



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 361 808**

② Número de solicitud: 200930203

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **25.05.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **22.06.2011**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
22.06.2011

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 20 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas
(Titular al 80 %)

⑦ Inventor/es: **Barderas Manchado, Rodrigo;**
Babel Henzielt, Ingrid y
Casal Álvarez, José Ignacio

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico o el pronóstico del cáncer colorrectal.**

⑤ Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico o el pronóstico del cáncer colorrectal.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o la monitorización de la evolución de un cáncer colorrectal (CCR), a un método de diagnóstico de un CCR, a un método de pronóstico de un CCR y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

ES 2 361 808 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico o el pronóstico del cáncer colorrectal.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o la monitorización de la evolución de un cáncer colorrectal (CCR), a un método de diagnóstico de un CCR, a un método de pronóstico de un CCR y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

10 **Estado de la técnica anterior**

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo cáncer más prevalente en el mundo occidental. El desarrollo de la enfermedad se produce durante décadas e involucra múltiples eventos genéticos. A pesar de que el CCR es uno de los tumores sólidos mejor caracterizados desde un punto de vista genético sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en países desarrollados por el diagnóstico tardío de los pacientes debido al tiempo de espera que transcurre para realizar ciertas pruebas diagnósticas, como la colonoscopia.

Hoy en día, existen pocas proteínas que hayan sido descritas como biomarcadores eficaces de CCR (antígeno carcinoembrionario (CEA), CA19.9 y CA125) (Crawford *et al.* 2003. *Journal of surgical oncology* 84 (4), 239-248; Duffy *et al.* 2007 *Eur J Cancer* 43 (9), 1348-1360) y no son lo suficiente específicas para *screenings* clínicos con vistas a detectar CCR (Locker *et al.* 2006. *J Clin Oncol* 24 (33), 5313-5327).

Los análisis proteómicos están siendo activamente utilizados para la identificación de nuevos biomarcadores. En diferentes estudios proteómicos previos se han identificado mediante el uso de *microarrays* de anticuerpos y 2D-DIGE proteínas diferencialmente expresadas en tejido de CCR, incluyendo isoformas y modificaciones posttranscripcionales responsables de modificaciones en rutas de señalización (Alfonso *et al.* 2005. *Proteomics* 5 (10), 2602-2611; Kopf *et al.* 2005. *Proteomics* 5(9), 2412-2416; Madoz-Gurpide *et al.* 2007. *Mol Cell Proteomics* 6 (12), 2150-2164; Alfonso *et al.* 2008. *Journal of proteome research* 7 (10), 4247-4255). Estas dos aproximaciones permitieron la identificación de una amplia colección de potenciales marcadores tumorales de tejido de CCR que actualmente están siendo investigados.

Sin embargo, la implementación de métodos diagnósticos no invasivos y más simples que permitan la detección temprana del CCR debería basarse en la identificación de proteínas o anticuerpos detectables en el suero o el plasma (Hanash *et al.* 2008. *Nature* 452 (7187), 571-579; Hudson *et al.* 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 104 (44), 17494-17499). La existencia de una respuesta inmune a cáncer en humanos se ha demostrado por la presencia de autoanticuerpos en el suero de pacientes con cáncer. Así, diferentes proteínas humanas (autoantígenos) se pueden ver afectadas antes o durante la formación del tumor pudiendo producir una respuesta inmune una vez liberadas (Hudson *et al.* 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 104 (44), 17494-17499; Wang *et al.* 2005. *The New England journal of medicine* 353 (12), 1224-1235; Sreekumar *et al.* 2004. *J Natl Cancer Inst* 96 (11), 834-843). Dichos autoanticuerpos se pueden detectar en estadios tempranos de la enfermedad e incluso antes de que el cáncer pueda ser detectado mediante otras técnicas indicando su elevado potencial como biomarcadores de la enfermedad (). Estas proteínas tumorales pueden verse afectadas por mutaciones puntuales, tener un plegamiento anómalo, sobreexpresión, glicosilación aberrante, estar truncadas o bien, sufrir una degradación aberrante como es el caso de p53, HER2, NY-ESO1 o MUC1, respectivamente (Chen *et al.* 1997. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 94 (5), 1914-1918; Schubert *et al.* 2000. *Nature* 404 (6779), 770-774; Ulanet *et al.* 2003. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América* 100 (21), 12361-12366). De hecho, autoantígenos asociados a tumores (AATs) han sido previamente caracterizados en cáncer CCR utilizando otras aproximaciones (Scanlan *et al.* 1998. *International Journal of cancer* 76 (5), 652-658). No obstante, la validez diagnóstica de los autoanticuerpos asociados con CCR identificados hasta la fecha requiere aún de una validación independiente para su uso generalizado en el diagnóstico/pronóstico del CCR.

Existe, por tanto, la necesidad de disponer de biomarcadores que permitan el diagnóstico del CCR, su clasificación en los diferentes estadios de la progresión tumoral, el pronóstico de la evolución de la enfermedad, la evaluación de su respuesta a un determinado tratamiento y la detección de la recurrencia o la diseminación del CCR, mediante un método sencillo, eficaz y no invasivo.

Explicación de la invención

60 La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o la monitorización de la evolución de cáncer colorrectal (CCR), a un método de diagnóstico de CCR, a un método de pronóstico de CCR y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

65 La presente invención proporciona, por tanto, una respuesta a la necesidad de disponer de biomarcadores que permitan el diagnóstico del CCR, su clasificación en los diferentes estadios de la progresión tumoral, el pronóstico de la evolución de la enfermedad, la evaluación de su respuesta a un determinado tratamiento y la detección de la recurrencia o la diseminación del CCR, mediante un método sencillo, eficaz y no invasivo.

La sangre es normalmente el fluido biológico óptimo basado en métodos no invasivos para el *screening* masivo con fines diagnósticos de grandes poblaciones de pacientes. Por un lado, el suero y el plasma son fáciles de obtener y por otra parte, la circulación sanguínea facilita el contacto de la sangre con todos los tejidos del cuerpo humano, incluyendo en el caso de pacientes con cáncer el contacto con tejido tumoral y sus antígenos representativos. La liberación de estos antígenos asociados a tumor probablemente ocurre a muy baja concentración en plasma y probablemente sufren proteólisis en un corto periodo de tiempo. Por el contrario, los anticuerpos son moléculas muy estables y que han sido usadas durante años en diferentes inmunoensayos en clínica, lo cual facilita la estandarización de los ensayos. El uso de los autoanticuerpos es también beneficioso en el sentido que el sistema inmune amplifica la respuesta facilitando su identificación y cuantificación.

En la presente invención se ha examinado el suero de pacientes con CCR y sueros control con el fin de identificar una firma de autoanticuerpos producidos por los pacientes en respuesta a CCR y sus respectivas proteínas reactivas. Sueros de pacientes de CCR y sueros de pacientes control se testaron utilizando *microarrays* de proteínas de alta densidad. Los *microarrays* de proteínas ofrecen una serie de ventajas con respecto a otras aproximaciones empleadas para la identificación de ATTs: i) las proteínas impresas en el *array* son conocidas *a priori* evitando una posterior identificación y eliminando la posible selección de mimótopos y ii) no hay predisposición a seleccionar ninguna proteína ya que todas ellas se imprimen a una concentración similar. Esta combinación de factores resulta en una elevada sensibilidad para la identificación de biomarcadores.

La firma de autoanticuerpos identificada permitió diferenciar entre sueros de pacientes control y con cáncer. En total, 43 proteínas se reconocían diferencialmente por los sueros de pacientes con CCR y los sueros de referencia (p valor <0,04) en el *array* de proteínas. La combinación de los 6 mejores antígenos inmunoreactivos: Pim1, MAPKAPK3, STK4, SRC, FGFR4 y ACVR2B fue capaz de detectar el CCR con un 100% de especificidad y sensibilidad usando los datos obtenidos del *array* de proteínas. Los niveles de expresión aumentados o disminuidos de dichas proteínas se confirmaron mediante inmunodetección en membrana e inmunohistoquímica utilizando tanto líneas celulares y tejido tumoral de CCR como *microarrays* de tejido.

