonio;
Simón Buela, Laureano y
Barneo Serra, Luis

⑲ Agente: **Carpintero López, Francisco**

⑳ Título: **Métodos para el diagnóstico *in vitro* y pronóstico *in vitro* del cáncer de páncreas y para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de páncreas.**

㉑ Resumen:

Métodos para el diagnóstico *in vitro* y pronóstico *in vitro* del cáncer de páncreas y para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de páncreas.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la presencia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas, en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho cáncer, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína GOLPH-2, y/o los efectos de esta expresión.

ES 2 300 156 A1

DESCRIPCIÓN

Métodos para el diagnóstico *in vitro* y pronóstico *in vitro* del cáncer de páncreas y para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de páncreas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar la presencia del cáncer de páncreas en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer; a la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia de dicho cáncer, con el fin de desarrollar nuevos medicamentos; así como a agentes que inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína GOLPH-2, y/o los efectos de esta expresión.

Antecedentes de la invención

El cáncer de páncreas fue la causa de más de 220.000 muertes en el mundo, y de más de 3.600 en España, durante el año 2.000 (GLOBOCAN). El comportamiento clínico del cáncer de páncreas es homogéneo y siempre infausto, sin diferencias notables en la supervivencia según el estadio. El número de pacientes con cáncer de páncreas de buen pronóstico es insignificante. Una posible explicación es que incluso en pacientes con tumores pequeños, encuadrados en el estadio I, la enfermedad está diseminada. Su diagnóstico en una fase inicial, salvo en casos fortuitos, es difícil; un 75% de los pacientes diagnosticados presentan enfermedad avanzada (Estadios III y IV). Se trata de una neoplasia muy agresiva, resistente a los tratamientos citostáticos y sólo entre un 1 y un 4% de los casos permanecen vivos a los cinco años del diagnóstico, siempre que el tumor esté localizado y haya podido ser extirpado en su totalidad (Warshaw A.L., and Fernández del Castillo C., N. Eng. J. Med., 1992, 326:455-465; Ahlgren J.D., Semin. Oncol. 1996, 23:241-250). Es por todo ello que en el caso del cáncer de páncreas, tanto el desarrollo de sistemas de diagnóstico precoz como el de terapias eficaces, resultan cruciales para el control de la enfermedad (Byungwoo R., *et al.*, Cancer Res., 2002, 62:819-826).

Muchos de los genes y proteínas implicados en la progresión de estos carcinomas son todavía desconocidos; la identificación de genes y proteínas expresados diferencialmente en asociación con el proceso de invasividad tumoral, podría conducir a la identificación de marcadores biológicos y dianas terapéuticas, que podrían tener un gran valor para el diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de esta enfermedad.

La Fosfoproteína 2 de Golgi (Golgi phosphoprotein 2, GP73 o GOLPH-2) es una proteína transmembrana que se localiza en el aparato de Golgi. GOLPH-2 se expresa preferentemente en células epiteliales, en diferentes tejidos humanos (Kladney R.D., *et al.*, 2000, Gene, 249:53-65). Las proteínas del aparato de Golgi, como GOLPH-2, están implicadas en el procesamiento de las proteínas sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso, y en el transporte de proteínas a través del aparato de Golgi. La función biológica de GOLPH-2 es desconocida; se ha demostrado que su expresión es muy alta en hepatocitos de pacientes afectados de hepatitis viral y que estos elevados niveles de expresión están inducidos por la infección viral (Kladney R.D., *et al.*, 2002, Virology, 301:236-246; Kladney R.D., *et al.*, 2002, Hepatology, 35:1431-1440). Por otro lado, se han solicitado patentes de composiciones, kits y métodos para detectar, caracterizar, prevenir y tratar cánceres humanos de mama (US20030124128) y cáncer de próstata (US20030108963), basados técnicamente en la sobreexpresión del gen *golph2* en estos tumores; pero no se ha demostrado previamente que el gen *golph-2*, o la proteína GOLPH- 2 que codifica, estén sobreexpresados en muestras de tejido tumoral procedentes de individuos afectados de adenocarcinoma ductal de páncreas.

Inesperadamente, los autores de la presente invención han descubierto, tras laboriosa investigación y empleando diferentes técnicas (DNA-chips y RT-PCR cuantitativa para medir los niveles de expresión génica y Western-blot para medir los niveles de expresión proteica), que la expresión génica de *golph-2* está incrementada en el carcinoma de páncreas, en especial en el adenocarcinoma ductal de páncreas, al compararla con la expresión en tejido no tumoral procedente de los mismos individuos o de individuos afectados de pancreatitis. Los autores de la presente invención han descubierto que también la concentración de la proteína GOLPH-2 es muy elevada en el carcinoma de páncreas, especialmente en el adenocarcinoma ductal de páncreas, al compararla con la expresión en tejido no tumoral procedente de los mismos individuos, de individuos sanos, o de individuos afectados de pancreatitis. Estas evidencias convierten a GOLPH-2 en una útil diana para el desarrollo de nuevos métodos *in vitro* de diagnóstico y pronóstico, y para la identificación y desarrollo de compuestos para terapia del cáncer de páncreas, en especial de adenocarcinomas ductales de páncreas.

La presente invención proporciona por tanto un método *in vitro* para detectar la presencia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer, basado en la detección y/o cuantificación de la proteína GOLPH-2, del mRNA del gen *golph-2* o el correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo. Asimismo, la presente invención proporciona dianas o herramientas para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas. Finalmente, la invención proporciona agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína GOLPH-2 para el tratamiento del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Objeto de la invención

La presente invención tiene como objeto principal el desarrollo de un método *in vitro* para detectar la presencia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer.

Un segundo objeto de la presente invención es un método *in vitro* para buscar, identificar, desarrollar y evaluar la eficacia de compuestos para la terapia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Un objeto adicional de la invención reside en el uso de secuencias derivadas del gen golph-2 para el diagnóstico y pronóstico *in vitro* del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas, así como para la búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para la terapia de dicho cáncer.

Otro objeto de la presente invención consiste en proporcionar agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína GOLPH-2, para el tratamiento del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Por último, es también objeto de la invención una composición farmacéutica que comprenda uno o varios agentes terapéuticos junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Descripción de las figuras

Figura 1: Curva de desnaturalización del producto de la PCR del gen diana, golph-2 ($T_m = 82^\circ\text{C}$) y del gen de referencia, ribl10 ($T_m=84^\circ\text{C}$), en experimentos de medida de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, en muestras de páncreas.

Figura 2: Cálculo de la eficiencia de amplificación de las reacciones de PCR de golph-2, en experimentos de medida de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, en muestras de páncreas.

Figura 3: Cálculo de la eficiencia de amplificación de las reacciones de PCR de ribl10, en experimentos de medida de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa en tiempo real, en muestras de páncreas.

Descripción detallada de la invención

Para facilitar la comprensión de la presente solicitud de patente, exponemos a continuación el significado de algunos términos y expresiones en el contexto de la invención:

Los términos “sujeto” o “individuo” se refieren a miembros de especies de animales mamíferos, e incluye, pero no se limita, a animales domésticos, primates y humanos; el sujeto es preferiblemente un ser humano, masculino o femenino, de cualquier edad o raza.