Finalmente, el *predictor* formado por las proteínas purificadas Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B se testó mediante ELISA utilizando sueros de pacientes y sueros control. El ELISA es una técnica sensible, sencilla, rápida y económica, por lo que es una de las más empleadas en diagnóstico. El ELISA permitió discernir entre sueros de pacientes con CCR y sueros control con una especificidad y sensibilidad del 73,9 y 83,3% (AUC=0,86).

Estos estudios permitieron determinar la presencia de una firma de autoanticuerpos específica de CCR revelando la presencia de nuevos biomarcadores específicos de la enfermedad con el potencial para diagnosticar CCR utilizando sueros de pacientes con mayor especificidad y sensibilidad que con los biomarcadores descritos hasta la fecha.

La técnica del ELISA es mucho más sensible que otras técnicas como la inmunodetección en membrana o la inmunohistoquímica. Esta elevada sensibilidad podría explicar el por qué la prevalencia de los autoanticuerpos en pacientes con cáncer es mucho mayor que en otros estudios previos, además, de la detección de reactividad en pacientes control. De hecho, el ensayo diagnóstico debería basarse en autoanticuerpos con elevada prevalencia dado que fue imposible encontrar autoantígenos con inmunoreactividad exclusiva en el suero de pacientes con CCR.

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, como marcador de CCR. Preferiblemente, dichos autoanticuerpos son inmunoglobulinas G (IgGs).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la evolución del CCR (de aquí en adelante, método primero de la invención), que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un sujeto,
- b) detectar la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, en la muestra obtenida en el paso (a);
y
- c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: Pim1, MAPKAPK3 o ACVR2B.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad de autoanticuerpos frente a MAPKAPK3 y/o ACVR2B. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad de autoanticuerpos frente a MAPKAPK3 y ACVR2B.

ES 2 361 808 A1

Preferiblemente, los pasos (b) y/o (c) del método primero de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

5 Además de los pasos (a)-(b) especificados anteriormente, el método primero de la invención puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los datos obtenidos mediante este método.

10 Los datos obtenidos mediante el método primero de la invención son útiles para diagnosticar la presencia del CCR, clasificarlo en estadios, pronosticar su evolución, evaluar su respuesta a un determinado tratamiento, detectar su recurrencia o predecir los sitios de su diseminación.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del CCR (de aquí en adelante, método segundo de la invención) que comprende los pasos (a)-(c) del método primero de la invención, y que además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 o STK4 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) o una cantidad de autoanticuerpos frente a la proteína o ACVR2B menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia del CCR.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de pronóstico del CCR (de aquí en adelante, método tercero de la invención) que comprende los pasos (a)-(c) del método primero de la invención, y que además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 o STK4 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) o una cantidad de autoanticuerpos frente a la proteína ACVR2B menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de una menor supervivencia libre de recaída a distancia o una menor supervivencia global.

El término “proteína Pim1” se refiere a la proteína cuyo número de acceso es NP_002639 y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 1.

30 El término “proteína SRC” se refiere a la proteína cuyo número de acceso es NP_005408 y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 2.

El término “proteína MAPKAPK3” se refiere a la proteína cuyo número de acceso es NP_004626 y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 3.

35 El término “proteína FGFR4” se refiere a la proteína cuyo número de acceso es NP_002002 y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 4.

40 El término “proteína STK4” se refiere a la proteína cuyo número de acceso es NP_006273 y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 5.

El término “proteína ACVR2B” se refiere a la proteína cuyo número de acceso es NP_001097 y su secuencia de aminoácidos es SEQ ID NO: 6).

45 El término “anticuerpo”, tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con una proteína. Hay cinco isotipos o clases principales de inmunoglobulinas: inmunoglobulina M (IgM), inmunoglobulina D (IgD), inmunoglobulina G (IgG), inmunoglobulina A (IgA) e inmunoglobulina E (IgE).

50 El término “autoanticuerpo”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se aplica a un anticuerpo que reacciona con un antígeno presente en el propio organismo de un sujeto, incluso si la reacción ocurre solo *in vitro*, y tanto si causa efectos patológicos *in vivo* como si no los produce.

55 El término “autoanticuerpo frente a la proteína Pim1” se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína Pim1, con una variante de la proteína Pim1 o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos frente a la proteína Pim1 se refiere a IgGs.

60 El término “autoanticuerpo frente a la proteína SRC” se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína SRC, con una variante de la proteína SRC o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos frente a la proteína SRC se refiere a IgGs.

65 El término “autoanticuerpo frente a la proteína MAPKAPK3” se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína MAPKAPK3, con una variante de la proteína MAPKAPK3 o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos frente a la proteína MAPKAPK3 se refiere a IgGs.

ES 2 361 808 A1

El término “autoanticuerpo frente a la proteína FGFR4” se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína FGFR4, con una variante de la proteína FGFR4 o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos frente a la proteína FGFR4 se refiere a IgGs.

El término “autoanticuerpo frente a la proteína STK4” se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína STK4, con una variante de la proteína STK4 o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos frente a la proteína STK4 se refiere a IgGs.

El término “autoanticuerpo frente a la proteína ACVR2B” se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína ACVR2B, con una variante de la proteína ACVR2B o con un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente. Preferiblemente, el término autoanticuerpos frente a la proteína ACVR2B se refiere a IgGs.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término “variante” se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término variante incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones posttranscripcionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína Pim1” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína SRC” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína MAPKAPK3” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína FGFR4” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína STK4” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es “sustancialmente homóloga a la proteína ACVR2B” cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferiblemente de, al menos un 90%, más preferiblemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferiblemente de, al menos, un 99%.

El término “identidad”, tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El tanto por ciento de identidad existente entre dos secuencias puede ser identificado fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término “fragmento”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B o una de sus variantes.

La expresión “funcionalmente equivalente”, tal como aquí se utiliza, significa que la proteína o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene esencialmente las propiedades inmunológicas descritas en este documento. Dichas propiedades inmunológicas se pueden determinar mediante métodos convencionales tales como los descritos en los Ejemplos que acompañan a esta descripción.

ES 2 361 808 A1

El término “diagnóstico”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero o segundo de la presente invención, se refiere a la capacidad de detectar la presencia del CCR, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, y en la comparación de la cantidad detectada con una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El término “pronóstico”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero o tercero de la presente invención, se refiere a la capacidad de asignar una probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso de la enfermedad del CCR, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, y en la comparación de la cantidad detectada con una cantidad de referencia. Esta asignación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos.

El término “pronóstico” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, por ejemplo, pero sin limitarse, a la probabilidad de la muerte debida al CRC o a la progresión del CRC, incluyendo recurrencia o capacidad de diseminación metastásica, así como a la predicción de respuesta a un determinado tratamiento del CCR.

El término “predicción”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, pero no se limita, a la probabilidad de que un paciente responda favorable o desfavorablemente a un determinado tratamiento, y a la extensión de dichas respuestas, o de que el paciente sobreviva, tras la eliminación quirúrgica de un tumor primario y/o la quimioterapia por un periodo de tiempo sin que se produzca recurrencia del CRC.

El término “supervivencia libre de recaída a distancia” (SLRD), tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta la recaída a distancia o hasta la última visita. El término “supervivencia global” (SG), tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere al tiempo transcurrido desde la fecha de la cirugía hasta la última visita o hasta el fallecimiento del sujeto.

Los métodos de la presente invención son útiles para predecir o evaluar la respuesta a un determinado tratamiento. El tratamiento del CCR principal habitualmente suele ser cirugía, por ejemplo, pero sin limitarse, escisión local o resección. Algunos pacientes antes de la cirugía reciben terapia “neoadyuvante” con el objetivo de reducir el tamaño del CCR, para posibilitar o facilitar la cirugía. Después de la cirugía, muchos pacientes reciben terapia adyuvante con el objetivo de prevenir la recaída del cáncer en el colon, en el recto o en otro lugar. En el tratamiento del CCR, la terapia adyuvante o neoadyuvante puede consistir, por ejemplo, pero sin limitarse, en radioterapia, quimioterapia o terapia biológica. Algunos ejemplos de compuestos empleados en quimioterapia o terapia biológica son, pero sin limitarse, ácido fólico, fluorouracilo, irinotecán, oxaliplatino, leucovorina, levamisol, cetuximab o bevacizumab.

El término “seguimiento de la evolución”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere, a la supervisión del desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo, pero sin limitarse, la evaluación de la respuesta a un determinado tratamiento o la detección de la recurrencia o de la diseminación del CCR.

La expresión “detección de la cantidad” en la muestra obtenida, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero, segundo o tercero de la presente invención, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B basada en una señal que se obtiene directamente de dichos autoanticuerpos y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de autoanticuerpo frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, respectivamente, presentes en la muestra. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de los autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto de los autoanticuerpos) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero, segundo o tercero de la presente invención, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de estos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero, segundo o tercero de la presente invención, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, respectivamente, de una muestra de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación del paso (c) de los métodos primero, segundo o tercero de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero, segundo o tercero de la presente invención, se refiere a la cantidad absoluta o relativa de los anticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B que permite discriminar la presencia del CCR. La cantidad de referencia adecuada puede ser determinada por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, la cantidad de referencia puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media de la cantidad de anticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B en una población de sujetos control determinado mediante el método de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B puede ser llevada a cabo por cualquier método. En una realización preferida, la detección de la cantidad de los autoanticuerpos se realiza mediante un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquier técnica analítica que basada en la reacción de conjugación de la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, de sus variante o de un fragmento de las mismas con un anticuerpo que reconoce a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, respectivamente.

Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica o *microarrays* de proteína.

En una realización preferida de los métodos primero, segundo o tercero de la invención, el inmunoensayo es un *microarray*. Un *microarray* de proteínas consiste en una colección de proteínas inmovilizadas sobre un soporte sólido en una disposición regular y prefijada. Existen varios factores importantes a tener en cuenta en el diseño de *microarrays* de proteínas, como son, por ejemplo, la naturaleza del soporte sobre el cual inmovilizar, la técnica de inmovilización de las proteínas, el formato del *microarray*, el agente de captura empleado o el método de detección a emplear. Son conocidos en el estado de la técnica diferentes formatos, soportes y técnicas que pueden ser empleados para la realización de este aspecto preferido de los métodos primero, segundo o tercero de la invención.

En una realización más preferida de los métodos primero, segundo o tercero de la invención, el *microarray* comprende los siguientes pasos: (a) recubrir un soporte sólido con, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, una variante o un fragmento de las mismas; (b) incubar el soporte recubierto del paso (a) con una muestra biológica aislada obtenida del sujeto en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo del autoanticuerpo frente a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B presente en la muestra con los antígenos de la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, de su variante o de su fragmento; y (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce al autoanticuerpo frente a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, conjugado o unido a un compuesto marcador.

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

ES 2 361 808 A1

En una realización más preferida de los métodos primero, segundo o tercero de la invención, el ELISA es un ELISA indirecto, que comprende los siguientes pasos: (a) recubrir un soporte sólido con, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, una variante o un fragmento de las mismas; (b) incubar el soporte recubierto del paso (a) con una muestra biológica aislada obtenida del sujeto en condiciones que permitan la formación de un inmunocomplejo del autoanticuerpo frente a la proteína *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* presente en la muestra con los antígenos de la proteína *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, de su variante o de su fragmento; y (c) incubar con un anticuerpo secundario, que reconoce al autoanticuerpo frente a la proteína *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, conjugado o unido a un compuesto marcador.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad del autoanticuerpo frente a la proteína *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ³³P o ³⁵S, fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para llevar a cabo cualquiera de los métodos de la presente invención. El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos.

Preferiblemente, la muestra biológica aislada en el paso (a) de los métodos primero, segundo o tercero de la invención es un fluido biológico. Más preferiblemente, el fluido biológico es sangre, plasma o suero sanguíneo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* como marcador de CCR.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la evolución del CCR (de aquí en adelante, método cuarto de la invención) que comprende:

- a) obtener de una muestra biológica aislada de un sujeto,
- b) detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, en la muestra obtenida en el paso (a);
y
- c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* y *ACVR2B*.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *Pim1*, *MAPKAPK3* o *ACVR2B*.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad del producto de la expresión de los genes *MAPKAPK3* y/o *ACVR2B*. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, se detecta la cantidad del producto de la expresión de los genes *MAPKAPK3* y *ACVR2B*.

Preferiblemente, los pasos (b) y/o (c) del método cuarto de la invención pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

Además de los pasos (a)-(b) especificados anteriormente, el método cuarto de la invención puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los datos obtenidos mediante este método.

Los datos obtenidos mediante el método cuarto de la invención son útiles para diagnosticar la presencia del CCR, clasificarlo en estadios, pronosticar su evolución, evaluar su respuesta a un determinado tratamiento, detectar su recurrencia o predecir los sitios de su diseminación.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del CCR (de aquí en adelante, método quinto de la invención) que comprende los pasos (a)-(c) del método cuarto de la invención, y que además comprende un paso (d) donde una cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4* o *STK4*

detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) o una cantidad del producto de la expresión del gen *ACVR2B* menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia del CCR.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de pronóstico del CCR (de aquí en adelante, método sexto de la invención) que comprende los pasos (a)-(c) del método cuarto de la invención, y que además comprende un paso (d) donde una cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4* o *STK4* detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) o una cantidad del producto de la expresión del gen *ACVR2B* menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es
10 indicativa de una menor supervivencia libre de recaída a distancia o una menor supervivencia global.

El término “gen *Pim1*” se refiere al gen o a la secuencia de ADN que codifica para la proteína Pim1, una variante de la proteína Pim1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente
15 equivalente.

El término “gen *SRC*” se refiere al gen o a la secuencia de ADN que codifica para la proteína Pim1, una variante de la proteína Pim1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente
20 equivalente.

El término “gen *MAPKAPK3*” se refiere al gen o a la secuencia de ADN que codifica para la proteína Pim1, una variante de la proteína Pim1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea
25 funcionalmente equivalente.

El término “gen *FGFR4*” se refiere al gen o a la secuencia de ADN que codifica para la proteína Pim1, una variante de la proteína Pim1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea
30 funcionalmente equivalente.

El término “gen *STK4*” se refiere al gen o a la secuencia de ADN que codifica para la proteína Pim1, una variante de la proteína Pim1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente
35 equivalente.

El término “gen *ACVR2B*” se refiere al gen o a la secuencia de ADN que codifica para la proteína Pim1, una variante de la proteína Pim1 o un fragmento de las mismas, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea
40 funcionalmente equivalente.

El término “producto de la expresión”, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia al producto resultante de la transcripción (ARN) o de la expresión (proteína) de un gen o de una secuencia de ADN. O a cualquier forma
45 resultante del procesamiento del producto resultante de la transcripción o de la expresión de un gen o de una secuencia de ADN.