El término “cáncer” se refiere a la enfermedad que se caracteriza por una proliferación descontrolada de células anormales capaces de invadir tejidos adyacentes y diseminarse a órganos lejanos.

El término “carcinoma” se refiere al tejido que resulta del crecimiento celular anormal o descontrolado.

El término “cáncer de páncreas” o “cáncer en el páncreas” o “carcinoma de páncreas” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células del páncreas.

El término “adenocarcinoma ductal de páncreas” se refiere a cualquier desorden proliferativo maligno de células ductales del páncreas.

El término “tumor” se refiere a cualquier masa anormal de tejido producto de un proceso neoplásico, benigno (no canceroso) o maligno (canceroso).

El término “gen” se refiere a una cadena molecular de desoxirribonucleótidos, que codifica una proteína.

El término “DNA” se refiere al ácido desoxirribonucleico. Una secuencia de DNA es una secuencia de desoxirribonucleótidos.

El término “cDNA” se refiere a una secuencia de nucleótidos, complementaria de una secuencia de mRNA.

El término “RNA” se refiere al ácido ribonucleico. Una secuencia de RNA es una secuencia de ribonucleótidos.

El término “mRNA” se refiere al ácido ribonucleico mensajero, que es la fracción del RNA total que se traduce a proteínas.

ES 2 300 156 A1

La frase “mRNA transcrito de” se refiere a la transcripción del gen (DNA) en mRNA, como primer paso para que el gen se exprese y traduzca a proteína.

El término “secuencia de nucleótidos” o “secuencia nucleotídica” se refiere indistintamente a una secuencia de ribonucleótidos (RNA) o de desoxirribonucleótidos (DNA).

El término “proteína” se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, unidos por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye todas las formas de modificaciones post-traduccionales, por ejemplo glicosilación, fosforilación o acetilación.

Los términos “péptido” y “polipéptido” se refieren a cadenas moleculares de aminoácidos que representan un fragmento proteico. Los términos “proteína” y “péptido”, se usan indistintamente.

El término “anticuerpo” se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina “antígeno”. El término “anticuerpo” comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los “anticuerpos monoclonales” son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio o “determinante” antigénico. Los “anticuerpos policlonales” incluyen poblaciones heterogéneas de anticuerpos, que están dirigidos contra diferentes determinantes antigénicos.

El término “epítipo”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a un determinante antigénico de una proteína, que es la secuencia de aminoácidos de la proteína que un anticuerpo específico reconoce.

El término “fase sólida”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una matriz no acuosa a la que se puede unir el anticuerpo. Ejemplos de materiales para fase sólida incluyen vidrio, polisacáridos, por ejemplo agarosa, poliácridamida, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. Ejemplos de formas de fase sólida son el pocillo de una placa de ensayo o una columna de purificación.

El término “oligonucleótido cebador”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica, que es complementaria de una secuencia nucleotídica del gen golph-2. Cada cebador hibrida con su secuencia nucleotídica diana y actúa como un sitio de inicio para la polimerización del DNA.

El término “sonda”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una secuencia nucleotídica complementaria de una secuencia nucleotídica derivada del gen golph-2, que se puede utilizar para detectar esa secuencia nucleotídica derivada del gen golph-2.

El término “diana terapéutica” se refiere a secuencias nucleotídicas o peptídicas, contra las que se puede diseñar y aplicar clínicamente un fármaco o compuesto terapéutico.

El término “antagonista” se refiere a cualquier molécula que inhiba la actividad biológica de la molécula antagonizada. Ejemplos de moléculas antagonistas incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, variaciones de secuencia de péptidos naturales y pequeñas moléculas orgánicas (de peso molecular inferior a 500 daltons).

La presente invención se basa en el descubrimiento de que tanto la expresión génica de golph-2, como la concentración de la proteína GOLPH-2 se ve incrementada en el cáncer de páncreas, en particular en el adenocarcinoma ductal de páncreas de un individuo.

En este sentido, la presente invención proporciona, en primer lugar, un método *in vitro* para detectar la presencia de un cáncer en el páncreas de un individuo, en especial de un adenocarcinoma ductal de páncreas, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer, que comprende:

a) la detección y/o cuantificación de la proteína GOLPH-2, del mRNA del gen golph-2 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

b) la comparación de la cantidad de proteína GOLPH-2, de la cantidad de mRNA del gen golph-2 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína GOLPH-2, con la cantidad del mRNA del gen golph-2 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores del mismo individuo o con los valores normales de referencia.

El método proporcionado por la presente invención es de alta sensibilidad y especificidad, y se basa en que sujetos o individuos diagnosticados de cáncer de páncreas, en especial de adenocarcinoma ductal de páncreas, presentan niveles elevados de mRNA transcrito del gen golph-2 (*niveles elevados de expresión del gen golph-2*), o concentraciones elevadas de la proteína codificada por el gen golph-2 (*proteína GOLPH-2*), en comparación con los correspondientes niveles en muestras procedentes de sujetos sin historial clínico de estos cánceres.

El presente método comprende una etapa de obtención de la muestra del individuo. Se puede trabajar con distintas muestras fluidas como, por ejemplo: orina, sangre, plasma, suero, líquido pleural, líquido ascítico, líquido sinovial,

bilis, semen, exudado de flujo gástrico o líquido cefalorraquídeo. La muestra también puede ser tejido de páncreas, que se puede obtener por cualquier método convencional, preferiblemente resección quirúrgica.

Las muestras pueden ser obtenidas de sujetos previamente diagnosticados, o no diagnosticados, de un determinado tipo de carcinoma; o también de un sujeto en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra un cáncer, en particular contra el cáncer de páncreas.

El presente método comprende además una etapa de extracción de la muestra, ya sea para obtener el extracto de proteínas de ésta, o bien para obtener el extracto de RNA total. Uno de estos dos extractos representa el material de trabajo para la siguiente fase. Los protocolos de extracción de la proteína total o del RNA total son bien conocidos por el experto en la materia (Chomczynski P. *et al.*, Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532).

Cualquier ensayo convencional se puede utilizar en el marco de la invención para detectar un cáncer, siempre que mida *in vitro* los niveles de mRNA transcrito del gen golph-2 o su cDNA complementario, o la concentración de proteína GOLPH-2, en muestras recogidas de los individuos a analizar y de individuos control.

Así pues, esta invención proporciona un método para detectar la presencia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas, en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dichos cánceres en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer, basado bien en la medida de la concentración de la proteína GOLPH-2, o bien en la medida del nivel de expresión del gen golph-2.

En el caso de que lo que se pretenda detectar sea la proteína GOLPH-2, el método de la invención comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína GOLPH-2, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por anticuerpos y la proteína GOLPH-2.

Existe una amplia variedad de ensayos inmunológicos disponibles para detectar y cuantificar la formación de complejos específicos antígeno-anticuerpo; numerosos ensayos de unión de proteínas, competitivos y no competitivos, han sido previamente descritos, y un gran número de estos ensayos está disponible comercialmente.