El término “diagnóstico”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos cuarto y quinto de la presente invención, se refiere a la capacidad de detectar la presencia del CCR, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, y en la comparación de la cantidad detectada con una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.
50

El término “pronóstico”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos cuarto y sexto de la presente invención, se refiere a la capacidad de asignar una probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso de la enfermedad del CCR, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, y en la comparación de la cantidad detectada con una cantidad de referencia. Esta asignación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es estadísticamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos.
65

ES 2 361 808 A1

La expresión “detección de la cantidad” en la muestra obtenida, tal y como se emplea en la descripción de los métodos cuarto, quinto o sexto de la presente invención, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* basada en una señal que se obtiene directamente de los productos de la expresión de dichos genes y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, respectivamente, presentes en la muestra. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto de los productos de la expresión de los genes) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos primero, segundo o tercero de la presente invención, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de estos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos cuarto, quinto o sexto de la presente invención, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, respectivamente, de una muestra de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación del paso (c) de los métodos cuarto, quinto o sexto de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se emplea en la descripción de los métodos cuarto, quinto o sexto de la presente invención, se refiere a la cantidad absoluta o relativa del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* que permite discriminar la presencia del CCR. La cantidad de referencia adecuada puede ser determinada por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, la cantidad de referencia puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media de la cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* en una población de sujetos control determinado mediante el método de la presente invención.

De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* puede ser llevada a cabo por cualquier método conocido en el estado de la técnica.

En una realización preferida de los métodos cuarto, quinto o sexto de la invención, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza analizando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, donde el análisis del nivel de ARNm se puede realizar, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; *microarrays* de ADN elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio.

En una realización preferida de los métodos cuarto, quinto o sexto de la invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* en la muestra obtenida se realiza analizando el nivel de las proteínas *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, de sus variantes o de fragmentos de las mismas, donde el análisis del nivel de dichas proteínas se puede realizar, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante inmunoensayo, mediante resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica conocida en el estado de la técnica. En una realización preferida, la detección de la cantidad de las proteínas *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, de sus variantes o de los fragmento de las mismas, se realiza mediante un inmunoensayo.

En una realización preferida, el inmunoensayo es un *immunoblot*. Para llevar a cabo la técnica del *immunoblot*, también llamada *Western blot* o *inmunodetección en membrana*, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas mediante electroforesis en un medio de soporte capaz de retenerlas. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente o membrana donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, a sus variantes o a los fragmentos de las mismas. Esta membrana se hibrida con un primer anticuerpo específico (o anticuerpo primario) que reconoce a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, a su variante o a un fragmento de las mismas. A continuación, la membrana se hibrida con un segundo anticuerpo (o anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica al anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, a su variante o al fragmento de las mismas el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Son conocidos en el estado de la técnica diferentes formatos, soportes y técnicas que pueden ser empleados para la realización de este aspecto preferido de los métodos cuarto, quinto o sexto de la invención.

Otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a anticuerpos específicos que reconocen a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, a sus variantes o a fragmentos de las mismas. A continuación, los cortes se hibridan con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, a su variante o al fragmento de las mismas el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

Preferiblemente, la muestra biológica aislada en el paso (a) de los métodos cuarto, quinto o sexto de la invención comprende células tumorales y, más preferiblemente, células tumorales de CCR. La muestra biológica que contiene células tumorales puede ser un tejido, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia tumoral o un aspirado por aguja fina, o puede ser un fluido biológico, por ejemplo, pero sin limitarse, una muestra de fluido, como sangre, plasma, suero, linfa, fluido ascítico, orina o exudado mamario. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o embebida en parafina.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo los métodos primero, segundo o tercero de la invención que comprende los elementos necesarios para detectar la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas de la lista que comprende Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B en una muestra biológica aislada de un sujeto. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit además comprende los elementos necesarios para comparar la cantidad detectada la cantidad de autoanticuerpos frente a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B con una cantidad de referencia.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo los métodos cuarto, quinto o sexto de la invención que comprende los elementos necesarios para detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* en una muestra biológica aislada de un sujeto. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit además comprende los elementos necesarios para comparar la cantidad detectada la cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* con una cantidad de referencia.

Dichos kits puede contener todos aquellos reactivos necesarios para detectar la cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B o del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, una variante o un fragmento de las mismas purificados, anticuerpos capaces de reconocer específicamente a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, cebadores, polimerasas, sondas o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado, el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

65 Descripción de las figuras

Figura 1. Muestras el análisis de la expresión de *ACVR2B*, *Pim1* y *MAPKAPK3* en líneas celulares y tejido tumoral. A, Las inmunodetecciones en membrana se realizaron con anticuerpos comerciales obtenidos frente a *ACVR2B*,

Pim1 y MAPKAPK3 utilizando anti-tubulina como control del ensayo. 50 μg de extractos celulares de 6 líneas celulares de CCR (Rko, Hct116, SW48, SW480, Hct15, Colo205) y 5 líneas celulares de otras enfermedades o normales se utilizaron como referencia en el ensayo ((BxPc3 (adenocarcinoma de páncreas), Molt4 (Linfoblastoide), Neut (Neutrófilos), MEF (fibroblastos murinos embrionarios) y Linf (linfocitos)) se corrieron por separado en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. B, 50 μg de extracto proteico de tejidos pareados normales (N) y tumorales (T) de seis pacientes con CCR (estadios de Duke A, B y C) se corrieron de la misma forma. La señal se desarrolló utilizando ECL (Amersham) o SuperSignal Femto (Pierce). C, Los niveles relativos de la expresión de los genes de FGFR4 (Notterman, Alon *et al.* 2001), MAPKAPK3 (Ki, Jeung *et al.* 2007), SRC (Ki, Jeung *et al.* 2007) y STK4 (Watanabe, Kobunai *et al.* 2006) se evaluaron utilizando la base de datos pública de DNA *microarrays* Oncomine (www.oncomine.org). D, Análisis de la expresión de Pim1 y ACVR2B en tejido utilizando TMA específicos de CCR. Las imágenes se tomaron a diferentes aumentos (100x y 400x). La expresión de Pim1 se observó en células epiteliales rodeando las criptas de tejido tumoral con tinción citoplasmática. La tinción de ACVR2B se localizó principalmente a nivel de membrana de las células epiteliales en el tejido normal con una clara disminución de su expresión en tejido tumoral.

Figura 2. Muestra la verificación de los AATs seleccionados mediante ELISA. Valores de ELISA de Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B usando CEA y Anexina IV como controles. Las barras de error representan la desviación estándar del ensayo.

Figura 3. Muestra las curvas ROC de los AATs seleccionados. Representación gráfica del comportamiento de los AATs A, Curvas ROC utilizando los valores de ELISA de ACVR2B, Pim1 y MAPKAPK3 individualmente. B, Curvas ROC utilizando diferentes combinaciones de las proteínas seleccionadas. C, Curvas ROC utilizando de los controles CEA y Anexina IV.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Identificación de autoanticuerpos específicos de cáncer colorrectal

Doce sueros de pacientes con CCR en estadios avanzados y que desarrollaron diferentes tipos de metástasis hacia hígado (7 pacientes), hígado y pulmón (4 pacientes) e hígado y huesos (1 paciente) y 8 sueros de individuos sanos fueron testados usando *microarrays* de proteínas de alta densidad con el fin de identificar autoanticuerpos específicos de CCR y sus antígenos reactivos respectivos (Tabla 1). Los sueros control fueron seleccionados para tener exactamente la misma proporción de mujeres y hombres y la misma edad media de los pacientes con CCR (64,5 años). Los controles sanos y los pacientes con CCR mostraron un patrón de inmunoreactividad diferente. Después de cuantificar la intensidad de los diferentes puntos (proteínas) con el programa GenePix, los datos se normalizaron usando el método de los cuantiles y se procesaron utilizando el ProtoArray Prospector Analyser. Los *arrays* usados como control mostraron un excelente comportamiento, con un bajo nivel de ruido de fondo y reactividad específica.