Así, la proteína GOLPH-2 se puede cuantificar con anticuerpos como, por ejemplo: anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la Proteína GOLPH-2; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no; los anticuerpos no marcados se pueden utilizar en ensayos de aglutinación; los anticuerpos marcados se pueden utilizar en una amplia variedad de ensayos. Las moléculas marcadoras que se pueden utilizar para marcar los anticuerpos incluyen radionucleótidos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes y derivados.

Existe una amplia variedad de ensayos bien conocidos, que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (Enzyme-Linked immunosorbent assay o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA competitivo (Competitive enzyme immunoassay o Inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (Double antibody sandwich-ELISA o ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como *dipsticks*. Otras maneras para detectar y cuantificar la proteína GOLPH-2, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

El inmunoensayo preferido en el método de la invención es un ensayo ELISA sándwich con doble anticuerpo (*DAS-ELISA*). En este inmunoensayo se puede utilizar cualquier anticuerpo o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítomos de la proteína GOLPH-2. Como ejemplo de uno de los muchos posibles formatos de este ensayo, un anticuerpo, monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de anticuerpos, que recubren una fase sólida, se ponen en contacto con la muestra a analizar, y se incuban durante un tiempo y en condiciones apropiados para formar los complejos antígeno-anticuerpo. Después de un lavado en condiciones apropiadas para eliminar los complejos no específicos, se incuba con los complejos antígeno-anticuerpo, en condiciones y tiempo apropiados, un reactivo indicador, que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal, o un fragmento de este anticuerpo, o una combinación de estos anticuerpos, unidos a un compuesto generador de una señal. La presencia de la proteína GOLPH-2 en la muestra a analizar, se detecta y cuantifica, en caso de que exista, midiendo la señal generada. La cantidad de proteína GOLPH-2 presente en la muestra analizar es proporcional a esa señal.

En el caso de que se pretenda detectar el mRNA o el cDNA correspondiente al gen golph-2, y no la proteína, el método de la invención para detectar *in vitro* el carcinoma posee etapas diferentes. Así, una vez obtenida la muestra y extraído el RNA total, según el método de la invención se realiza la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen golph-2, que comprende una primera etapa de amplificación del extracto de RNA total o del correspondiente

cDNA sintetizado por transcripción inversa del mRNA, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen golph-2.

Un ejemplo de amplificación del mRNA, consiste en retrotranscribir el mRNA en cDNA (RT), seguido de la Re-
 5 acción en Cadena de la polimerasa (PCR), usando oligonucleótidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados 5'-TTCCCAGTAAGGCTCTCTAAG-3' (SEQ ID NO 1) y 5'-CCAGCTAGATGCTCTGTAAGT-3' (SEQ ID NO 2); la PCR es una técnica de amplificación de una determinada secuencia nucleotídica (diana) contenida en una mezcla de secuencias nucleotídicas. En la PCR, se utiliza un exceso de una pareja de oligonucleótidos cebadores, que hibridan con las hebras complementarias de la secuencia nucleotídica diana. A continuación, una enzima con actividad
 10 polimerasa (DNA Taq Polimerasa) extiende cada cebador, utilizando como molde la secuencia nucleotídica diana. Los productos de la extensión se convierten entonces en secuencias dianas, tras la disociación de la hebra diana original. Nuevas moléculas de cebador hibridan y la polimerasa las extiende; el ciclo se repite para aumentar exponencialmente el número de secuencias diana. Esta técnica está descrita en las patentes US 4683195 y US 4683202. Se han descrito previamente muchos métodos para detectar y cuantificar los productos de la amplificación por PCR, de los que cual-
 15 quiera puede ser usado en esta invención. En un método preferido de la invención, el producto amplificado se detecta por electroforesis en gel de agarosa, de la manera siguiente: cinco microlitros del producto de la amplificación se someten a una separación por electroforesis en un gel de agarosa a una concentración del 2%, en un tampón TBE 0,5x a 100 vdc, durante una hora. Tras la electroforesis, el gel se tiñe con bromuro de etidio y el producto de la amplifica-
 20 ción se visualiza al iluminar el gel con luz ultravioleta (uv); como alternativa a la tinción, y realización preferida, se puede transferir el producto amplificado a una membrana de nailon por técnicas de *Southern blotting* o *transferencia Southern*, para ser detectado con una sonda específica del cDNA del gen golph-2, convenientemente marcada.

En otro ejemplo la detección del mRNA se realiza transfiriendo el mRNA a una membrana de nailon, mediante téc-
 25 nicas de transferencia como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern, y detectándolo con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen golph-2.

En una realización particular la amplificación y cuantificación del mRNA correspondiente al gen golph-2 se realiza a la vez mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

El paso final del método de la invención para detectar *in vitro* un carcinoma, en una muestra procedente de un
 30 individuo, comprende comparar la cantidad de proteína GOLPH- 2, la cantidad de mRNA del gen golph-2 o la cantidad del correspondiente cDNA, detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína GOLPH-2, la cantidad de mRNA del gen golph-2 o la cantidad del correspondiente cDNA, detectada en las muestras de sujetos control o en muestras anteriores no tumorales del mismo individuo, o con los valores normales de referencia.

En su segundo objeto, la invención también proporciona un método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de
 35 agentes para terapia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas que comprende:

a) poner en contacto un cultivo de células tumorales, con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el
 40 tiempo apropiados para permitir que interaccionen,

b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen golph-2 o la proteína GOLPH-2, y

c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células tumorales sin tratar con el compuesto
 45 candidato.

La cuantificación de los niveles de expresión del gen golph-2 o la proteína GOLPH-2 se realizan de modo semejante a como se indica en el método de la invención para detectar *in vitro* la presencia de un carcinoma en un individuo.

50 Cuando un agente disminuye los niveles de expresión del gen golph-2 o revierte los efectos de la expresión elevada de dicho gen, preferiblemente disminuyendo los niveles de proliferación celular, este agente se convierte en candidato para la terapia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen golph-
 55 2, en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas. Dentro de los métodos de búsqueda, resalta la importancia adquirida últimamente por los métodos de screening de fármacos, basados en el binding, competitivo o no, de la molécula potencial fármaco a la diana terapéutica.

60 Otro objeto adicional de la invención se refiere al uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen golph-2 para detectar la presencia del cáncer de páncreas, en especial del adenocarcinoma ductal de páncreas, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer.

65 Otro objeto de la invención consiste en proporcionar agentes caracterizados porque inhiben la expresión y/o la actividad de la proteína GOLPH-2. Estos agentes, que se pueden identificar y evaluar según la presente invención, pueden ser seleccionados del grupo formado por:

a) un anticuerpo, o combinación de anticuerpos, específicos contra uno o más epítomos presentes en la proteína GOLPH-2, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano o humanizado; pudiendo ser también un fragmento del anticuerpo, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo anti-idiotipo,

b) agentes citotóxicos, tales como toxinas, moléculas con átomos radiactivos, o agentes quimio-terapéuticos, entre los que se incluyen, sin limitación, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido, ribozimas, siRNAs, moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o la actividad de la Proteína GOLPH-2, y

c) compuestos antagonistas de la Proteína GOLPH-2, que inhiben una o más de las funciones de la Proteína GOLPH-2.