Con el fin de estudiar la habilidad de la firma de autoanticuerpos para discriminar entre los diferentes tipos de metástasis se realizó un clúster no supervisado con los datos procesados utilizando el programa MeV. Las muestras metastásicas se separaron en dos ramificaciones principales que correspondían a los pacientes con metástasis hacia hígado e hígado y pulmón y únicamente dos muestras no se clasificaron correctamente. Por otra parte, el análisis supervisado con los datos procesados de los pacientes con CCR mostró que los dos tipos de pacientes se podían separar satisfactoriamente. Así, una muestra de AATs con una prevalencia superior al 60% se asoció a los pacientes de CCR con metástasis hacia hígado (22 proteínas) o bien, metástasis hacia hígado y pulmón (15 proteínas) (Tabla 2).

ES 2 361 808 A1

TABLA 1

Información clínica de los pacientes con CCR testados en los microarrays de proteínas

5

Suero	Edad ¹	Género ²	Progresión ³	Tiempo de supervivencia en meses ⁴	Metástasis
VH1	84	M	Vivo	-	Hígado
MH1	60	M	Muerto	15	Hígado
MHP1	65	H	Muerto	64	Hígado-Pulmón
MHP2	41	H	Muerto	62	Hígado-Pulmón
MH2	55	H	Muerto	14	Hígado
MHP3	62	H	Muerto	51	Hígado-Pulmón
VP1	71	M	Vivo	-	Hígado-Huesos
VH2	75	H	Vivo	-	Hígado
MH3	76	H	Muerto	31	Hígado
MH4	64	H	Muerto	28	Hígado
VHP1	51	H	Vivo	-	Hígado-Pulmón
VH3	74	H	Vivo	-	Hígado

10

15

20

25

30

¹Edad en años. ²H, hombre; M, mujer. ³Progresión de los pacientes con CCR después de la obtención del suero. ⁴Tiempo en meses de supervivencia después de la obtención del suero.

35

⁵Metástasis asociada al paciente.

TABLA 2

Proteínas reactivas a autoanticuerpos asociados a metástasis

40

Reactividad aumentada en metástasis hacia pulmón

45

50

55

60

65

PAK1	86%	13%	0,00216	Movilidad y morfología celular
HOMER2	86%	25%	0,01299	Crecimiento celular
IRAK4	86%	25%	0,01299	Transducción de señal
PRKD2	86%	25%	0,01299	Transducción de señal
AK075484	86%	13%	0,01299	Proteína hipotética
C2orf13	71%	13%	0,01515	Proteína hipotética
PSCD3	71%	13%	0,01515	Transducción de señal
SH3BGRL2	71%	13%	0,01515	No conocida
CDK2	71%	13%	0,01515	Ciclo celular
DAPK2	71%	13%	0,01515	Apoptosis
TRPT1	86%	38%	0,04545	Proteína de unión a ARN
PDGFRB	86%	38%	0,04545	Transducción de señal
NEK1	86%	38%	0,04545	Reparación de ADN
SOCS3	86%	25%	0,04545	Señalización de citocinas
EPHA4	86%	25%	0,04545	Transducción de la señal, angiogénesis

ES 2 361 808 A1

TABLA 2 (continuación)

Reactividad aumentada en metástasis hacia hígado

Nombre	Prevalencia Hígado	Prevalencia pulmón	Valor <i>p</i>	Función
PHLDB1	88%	14%	0,0022	No conocida
AKT3	75%	14%	0,0130	Transducción de señal
PRKCH	75%	14%	0,0130	Transducción de señal
MAPKAPK3	88%	29%	0,0152	Transducción de señal de la proteína Ras
C9orf43	88%	29%	0,0152	Proteína hipotética
EGFR	88%	29%	0,0152	Transducción de señal
CAMKV	63%	14%	0,0455	Kinasa, señalización celular
THAP3	63%	14%	0,0455	Apoptosis
C15orf38	63%	14%	0,0455	Proteína hipotética
EPB41L5	63%	14%	0,0455	Adhesión celular
PGAM1	63%	14%	0,0455	Metabolismo, vía energética
PADI4	63%	14%	0,0455	Metabolismo, vía energética
UBE2T	63%	14%	0,0455	Metabolismo proteico
C9orf78	63%	14%	0,0455	Proteína hipotética
WDR61	63%	14%	0,0455	Regulación transcripcional
PRKCB1	63%	14%	0,0455	Transducción de señal
PRKCD	63%	14%	0,0455	Transducción de señal
ZAP70	63%	14%	0,0455	Activación del desarrollo de células T
ABL2	63%	14%	0,0455	Transducción de señal
WEE1	63%	14%	0,0455	Ciclo celular
DCAMKL2	63%	14%	0,0455	No conocida
TRIM21	63%	14%	0,0455	Regulación transcripcional

Ejemplo 2

45 *Caracterización de los AATs más prevalentes en cáncer colorrectal*

Las proteínas que mostraron capacidad discriminadora entre pacientes normales y tumorales aparecen en la Tabla 3. El análisis se realizó utilizando el programa ProtoArray Prospector Analyser clasificando los datos en función del p valor calculado para cada proteína y la prevalencia de los autoanticuerpos en ambos grupos. El p valor se fijó para ser como máximo 0,04 y la prevalencia mayor de un 50% en la población de pacientes con cáncer colorrectal. En total, 432 proteínas mostraron inmunoreactividad a los autoanticuerpos presentes en el suero. Entre ellas, 43 proteínas poseían un p valor significativo menor de 0,04. En cuanto a su clasificación, 25 de ellas presentaban una mayor prevalencia en el suero de pacientes con CCR y 18 una prevalencia menor en pacientes respecto a individuos control. Seis proteínas -MAPKAPK3, Pim1, SRC, STK4, FGFR4 y ACVR2B- se seleccionaron según los datos de intensidad de señal de los *microarrays*. Dichas proteínas estaban entre las más prevalentes en el suero de pacientes con cáncer según el análisis usando el Prospector Analyser y mostraban una prevalencia en CCR entre el 50-70% y menor de un 20% de prevalencia en los sujetos control. Aunque había variaciones significativas en cuanto a la respuesta individual, MAPKAPK3, Pim1, SRC, STK4 y FGFR4 fueron reconocidas significativamente por pacientes con CCR. Por otro lado, ACVR2B mostró un reconocimiento diferente dado que lo reconocían principalmente los sujetos control.

ES 2 361 808 A1

TABLA 3

*Proteínas reactivas a autoanticuerpos asociados a CCR**

5

Reactividad disminuida en cáncer colorrectal

	RBPJ	60%	7,1%	0,0036	Recombinación de ADN
	ITGA6	80%	28,6%	0,0099	Adhesión celular
10	ACVR2B*	70%	21,4%	0,0144	Vía de señalización de BMP
	NFYA	50%	7,1%	0,0144	Regulación transcripcional
	TTLL7	50%	7,1%	0,0144	Diferenciación celular
15	C9orf43	50%	7,1%	0,0144	No conocida
	ZNF706	50%	7,1%	0,0144	No conocida
	HDAC1	50%	7,1%	0,0144	Anti-apoptosis
	TPM4	50%	7,1%	0,0144	Movilidad celular
20	TSLP	70%	21,4%	0,0154	Citokina, señalización celular
	WBP2	70%	21,4%	0,0154	No conocida
	STAU1	60%	14,3%	0,0181	Proteína de unión a ARN
25	PFDN5	60%	14,3%	0,0181	Plegamiento de proteína
	COASY	60%	14,3%	0,0181	Biosíntesis de coenzima A
	IGLC1	80%	35,7%	0,0249	Aminoacilación del tARN para la traducción de proteínas
30	MFAP2	70%	21,4%	0,0399	Citoesqueleto
	BHMT2	70%	21,4%	0,0399	Metiltransferasa
	EFNA3	70%	28,6%	0,0399	Señalización celular

35

* Las proteínas fueron clasificadas según el valor *p* calculado y la prevalencia de la proteína en el grupo de cáncer colorrectal o en el grupo control.