Por último, constituye también un objeto de la presente invención una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o varios agentes de los mencionados anteriormente junto con uno o más excipientes y/o sustancias transportadoras. Además dicha composición puede contener cualquier otro ingrediente activo que inhiba la función de la proteína GOLPH-2.

Los excipientes, sustancias transportadoras y sustancias auxiliares tienen que ser farmacéuticamente y farmacológicamente tolerables, de modo que puedan ser combinados con otros componentes de la formulación o preparación y no ejerzan efectos adversos en el organismo tratado. Las composiciones farmacéuticas o formulaciones incluyen aquellas que son adecuadas para la administración oral o parenteral (incluyendo subcutánea, intradérmica, intramuscular e intravenosa), aunque la mejor vía de administración depende del estado del paciente. Las formulaciones pueden ser en forma de dosis sencillas. Las formulaciones se preparan de acuerdo con métodos conocidos en el campo de la farmacología. Las cantidades de sustancias activas para administrarse pueden variar en función de las particularidades de la terapia.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Análisis diferencial de expresión del gen golph-2 en muestras de tejido de páncreas, utilizando los microarrays Human Genome U133 DNA arrays

1.1. Materiales y métodos

Microarrays. Se utilizaron los microarrays GeneChip Test 3 (Affymetrix, Santa Clara), que permiten testar la calidad del RNA, previamente al análisis de expresión con el array GeneChip Human Genome U133A (Affymetrix, Santa Clara), que representa 13.220 secuencias completas de genes anotados; el gen golph-2 está representado en el microarray por el set de sondas 217771_at de Affymetrix, que son oligonucleótidos sentido de 25 nucleótidos de longitud, diseñados en base a la secuencia Hs.182793 de Unigene, o AF236056 de GeneBank (Tabla 1).

TABLA 1

Descripción de las sondas correspondientes al set de sondas 217771_at

Orden consecutivo de las sondas	Zona de la secuencia de referencia interrogada	Secuencia de la sonda (5'-3')
1	2502	AAATAGGCTCTTACCACTTGCAAAT SEQ ID NO 3
2	2517	ACTTGCAAATAACTGGCCACATCAT SEQ ID NO 4
3	2549	TGACTTCCCAGTAAGGCTCTCTAAG SEQ ID NO 5
4	2595	GGATTTGAGATGCTAAGGCCCCAGA SEQ ID NO 6
5	2608	TAAGGCCCCAGAGATCGTTTGATCC SEQ ID NO 7
6	2626	TTGATCCAACCCTCTTATTTTCAGA SEQ ID NO 8
7	2659	TGGGGCCTAGAAGTTACAGAGCATC SEQ ID NO 9
8	2674	ACAGAGCATCTAGCTGGTGCCTGG SEQ ID NO 10
9	2745	CACAGTCACTGAAGCAGGCCCTGTT SEQ ID NO 11
10	2761	GGCCCTGTTTGCAATTCACGTTGCC SEQ ID NO 12

Muestras. Las muestras estudiadas procedían de biopsias clasificadas clínicamente, obtenidas por resección quirúrgica: Biopsias control de tejido pancreático no tumoral, procedentes de individuos que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas (“no tumoral”) (n = 1); biopsias de tejido pancreático no tumoral, pero inflamado, procedentes de individuos sin adenocarcinoma ductal de páncreas, pero con pancreatitis crónica (“pancreatitis crónica”) (n = 1);
 5 biopsias de tejido pancreático no tumoral, pero inflamado procedentes de individuos que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas, y pancreatitis (“pancreatitis”) (n = 1); biopsias de tejido pancreático tumoral, procedentes de pacientes que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas (n = 10) en uno de los siguientes estadios: Estadio I, tumor limitado al páncreas, estadio III, tumor extendido a ganglios linfáticos regionales y estadio IVB, existe metástasis en tejidos u órganos distantes. Todas las muestras fueron clasificadas clínicamente e histológicamente (grado y estadio) en el
 10 Hospital Central de Asturias, el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas siguiendo los preceptos de la declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su análisis.

De cada tipo de tumor se recibieron los siguientes casos:

- Tumor estadio I: 7 muestras

- Tumor estadio III: 1 muestra

- Tumor estadio IV: 2 muestras

Análisis GeneChip de expresión génica

El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de sujetos individuales. Las 13 muestras que fueron analizadas
 25 se describen en la Tabla 2.

TABLA 2

Descripción de las muestras analizadas

Código de la muestra	Tipo	Clasificación TNM	Estadio
PA36	No tumoral	-	-
PA29	Pancreatitis	-	-
PA46	Pancreatitis crónica	-	-
PA02	Tumor	T2N0M0	I
PA03	Tumor	T2N0M0	I
PA17	Tumor	T1bN0M0	I
PA19	Tumor	T1bN0M0	I
PA25	Tumor	T1N0M0	I
PA27	Tumor	T1N0M0	I
PA33	Tumor	T1bN0M0	I
PA24	Tumor	T3N1M0	III
PA16	Tumor	T2N1M1	IV
PA23	Tumor	T1bN1M1	IV

Síntesis del cRNA

El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRIzol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. *et al.*, Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). De cada preparación de RNA total se usaron 10 µg como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido
 60 oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. La segunda hebra de cDNA se sintetizó utilizando los enzimas DNA polimerasa I de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), DNA ligasa de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), Rnasa H de *E. coli* (Invitrogen Life Technologies), y DNA polimerasa del fago T4 (Invitrogen Life Technologies). El cRNA marcado con biotina se sintetizó usando el kit ENZO BioArray™ HighYield™ Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics Inc). Después de la transcripción *in vitro*, se eliminaron los nucleótidos no
 65 incorporados usando las columnas Rneasy (QIAGEN).

ES 2 300 156 A1

Hibridación y escaneado del array

Se fragmentaron 15 µg de cada cRNA biotinilado a 94°C durante 35 minutos en una solución tampón que contenía 40 mM Tris-Acetato (pH 8.1), 100 mM KOAc y 30 mM MgOAc. El cRNA fragmentado se mezcló con buffer de hibridación (100 mM MES, 1M NaCl, 20 mM EDTA, 0.01% Tween 20) y se calentó a 99° durante 5 minutos y posteriormente a 45° durante 5 minutos, para a continuación ser cargado en el array de Affymetrix. El primer array en el que se realizó la hibridación fue el Test 3 de Affymetrix. Este array permite testar la calidad del RNA previo al análisis de expresión en el Affymetrix® GeneChip® *Human Genome* 133 A (HG-U133A).

Para la hibridación, los arrays se incubaron en un horno rotatorio a 45° durante 16 horas y con una rotación constante de 60 rpm.

El lavado y tinción de cada array se [levó a cabo en la Estación de Fluidos de Affymetrix®. Se usó un programa de lavado y tinción que incluía:

- 10x2 ciclos de lavado con SSPE-T 6x (0.9 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄, 6 mM EDTA, 0.01% Tween 20) a 25°,
- 4x15 ciclos con 0.1 mM MES, 0.1M NaCl, 0.01% Tween 20 a 50°,
- Tinción del cRNA biotinilado con un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (10 µg/ml Molecular Probes)
- 10x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 25°
- Tinción con un anticuerpo anti-estreptavidina durante 10 minutos
- Tinción un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (1 mg/ml, Molecular Probes) durante 10 minutos
- 15x4 ciclos de lavado con SSPE-T a 30°

Los arrays se escanearon a 560 nm usando un microscopio confocal que utiliza emisión láser (Agilent GeneArray Scanner). El análisis de las lecturas de intensidad se realizó con el software Microarray Suite 5.0. Para la comparación de arrays, éstos fueron escalados a una intensidad total de 100.

1.2. Resultados

El análisis diferencial de la expresión del gen *golph-2* en los estadios tumorales con respecto a los controles no tumorales, se realizó a partir de los datos de comparación de arrays obtenidos utilizando el software de Affymetrix. Los parámetros que se tuvieron en cuenta (en el orden en el que aparecen en la lista) fueron: i) *Detección*. Indica si el transcrito está Presente (P), Ausente (A) o Marginal (M), ii) *Cambio*: Indica si la expresión de un determinado transcrito Aumenta (I), Decrece (D), No Cambia (NC), Aumenta Marginalmente (MI), o Decrece Marginalmente (MD), iii) *Signal Log Ratio* (SLR): Indica el nivel de cambio de expresión entre la línea base (control) y una muestra problema. Este cambio se expresa como el log₂ del ratio (*fold change* o número de veces que la expresión del gen está elevada o reprimida en la muestra problema-tumoral frente a la muestra control-sana). Se considera significativo un valor de SLR de 1 (equivalente a un *fold change* de 2), para transcritos cuya expresión aumenta frente al control y de -1, para transcritos cuya expresión disminuye frente al control.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 300 156 A1

TABLA 3

Resultados obtenidos para el gen golph-2. N. Acc. AF236056. Resultado de las comparaciones frente al control no tumoral (PA36)

Muestra	Detección	SLR	Cambio
Controles no tumorales			
PA36	A	-	-
PA29	A	-0,7	NC
PA46	A	-4,6	D
Tumores estadio I			
PA02	P	0,7	I
PA03	P	1,4	I
PA17	P	1	I
PA19	P	1,7	I
PA25	P	1,4	I
PA27	P	1,6	I
PA33	P	1,3	I
Tumores estadio III			
PA24	P	3,5	I
Tumores estadio IV			
PA23	P	3,4	I
PA16	P	1,2	I

TABLA 4

Resultados obtenidos para el gen golph-2. N. Acc. BC003179. Resultado de las comparaciones frente al control con pancreatitis (PA46)

Muestra	Detección	SLR	Cambio
Controles no tumorales			
PA46	A	-	-
PA29	A	3,4	I
PA36	A	4,6	I
Tumores estadio I			
PA02	P	4,9	I
PA03	P	5,9	I
PA17	P	6,1	I
PA19	P	6,8	I
PA25	P	6,1	I
PA27	P	6	I
PA33	P	5,9	I
Tumores estadio III			
PA24	P	7,8	I
Tumores estadio IV			
PA23	P	7,8	I
PA16	P	6	I

El análisis diferencial de la expresión del gen golph-2 en los estadios tumorales con respecto al control no tumoral (PA36), demostró que los niveles de expresión del gen golph-2 estaban incrementados en todas las biopsias de tumores de páncreas analizados, dándose los incrementos mayores en las biopsias de adenocarcinomas ductales de estadio III y IV, con incrementos incluso superiores a las 8 veces (SLR>3), lo que indica un cierto grado de correlación entre el estadio de la enfermedad y el nivel de expresión del gen (Tabla 3). Por otro lado, el análisis de expresión diferencial del gen golph-2 frente al control con pancreatitis crónica (PA46), demostró que los niveles de expresión del gen golph-2 estaban elevados más de 16 veces (SLR>4) en todas las biopsias de tumores de páncreas analizados, dándose los incrementos mayores en las biopsias de adenocarcinomas ductales de estadio III y IV, con incrementos superiores a las 64 veces (SLR>6) en todas las muestras, lo que indica un cierto grado de correlación entre el estadio de la enfermedad y el nivel de expresión del gen (Tabla 4).

1.3. Discusión

Estos resultados demostraron que la expresión del gen golph-2 estaba incrementada en todas las biopsias de tumores de páncreas analizados, tanto frente a biopsias de tejido no tumoral, como frente a biopsias de pancreatitis; los incrementos mayores se producían en las biopsias de adenocarcinomas ductales de estadio III y IV, lo que indica un cierto grado de correlación entre el estadio de la enfermedad y el nivel de expresión del gen.

Ejemplo 2

Análisis diferencial de expresión del gen golph-2 en muestras de tejido de páncreas, utilizando la técnica de RT-PCR cuantitativa en Tiempo Real

2.1. Materiales y métodos

El método empleado consiste en la transcripción inversa del mRNA a cDNA y su posterior amplificación en un equipo *LightCycler (Roche)*, utilizando SYBR Green para la detección del producto amplificado. La cuantificación se realiza en tiempo real y permite calcular la expresión relativa de la secuencia en diferentes muestras en la fase de amplificación lineal de la reacción.

Muestras. Las muestras estudiadas procedían de biopsias tipadas clínicamente, obtenidas por resección quirúrgica: Biopsias de tejido pancreático no tumoral, procedentes de individuos que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas ("no tumoral") (n = 1); biopsias de tejido pancreático no tumoral, pero inflamado, procedentes de individuos control sin adenocarcinoma ductal de páncreas, pero con pancreatitis crónica ("pancreatitis crónica") (n = 1); biopsias de tejido pancreático tumoral, procedentes de individuos que presentaban adenocarcinoma ductal de páncreas (n = 5) en uno de los siguientes estadios: Estadio I, tumor limitado al páncreas y estadio IVB, existe metástasis en tejidos u órganos distantes. Todas las muestras fueron clasificadas clínica e histológicamente (grado y estadio) en el Hospital Central de Asturias, el mismo hospital donde las muestras habían sido recogidas siguiendo los preceptos de la declaración de Helsinki. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente tras su extracción y se mantuvieron a -80°C hasta el momento de su análisis.

RT-PCR Cuantitativa en Tiempo Real. El análisis se llevó a cabo con RNA total procedente de sujetos individuales. Las 7 muestras que fueron analizadas se describen en la Tabla 5.