40

45

50

55

60

65

ES 2 361 808 A1

TABLA 3 (continuación)

Reactividad aumentada en cáncer colorrectal

Nombre	Prevalencia Cáncer	Prevalencia Control	Valor <i>p</i>	Función
MAPKAPK3	71,4%	10%	0,0099	Transducción de señal de la proteína Ras
PIM-1	71,4%	20%	0,0099	Proliferación celular
STK4	71,4%	20%	0,0099	Morfogénesis celular
FGFR4	71,4%	20%	0,0099	Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento del fibroblasto
TRIM21	71,4%	20%	0,0099	Regulación de la Transcripción
SRC	57,1%	10%	0,0102	Transducción de señal de la proteína Ras
AKT1	57,1%	10%	0,0102	Vía de señalización proteína G – receptor
KDR	57,1%	10%	0,0102	Angiogénesis
PKN1	57,1%	10%	0,0102	Activación de la actividad JNK
CSNK1G2	92,9%	50%	0,0144	Vía de señalización del receptor Wnt
DAPK1	92,9%	50%	0,0144	Anti-apoptosis
PBK	78,6%	30%	0,0154	Mitosis
NEK3	85,7%	30%	0,0181	Ciclo celular
PRKCD	85,7%	40%	0,0181	Cascada de señalización intracelular
SALL2	50,0%	10%	0,0238	Regulación de la transcripción, ADN dependiente
GRK7	50,0%	10%	0,0238	Actividad kinasa proteína G – receptor
IRAK4	50,0%	10%	0,0238	Cascada I-kappaB kinasa/NF-kappaB
MAPKAPK5	50,0%	10%	0,0238	Transducción de señal de la proteína Ras
PKN2	50,0%	10%	0,0238	Transducción de señal
ABL2	50,0%	10%	0,0238	Adhesión celular
RPS6KA1	64,3%	10%	0,0249	Transducción de señal
BMX	64,3%	20%	0,0249	Cascada de señalización intracelular
PDGFRB	64,3%	20%	0,0249	Vía de señalización del receptor del factor de crecimiento de las plaquetas
CDK5/p35	64,3%	20%	0,0249	Vía muscarínica del receptor de la acetilcolina
RPS6KA2	71,4%	30%	0,0399	Transducción de señal

* Las proteínas fueron clasificadas según el valor *p* calculado y la prevalencia de la proteína en el grupo de cáncer colorrectal o en el grupo control.

Ejemplo 3

Análisis de la expresión diferencial de las proteínas seleccionadas AATs en líneas celulares y tejido tumoral de cáncer colorrectal

5

Un reconocimiento más elevado por los autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con CCR indicaría una sobreexpresión de aquellas proteínas en tejido tumoral de CCR, mientras que un reconocimiento más débil en el suero de pacientes con CCR que en los individuos normales indicaría una disminución de la expresión u otra modificación de dichas proteínas en el tumor. Con esta hipótesis de partida, tres autoantígenos: Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B se seleccionaron para la validación inicial.

10

En primer lugar, los niveles de expresión de las proteínas en extractos pareados normal/tumoral de tejido del mismo paciente con CCR se analizaron mediante inmunodetección en membrana (Figura 1A). Pim1 y MAPKAPK3 mostraron una mayor expresión en tejido tumoral, siendo su expresión más abundante en etapas avanzadas de la enfermedad. ACVR2B exhibía una débil expresión en tejido tumoral y, en general, más expresión en estadios tempranos de la enfermedad. Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de los autoantígenos en 6 líneas celulares de CCR en comparación con 5 líneas celulares usadas como referencia (Figura 1B). La expresión de Pim1 y MAPKAPK3 se detectó en prácticamente todas las líneas celulares de CCR, excepto MAPKAPK3 en la línea celular SW480. En cuanto a ACVR2B, en las líneas celulares de referencia incluyendo neutrófilos y linfocitos se observó su expresión, no así en las líneas celulares de cáncer de colon.

15

20

Con el fin de estudiar la correlación entre la respuesta humoral y la abundancia en tejido, se verificó la expresión diferencial de las 6 proteínas a nivel de mRNA y a nivel proteico. Para determinar los niveles de mRNA recurrimos a la base de datos Oncomine (Rhodes *et al.* 2004. Neoplasia New York, N.Y. 6 (1), 1-6), una página web que incluye una base de datos con los resultados de datos de expresión génica en cáncer utilizando *microarrays*. Los datos para FGFR4, MAPKAPK3, SRC y STK4 en CCR se muestran en la Figura 1C. Todos ellos mostraron unos niveles de expresión mayores en CCR. No se encontraron datos para Pim1 y ACVR2B en CCR. Para corroborar la expresión diferencial de las proteínas, utilizamos un *microarray* de tejidos de CCR con anticuerpos específicos de ACVR2B y Pim1, que eran los únicos disponibles comercialmente para esta técnica entre las 6 proteínas estudiadas (Figura 1D). Pim1 mostró una expresión aumentada en las células epiteliales que rodean las criptas de tejido tumoral, siendo la tinción principalmente citoplasmática. Además, tanto los linfocitos como los macrófagos se tiñeron de una forma muy importante. En cuanto a ACVR2B, la expresión estaba disminuida en pacientes con CCR, mientras que en tejido normal se observaba su expresión normal. En este caso, la tinción de ACVR2B se localizó principalmente en la membrana de las células epiteliales dado que actúa como receptor de membrana.

25

30

35

Ejemplo 4

Confirmación del uso de Pim1, ACVR2B y MAPKAPK3 como biomarcadores en cáncer colorrectal

40

La técnica de ELISA es ampliamente utilizada en clínica por su facilidad y sensibilidad. Con el fin de corroborar nuestros resultados previos decidimos realizar un ensayo de ELISA con las proteínas recombinantes Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B expresadas en *E. coli*, ya que podría permitir discriminar fácilmente entre sueros de individuos sanos e individuos con cáncer. Como controles se utilizaron CEA comercial y Anexina IV recombinante expresada en células de mamífero. CEA por ser el marcador más usado en el diagnóstico de CCR (Duffy, M. J. 2001 Clinical chemistry 47 (4), 624-630) y Anexina IV por su sobreexpresión en tejido de CCR (Alfonso *et al.* 2005. Proteomics 5 (10), 2602-2611). Así, en este ensayo directo de ELISA se testaron 94 muestras de suero, 52 sueros de pacientes con CCR y 42 sueros de individuos sanos. Los resultados del ELISA fueron consistentes con los obtenidos en el *array* de proteínas y en la inmunodetección en membrana; los autoanticuerpos frente a Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B permitían discriminar entre pacientes con CCR y sueros control. Pim1 mostró una inmunoreactividad significativamente mayor en el suero de pacientes con CCR (media= 0,606, 95% CI= 0,505 a 0,708, $p < 0,008$) que en sujetos control (media = 0,439, 95% CI= 0,369 a 0,510). Para MAPKAPK3 se obtuvieron resultados similares en sueros de pacientes con cáncer (media= 0,929, 95% CI= 0,828 a 1,030, $p < 0,0001$) y controles (media= 0,648, 95% CI= 0,574 a 0,722) (Figura 2). En el caso de ACVR2B la inmunoreactividad fue superior en el suero de pacientes control (media= 0,863, 95% CI= 0,744 a 0,981, $p < 0,026$) que en el suero de individuos con cáncer de colon (media= 0,668, 95% CI= 0,549 a 0,790), lo que confirmó los resultados previos obtenidos con los *protoarrays*. En cuanto a la inmunoreactividad de CEA y Anexina IV, no se observaron diferencias significativas entre muestras tumorales (CEA: media= 0,787, 95% CI= 0,674 a 0,900, $p < 0,1$); (Anexina IV: media= 0,421, 95% CI= 0,360 a 0,481, $p < 0,16$) y muestras control (CEA: media= 0,665, 95% CI= 0,588 a 0,742; Anexina IV: media= 0,366, 95% CI= 0,318 a 0,414).