TABLA 5

Descripción de las muestras analizadas

Código de la muestra	Tipo	Clasificación TNM	Estadio
PA36	No tumoral	-	-
PA46	Pancreatitis crónica	-	-
PA19	Tumor	T1bN0M0	I
PA03	Tumor	T2N0M0	I
PA33	Tumor	T1bN0M0	I
PA14	Tumor	T3N1M1	IV
PA23	Tumor	T1bN1M1	IV

Síntesis del cDNA

El RNA total de cada una de las biopsias se obtuvo homogenizando el tejido en TRizol® Reagent (Life Technologies), siguiendo las recomendaciones del proveedor. El RNA total resultante se limpió con el kit Rneasy (QIAGEN) (Chomczynski P. *et al.*, Anal. Biochem., 1987, 162: 156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15: 532). El RNA se cuantificó espectrofotométricamente y se digirieron 5 µg de RNA total con DNaseI. Se utilizó 1 µg de RNA tratado con DNaseI como material de partida para la síntesis de la primera hebra de cDNA con la enzima transcriptasa inversa SuperScript™ II RNase (Life Technologies), usando como cebador un oligonucleótido oligo-dT que contenía la secuencia del promotor de la RNA polimerasa del fago T7. Se prepararon alícuotas del cDNA diluido a la concentración de trabajo.

Amplificación

El cDNA sintetizado se amplificó utilizando cebadores específicos del gen humano golph-2 (5'-TTCCCAG TAAGGCTCTCTAAG-3' -SEQ ID NO 1- y 5'-CCAGCTAGATGCTCT GTAAC-3' -SEQ ID NO 2-), y cebadores específicos del gen que codifica la proteína ribosomal LI 0 humana (5'-TGCGATGGCTGCACACA-3' -SEQ ID NO 13- y 5'-TCCCTTAG AGCAACCCATACAAC-3' -SEQ ID NO 14-). Las reacciones de PCR en tiempo real se prepararon utilizando el kit *LightCycler-FastStart DNA master SYBR Green 1 kit (Roche)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. El programa de amplificación consistía en 1 ciclo de 95°C durante 10 min ("hot start") seguido de 45 ciclos de 95°C (desnaturalización) durante 10 seg, 60°C (anillamiento) durante 5 seg, 72°C (amplificación y adquisición de fluorescencia) durante 10 seg. El programa de análisis de curvas de desnaturalización consistía en un ciclo de un pulso de 95°C, 65°C durante 15 seg, y un pulso de 95°C durante el paso de amplificación y adquisición.

Cuantificación

En primer lugar se determinó la especificidad de los productos de PCR analizando las curvas de desnaturalización. Posteriormente, como medida relativa de la expresión génica, se calculó la relación entre la abundancia de mRNAs transcritos de golph-2 y la abundancia de transcritos de ribl10 y se comparó el dato de la relación en cada una de las muestras tumorales con los valores de la muestra control. Para calcular la eficiencia de las reacciones de PCR (golph-2 y ribl10) se construyó, para cada secuencia génica, una curva patrón realizada con diluciones seriadas de cDNA. A las concentraciones de cDNA molde para las reacciones en la curva patrón se les dieron valores arbitrarios 10, 5, 2.5, 1.25 y 0.625. La eficiencia se calculó utilizando la ecuación:

$$E = 10^{-1/p}$$

donde E es la eficiencia de amplificación y p es la pendiente de la recta patrón.

La relación de los valores de expresión génica se determinó utilizando la siguiente ecuación, que relaciona los datos experimentales de la amplificación y corrige el error originado por la diferencia de eficiencia de las reacciones de PCR:

$$\text{Ratio} = \frac{E_{\text{diana}}^{-(C_p \text{ diana control} - C_p \text{ diana muestra})}}{E_{\text{referencia}}^{-(C_p \text{ referencia control} - C_p \text{ referencia muestra})}}$$

donde E es la eficiencia de amplificación, C_p es el punto de corte (*Crossing point*), *diana* es golph-2, *referencia* es ribl10, *control* es la muestra control (sano o pancreatitis) y *muestra* es la muestra tumoral.

2.2. Resultados

Análisis de las curvas de desnaturalización

El análisis de los productos de PCR demostró la amplificación específica de dos productos con temperaturas de desnaturalización similares a las esperadas según el software empleado para el diseño de los cebadores, *Primer Express* (Applied Biosystems) (Figura 1).

Cálculo de la eficiencia de las reacciones de PCR

De cada una de las 5 diluciones de cDNA se amplificaron dos réplicas y los puntos de corte (C_p) de cada una de ellas se representaron en una gráfica respecto al logaritmo de la concentración de cDNA para construir la recta patrón (Tablas 6 y 7, Figuras 2 y 3).

ES 2 300 156 A1

TABLA 6

Puntos de corte (Cp) de la amplificación de las 5 diluciones de cDNA para cada réplica amplificadas con los cebadores del gen golph-2

[RNA] (ng)	Log [RNA]	Cp
10	1	22,5
10	1	22,59
5	0,698970004	23,6
5	0,698970004	23,82
2,5	0,397940009	25
2,5	0,397940009	25,25
1,25	0,096910013	25,93
1,25	0,096910013	25,98
0,625	-0,204119983	27,03
0,625	-0,204119983	27,01

TABLA 7

Puntos de corte (Cp) de la amplificación de las 5 diluciones de cDNA para cada réplica amplificadas con los cebadores del gen ribl10

[RNA] (ng)	Log [RNA]	Cp
10	1	20,87
10	1	20,98
5	0,698970004	22,65
5	0,698970004	22,98
2,5	0,397940009	24,33
2,5	0,397940009	24,74
1,25	0,096910013	25,29
1,25	0,096910013	25,44
0,625	-0,204119983	27,02
0,625	-0,204119983	27,38

Cuantificación del cambio de expresión del gen golph-2

Dos réplicas de cada muestra (sana y tumoral) se amplificaron con los cebadores específicos de GOLPH-2 y ribl10. A partir de los puntos de corte generados en estas amplificaciones (Tabla 8), se calcularon los cambios de expresión del gen golph-2 en las muestras tumorales respecto al control no tumoral y al control de pancreatitis aplicando la ecuación anteriormente descrita (Tabla 9).

TABLA 8

Puntos de corte experimentales de ribl10 y golph-2 en las 5 muestras tumorales y los controles
ribl10

Réplicas	PA36	PA46	PA03	PA14	PA19	PA23	PA33
1	28,38	28,53	29,00	26,58	28,86	27,78	28,32
2	27,88	28,21	28,92	26,17	28,89	28,94	29,09
Media	28,13	28,37	28,96	26,38	28,88	28,36	28,71
SD	0,35	0,23	0,06	0,29	0,02	0,82	0,54

golp-2

Réplicas	PA36	PA46	PA03	PA14	PA19	PA23	PA33
1	30,42	30,28	29,19	24,96	26,42	26,76	26,79
2	30,95	30,25	28,87	25,52	26,21	26,89	26,18
Media	30,69	30,27	29,03	25,24	26,32	26,83	26,49
SD	0,37	0,02	0,23	0,40	0,15	0,09	0,43

TABLA 9

Valores de sobreexpresión (Fold Change) de golp-2 en las 5 muestras tumorales respecto al control no tumoral (PA36) y respecto al control de pancreatitis crónica (PA46)

Muestras	PA03	PA14	PA19	PA23	PA33
Aumento de expresión respecto al control no tumoral (PA36)	4,1	13,3	21,1	12,2	17,6
Aumento de expresión respecto al control de Pancreatitis crónica (PA46)	2,8	9,2	14,6	8,4	12,1

Los resultados demostraron que la expresión del gen golp2 estaba incrementada en todas las muestras tumorales respecto a las muestras no tumorales, con un incremento medio de 13,5 veces, y respecto a las muestras con pancreatitis, con un incremento medio de 9,5 veces.

2.3. Discusión

Los resultados confirmaron los datos obtenidos midiendo la diferencia de expresión génica con DNA-chips (ejemplo 1), esto es, la expresión del gen golp-2 estaba fuertemente incrementada en las muestras tumorales respecto a las muestras no tumorales y respecto a las muestras con pancreatitis; confirmando por tanto que el incremento de la expresión génica de golp2 está asociado al adenocarcinoma ductal de páncreas.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para detectar la presencia del cáncer de páncreas en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer, que comprende:

a) la detección y/o cuantificación de la proteína GOLPH-2, del mRNA del gen golph- 2 o del correspondiente cDNA en una muestra de dicho individuo, y

b) la comparación de la cantidad de proteína GOLPH-2, de la cantidad de mRNA del gen golph-2 o de la cantidad del correspondiente cDNA detectada en una muestra de un individuo, con la cantidad de proteína GOLPH-2, con la cantidad del mRNA del gen golph-2 o con la cantidad del correspondiente cDNA detectada en las muestras de individuos control o en muestras anteriores, no tumorales, del mismo individuo o con los valores normales de referencia.

2. Método según la reivindicación 1 en el que el cáncer de páncreas es un adenocarcinoma ductal de páncreas

3. Método según las reivindicaciones anteriores en el que dicha muestra es de tejido de páncreas.

4. Método según la reivindicación 3 en el que dicha muestra de tejido de páncreas a analizar se obtiene por cualquier método convencional, preferiblemente resección quirúrgica.

5. Método según la reivindicación 1 en el que dicha muestra es una muestra de orina, sangre, plasma, suero, aspirado de jugo gástrico, bilis o semen.

6. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que no se le ha diagnosticado previamente un cáncer.

7. Método según la reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo al que se le ha diagnosticado previamente un cáncer, preferentemente en el páncreas.

8. Método según las reivindicación 1, en el que dicha muestra a analizar se obtiene de un individuo en tratamiento, o que ha sido tratado previamente contra un cáncer, preferentemente en el páncreas.

9. Método según la reivindicación 1 **caracterizado** porque comprende la realización de una extracción de la muestra, bien para obtener un extracto de proteínas o bien para obtener un extracto que consiste en el RNA total.

10. Método según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la detección de la proteína GOLPH-2 comprende una primera etapa de puesta en contacto del extracto de proteínas de la muestra con una composición de uno o más anticuerpos específicos contra uno o más epítomos de la proteína GOLPH-2, y una segunda etapa de cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína GOLPH-2.

11. Método según la reivindicación 10 **caracterizado** porque dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, policlonales, intactos o fragmentos recombinantes de ellos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos, específicos contra la proteína GOLPH-2; siendo estos anticuerpos humanos, humanizados o de origen no humano.

12. Método según las reivindicaciones 10 u 11 **caracterizado** porque para la cuantificación de los complejos formados por los anticuerpos y la proteína GOLPH-2 se utilizan técnicas seleccionadas del grupo formado por Western-blot, ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay o ensayo de inmunosorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoassay o Radioinmunoensayo), EIA Competitivo (Competitive Enzyme Immunoassay o Inmunoensayo Enzimático Competitivo), DAS-ELISA (Double antibody Sandwich-ELISA o ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos, ensayos basados en precipitación con oro coloidal en formatos tales como *dipsticks*; o mediante técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando o ensayos de unión a lectina.

13. Método según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la detección del mRNA o del correspondiente cDNA del gen golph-2 comprende una primera etapa de amplificación del mRNA, incluido en el extracto de RNA total, o del correspondiente cDNA sintetizado por transcripción inversa del mRNA, y una segunda etapa de cuantificación del producto de la amplificación del mRNA o del cDNA del gen golph-2.

14. Método según la reivindicación 13 **caracterizado** porque la amplificación se realiza de manera cualitativa o cuantitativa, mediante RT-PCR usando oligonucleótidos cebadores, siendo las secuencias de los cebadores utilizados para amplificar la secuencia del gen golph-2 5'-TTCCCAGTAAGGCTCTCTAAG-3' (SEQ ID NO 1) y 5'-CCAGC-TAGATGCTCTGTAAC-3' (SEQ ID NO 2).

ES 2 300 156 A1

15. Método según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la detección se realiza con sondas específicas del mRNA o del correspondiente cDNA del gen golph-2, mediante técnicas como por ejemplo Northern-blot o transferencia Northern.

5 16. Método según la reivindicación 9 **caracterizado** porque la detección del mRNA se efectúa mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Q-PCR).

10 17. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen golph-2 para detectar *in vitro* la presencia de un cáncer de en el páncreas de un individuo, en especial de un adenocarcinoma ductal de páncreas, para determinar *in vitro* el estadio o la severidad de dicho cáncer en el individuo, o para monitorizar *in vitro* el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente dicho cáncer.

15 18. Método *in vitro* para identificar y evaluar la eficacia de compuestos para terapia del cáncer de páncreas, preferiblemente de un adenocarcinoma ductal de páncreas, que comprende:

a) poner en contacto un cultivo de células tumorales, con el compuesto candidato, en las condiciones y durante el tiempo apropiados para permitir que interaccionen,

20 b) detectar y cuantificar los niveles de expresión del gen golph-2 o la proteína GOLPH-2, y

c) comparar dichos niveles de expresión con los de cultivos control de células tumorales sin tratar con el compuesto candidato.

25 19. Uso de secuencias nucleotídicas o peptídicas derivadas del gen golph-2, en métodos de búsqueda, identificación, desarrollo y evaluación de la eficacia de compuestos para terapia del cáncer de páncreas, preferiblemente del adenocarcinoma ductal de páncreas.