50

55

60

Posteriormente, se investigó la capacidad de esta respuesta humoral como predictor para detectar CCR. Así, se obtuvieron las curvas ROC a partir de la respuesta de los autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B (Figura 3A). La especificidad y sensibilidad del ensayo para Pim1 fue del 83,3 y 48,1% (usando un *cut-off* de 0,534), respectivamente, y el área debajo de la curva fue AUC= 0,651 (95% CI= 0,546 a 0,746). En el caso de MAPKAPK3, la especificidad fue 74% y la sensibilidad 72,7% (con un *cut-off* de 0,762), siendo AUC= 0,733 (95% CI= 0,632 a 0,819). Para ACVR2B encontramos una especificidad y sensibilidad del 76,2% y 60%, respectivamente, (*cut-off* = 0,548) y AUC= 0,666 (95% CI = 0,562 a 0,760). Las proteínas control CEA y Anexina IV dieron menores valores de especificidad y sensibilidad; especificidad de 59,5% y sensibilidad de 63,5% para CEA con un *cut-off*=

65

ES 2 361 808 A1

0,61 y AUC= 0,61 (95% CI= 0,513 a 0,717). La Anexina IV dio un valor de AUC= 0,556 (95% CI= 0,450 a 0,658) indicando la ausencia de autoanticuerpos específicos para esta proteína.

Finalmente, decidimos testar si diferentes combinaciones de estas proteínas mejorarían su capacidad diagnóstica. Los datos se ajustaron a una curva logística, se calcularon las regresiones logísticas y se obtuvieron diferentes modelos incorporando combinaciones de las proteínas (Figura 3C). El modelo inicial incluyó cuatro proteínas: Pim1, MAPKAPK3, ACVR2B y CEA, sin embargo los test del método discriminante lineal mostraron que CEA y Pim-1 no tenían relevancia en el modelo. Esto se confirmó comparando el modelo completo con las cuatro proteínas (AUC=0,85) con un modelo que incluía solamente MAPKAPK3 y ACVR2B (AUC=0,86). Mientras que CEA no mejoraba el modelo, Pim1 incluso lo empeoraba ligeramente.

Así, se demostró que un modelo con la combinación de tan solo los autoanticuerpos frente a MAPKAPK3 y ACVR2B era un relevante predictor de CCR con una especificidad y sensibilidad del 73,9 y 83,3%, respectivamente, y un área debajo de la curva AUC= 0,86 (Figura 3D).

Materiales y Métodos

Información clínica y obtención de los sueros (ejemplos 1, 2 y 4). Los sueros de 12 pacientes con CCR se recogieron al realizarse su diagnóstico (Hospital Universitario de Salamanca). Estas muestras se seleccionaron por tener los pacientes CCR en estadios avanzados, además de desarrollar metástasis hacia hígado (7 pacientes), hígado y pulmón (4 pacientes) o bien, hígado y huesos (1 paciente). La edad media de estos pacientes fue de 64,5 años (entre 41 y 84 años). Ocho sueros control se obtuvieron de donantes sanos y fueron seleccionados para tener exactamente la misma media de edad de la población de pacientes con CCR y la misma proporción de hombres y mujeres. Los datos clínicos de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Para la validación de los resultados mediante ELISA se utilizó un set independiente de 52 sueros de pacientes con CCR y 42 sueros normales.

Todos los sueros fueron procesados utilizando el mismo protocolo. Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la formación del coágulo y, tras su centrifugación a 3,000g durante 10 minutos a 4°C, los sueros fueron congelados y almacenados a -80°C hasta su uso.

Arrays de Proteínas (ejemplos 1 y 2). 20 sueros (12 de pacientes con CCR y 8 de individuos sanos) (Tabla 1) se incubaron con el ProtoArray™ Human Protein Microarrays v.4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este microarray contiene 8000 proteínas humanas fusionadas a GST, expresadas en células de insecto Sf9 e impresas por duplicado. Brevemente, los arrays se equilibraron a 4°C durante 15 min y se bloquearon con el tampón de bloqueo (1% BSA en PBS-Tween 20 0,1%) durante 1 h a 4°C con agitación suave. Un total de 150 µL de suero diluido 1:50 en tampón de bloqueo se aplicaron sobre la superficie del array. El array se selló con un CoverGlass (Corning) y se incubó durante 90 min a 4°C. Los arrays se lavaron con tampón de incubación (1% BSA en PBS con 0,5 mM DTT, 5% glycerol y 0,05% Triton X-100) y los autoanticuerpos del suero unidos a las proteínas del array se detectaron utilizando un anticuerpo secundario anti-human IgG (H+L) marcado con Alexa Fluor 647 (Invitrogen) diluido 1:2,000 en tampón de incubación a 4°C durante 90 min. Los arrays se lavaron con PBS Tween 20 0,1% y se secaron por centrifugación a 1000 rpm durante 1 min. Finalmente, los slides se escanearon en un ScanArray™ 5000 (Packard BioChip Tecnologías) usando los láseres de 635 nm y 532 nm. El software de análisis de imagen GenePix Pro 5.1 se utilizó para la cuantificación.

Como controles, los Protoarrays v4.0 se incubaron con un anticuerpo anti-GST antes de incubar el array con un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con AlexaFluor 555 para testar la uniformidad y la cantidad de proteína impresa en el array. Otro array se incubó directamente con el anticuerpo secundario anti-human IgG (H+L) marcado con Alexa Fluor 647 para determinar los niveles de ruido en el ensayo.

Anticuerpos, proteínas y líneas celulares (ejemplos 3 y 4). Los anticuerpos y las proteínas se obtuvieron de diferentes fuentes. CEA se obtuvo de Calbiochem y la albúmina de suero humana (HSA) se obtuvo de la compañía Sigma.

El cDNA codificante de Pim1 humana se introdujo en el vector pET28a, el cual permite la fusión 6xHis-Pim1, y fue expresada en *Escherichia coli* usando la cepa BL21 (DE3). El cDNA de la ACVR2B humana se introdujo en el vector pDEST 527 que permite la fusión 6xHis-ACVR2B, usando el sistema Gateway y fue expresada en bacteria, mientras que la proteína MAPKAPK3 humana se introdujo en el vector de expresión pDEST565 que permite la fusión 6xHis-GST-MAPKAPK3 y se expresó en las mismas condiciones que ACVR2B y Pim1. Las proteínas así expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando una columna HiTrap Chelating (GE Healthcare) seguida de un paso de purificación extra mediante una columna de penetrabilidad Superdex 200 column (GE Healthcare). El cDNA codificante de la Anexina IV humana se clonó en el vector de expresión pTT3 y se expresó en las células HEK293-EBNA. La proteína recombinante se expresó tras transfectar las células con lipofectamina (Sigma) y se purificó mediante una columna de afinidad de Ni-chelating resin (GE Healthcare).

Los anticuerpos frente a MAPKAPK3 y Pim1 utilizados en los ensayos de ELISA se compraron a la compañía Abnova. Los anticuerpos frente a MAPKAPK3, Pim1 y ACVR2B usados en inmunodetección en membrana y array de tejidos se compraron a la compañía Abcam.

ES 2 361 808 A1

Las líneas celulares de CCR (Rko, Hct116, Hct15, Sw45, Sw480, Colo 205), de adenocarcinoma pancreático BxPc3 y la línea linfoblastoide Molt4 se crecieron utilizando protocolos preestablecidos para dichas células. Los neutrófilos y linfocitos usados como controles se aislaron a partir de sangre periférica de un individuo sano. Los fibroblastos murinos embrionarios (MEF) se inmortalizaron infectando un cultivo primario con el virus Epstein-Barr y se crecieron utilizando protocolos preestablecidos para esta línea celular.