FIGURA 1

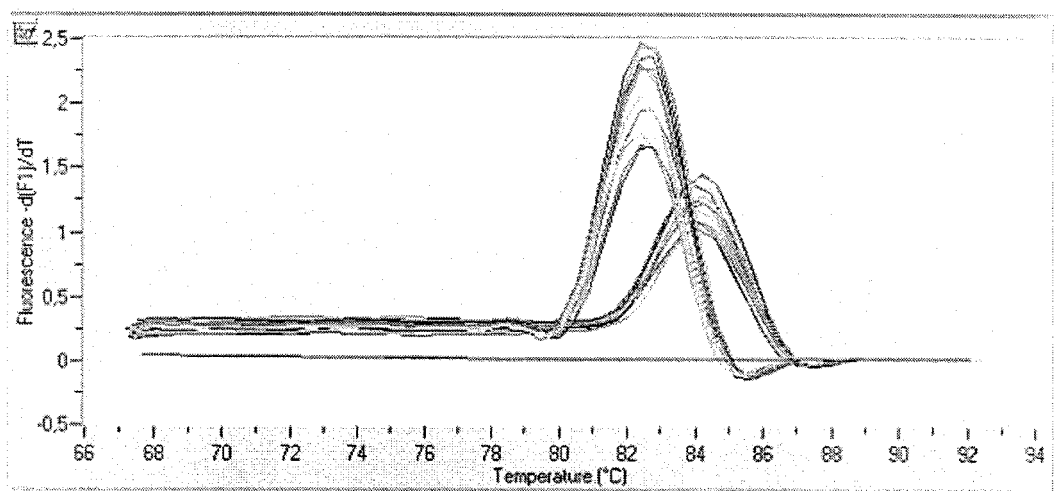


FIGURA 2

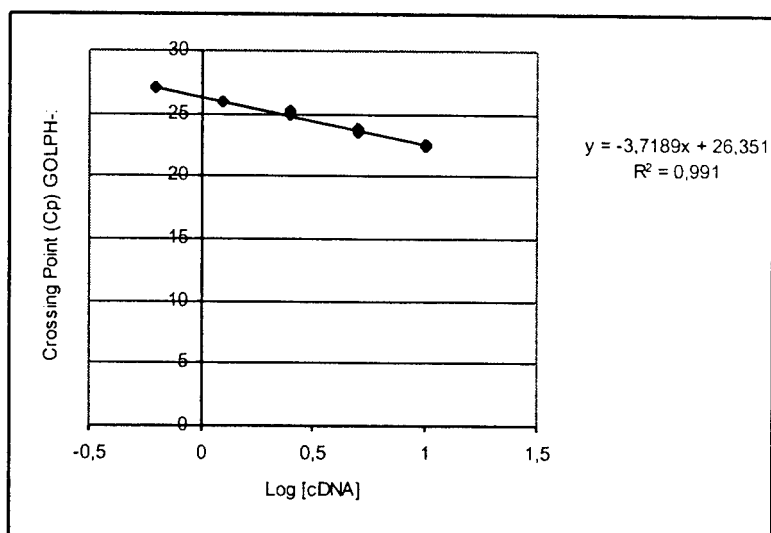
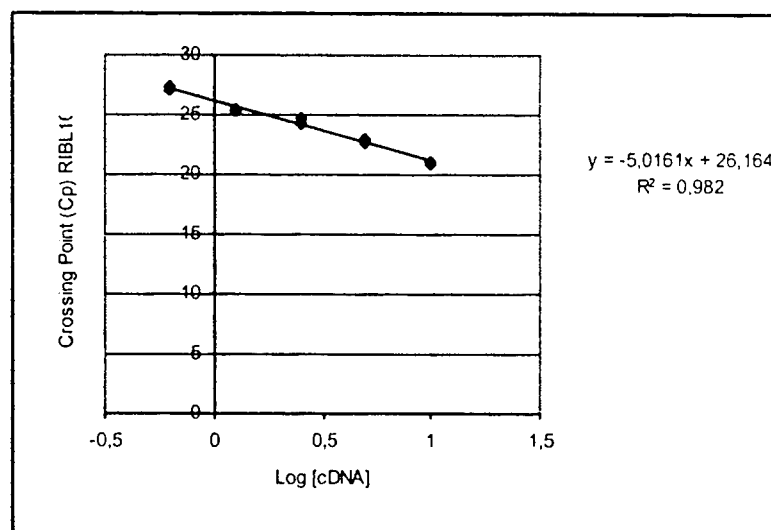


FIGURA 3



ES 2 300 156 A1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Medplant Genetics, S.L.	
5	<120> Métodos para el diagnóstico <i>in vitro</i> y pronóstico <i>in vitro</i> del cáncer de páncreas y para el desarrollo de fármacos contra el cáncer de páncreas	
	<130> 200302357	
10	<140> ES 200302357	
	<141> 2003-10-10	
15	<160> 14	
	<170> PatentIn version 3.1	
20	<210> 1	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Cebador para la amplificación PCR del gen GOLPH-2	
30	<400> 1	
	ttccagtaa ggctctctaa g	21
35	<210> 2	
	<211> 21	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
45	<223> Cebador para la amplificación PCR del gen GOLPH-2	
	<400> 2	
50	ccagctagat gctctgtaac t	21
	<210> 3	
	<211> 25	
55	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
60	<221> misc_feature	
	<223> Sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
65	<400> 3	
	aaataggctc ttaccacttg caaat	25

ES 2 300 156 A1

	<210> 4	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<223> Sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 4	
15	acttgcaaat aactggccac atcat	25
	<210> 5	
	<211> 25	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 5	
30	tgacttccca gtaaggctct ctaag	25
	<210> 6	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> Sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
45	<400> 6	
	ggatttgaga tgctaaggcc ccaga	25
50	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<223> sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 7	
65	taaggcccca gagatcgttt gatcc	25

ES 2 300 156 A1

	<210> 8	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<223> Sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 8	
15	ttgatccaac cctcttattt tcaga	25
	<210> 9	
	<211> 25	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 9	
30	tggggcctag aagttacaga gcatc	25
	<210> 10	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
45	<400> 10	
	acagagcatc tagctggtgc gctgg	25
50	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
60	<223> Sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 11	
65	cacagtcact gaagcaggcc ctgtt	25

ES 2 300 156 A1

	<210> 12	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Artificial	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<223> Sonda correspondiente al set de sondas 217771_at	
	<400> 12	
15	ggccctgttt gcaattcacg ttgcc	25
	<210> 13	
	<211> 17	
20	<212> DNA	
	<213> Artificial	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<223> Cebador para la amplificación por PCR del gen de la proteína ribosomal X10	
	<400> 13	
30	tgcgatggct gcacaca	17
	<210> 14	
35	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> cebador para la amplificación por PCR del gen de la proteína ribosomal X10	
45	<400> 14	
	tccttagag caaccatac aac	23
50		
55		
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 300 156

⑫ Nº de solicitud: 200302357

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 10.10.2003

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20030124128 A1. (LILLIE, J et al.) 03.07.2003, página 1, párrafos 7-8; página 2, párrafos 9-11,16-20; página 3, párrafos 29-32,42-60; página 4, párrafos 62-67; página 6, párrafos 98-104; página 7, párrafos 105-116; página 10, párrafo 143.	1-19
Y	GRÜTZMANN, R. et al. "Systematic Isolation of Genes Differentially Expressed in Normal and Cancerous Tissue of the Pancreas". Pancreatology . 2003, vol. 3, pp.: 169-178, página 169, resumen; página 171, tabla-1; página 173, tabla-2; página 176, tabla-2 (cont.).	1-19
A	WO 9950408 A1 (UNIVERSITY OF NEBRASKA BOARD OF REGENTS [US/US]) 07.10.1999, página 3, líneas 27-33; página 4 líneas 1-29; página 6, líneas 6-21.	1-19

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

05.05.2008

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)