ELISA (ejemplo 4). Un ensayo de ELISA se desarrolló con el fin de testar la habilidad de los autoantígenos purificados para discriminar CCR usando suero de pacientes. Brevemente, se tapizaron 0,3 μg de las proteínas purificadas o HSA como control negativo en placas Microtiter (Maxisorp, Nunc) en PBS durante toda la noche. El día después, las placas se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 3% de leche desnatada en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, las 94 muestras de suero (dilución 1:50 en 3% de leche desnatada en PBS) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar, se utilizó un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con HRP diluido 1:3, 000 (v:v) para la detección y TMB para el desarrollo de la señal. La reacción se detuvo con 1M de H_2SO_4 y la absorción se midió a 450 nm.

Inmunodetección en membrana (ejemplo 3). Los extractos proteicos de tejidos pareados de 6 pacientes con CCR (12 en total) se prepararon como se ha descrito previamente en (5). Brevemente, los extractos proteicos se obtuvieron tras lisarlos con 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 1% desoxicolato sódico, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). La concentración de proteína se determinó utilizando el kit 2-D Quant (GE Healthcare) tras clarificarlo por centrifugación a 12000g durante 15 min.

Para la inmunodetección en membrana, 50 μg de los extractos proteicos de las 6 líneas celulares de cáncer de colon, las 5 líneas celulares de referencia y los tejidos pareados se corrieron en paralelo en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra) según protocolos estándar. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con las diluciones óptimas de anticuerpos mono o policlonales frente a los antígenos seleccionados: Pim1 (dilución 1:100), MAPKAPK3 (dilución 1: 500) y ACVR2B (dilución 1:200). Como anticuerpos secundarios se utilizó un anti-IgG de cabra (DakoCytomation) a una dilución 1:5,000 para ACVR2B y 1:20,000 para Pim1 y MAPKAPK3 o bien un anti-IgG de pollo (Jackson ImmunoResearch Laboratory) conjugado a HRP. La señal se detectó mediante ECL (GE Healthcare).

Inmunohistoquímica (ejemplo 3). Los *microarrays* de tejido (TMA) específicos de CCR con 45 muestras tumorales diferentes se prepararon como se ha descrito previamente (Madoz-Gurpide *et al.* 2007. Mol Cell Proteomics 6 (12), 2150-2164). Las secciones se cortaron a una anchura máxima de 3 μm y se secaron a 56°C durante 16h antes de desparafinar en xileno y rehidratar en agua tras pasos previos en diferentes porcentajes de etanol. La exposición y recuperación de epítomos se realizó en 0,01 M tampón citrato sódico calentado durante 2 min en una olla a presión. Después del paso de calentamiento, los *slides* se lavaron con agua durante 5 min y nuevamente en tampón Tris salino (TBS) a pH 7,4.

Los TMAs se incubaron con un anticuerpo monoclonal frente a Pim1 (Abcam) y un anticuerpo policlonal frente a ACVR2B (Abcam). La unión específica se detectó mediante anti-IgG de cabra conjugado a biotina. La visualización de interacciones específicas se realizó con el sistema EnVisionHRP (DakoCytomation).

Análisis estadístico (ejemplo 1, 2 y 4). Los “slides” se analizaron con el software del fabricante -ProtoArray Prospector Analyser 4.0 (Invitrogen)-, que usa un test estadístico basado en el principio de la desigualdad de Chebyshev (Hudson *et al.* 2007. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of América 104 (44), 17494-17499). Después de la normalización por cuantiles, el algoritmo compara la señal de cada proteína a la señal de los controles negativos en el array y asigna un Cl p valor para cada proteína. El software identifica las señales significativas (las que se identifican como positivas sobre el ruido de fondo) y calcula unos valores Z que reflejan la intensidad de la señal en comparación con todas las proteínas. Finalmente, el programa compara los 2 grupos e identifica las proteínas que tienen una señal aumentada en uno de los 2 grupos y se calcula el p valor para cada proteína según la hipótesis de que no hay un aumento de señal en un grupo comparado con el otro.

Los clústeres supervisados se obtuvieron usando la distancia métrica y la correlación de Pearson para visualizar la discriminación entre los grupos utilizando el programa Multi Experiment Viewer (MeV) (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA). Para determinar si la media del grupo normal y la media del grupo tumoral eran estadísticamente diferentes se realizó un test no paramétrico de Wilcoxon con los datos obtenidos del ELISA. Posteriormente, cada marcador se evaluó de manera individual utilizando una curva ROC calculada con el programa JMP (SAS, NC, USA). Finalmente, se hizo un análisis discriminante usando modelos lineales para determinar el efecto de la combinación de los biomarcadores (Visintin *et al.* 2008. Clinical Cancer Research. 14 (4), 1065-1072).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de los autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, como marcador de cáncer colorrectal.
2. Uso de los autoanticuerpos según la reivindicación 1, donde los autoanticuerpos son inmunoglobulinas G.
3. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la evolución del
10 cáncer colorrectal que comprende:
- a) obtener una muestra biológica aislada de un sujeto,
- 15 b) detectar la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, en la muestra obtenida en el paso (a);
y
- c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 20 4. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 3, donde en el paso (b) se detecta la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: *Pim1*, *MAPKAPK3* o *ACVR2B*.
- 25 5. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 4, donde en el paso (b) se detecta la cantidad de autoanticuerpos frente a *MAPKAPK3* y/o *ACVR2B*.
6. Método de diagnóstico del cáncer colorrectal según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de autoanticuerpos frente a las proteínas *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4* o
30 *STK4* detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) o una cantidad de autoanticuerpos frente a la proteína *ACVR2B* menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia del cáncer colorrectal.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, donde la detección de la cantidad de autoanticuerpos del
35 paso (b) se lleva a cabo mediante inmunoensayo.
8. Método según la reivindicación 7, donde el inmunoensayo es un *microarray* de proteínas.
9. Método según la reivindicación 7, donde el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
40 (ELISA).
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde en el inmunoensayo se emplea, al menos, una de las proteínas seleccionada de la lista que comprende: *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, una variante o un fragmento de las mismas unido a un sustrato sólido.
- 45 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, donde los autoanticuerpos son inmunoglobulinas G.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, donde la muestra biológica es un fluido biológico.
- 50 13. Método según la reivindicación 12, donde el fluido biológico es sangre o suero o plasma sanguíneo.
14. Uso del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende *Pim1*,
SRC, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* como marcador de cáncer colorrectal.
- 55 15. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o el seguimiento de la evolución del cáncer colorrectal que comprende:
- a) obtener de una muestra biológica aislada de un sujeto,
- 60 b) detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B*, en la muestra obtenida en el paso (a);
y
- 65 c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

ES 2 361 808 A1

16. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 15, donde en el paso (b) se detecta la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende: *Pim1*, *MAPKAPK3* o *ACVR2B*.

5 17. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 16, donde en el paso (b) se detecta la cantidad del producto de la expresión de los genes *MAPKAPK3* y/o *ACVR2B*.

10 18. Método de diagnóstico del cáncer colorrectal según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que además comprende un paso (d) donde una cantidad del producto de la expresión de los genes *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4* o *STK4* detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) o una cantidad del producto de la expresión del gen *ACVR2B* menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia del cáncer colorrectal.

15 19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, donde el producto de la expresión del gen *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* es la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, respectivamente, una variante o un fragmento de las mismas.

20 20. Método según la reivindicación 19, donde la detección de la cantidad de la proteína del paso (b) se lleva a cabo mediante inmunoensayo.

21. Método según la reivindicación 20, donde el inmunoensayo es un *immunoblot*.

22. Método según la reivindicación 20, donde el inmunoensayo es una inmunohistoquímica.

25 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, donde la muestra biológica comprende células tumorales.

30 24. Kit para llevar a cabo los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13 que comprende los elementos necesarios para detectar la cantidad de autoanticuerpos frente a, al menos, una de las proteínas de la lista que comprende Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B en una muestra biológica aislada de un sujeto.

35 25. Kit para llevar a cabo los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23 que comprende los elementos necesarios para detectar la cantidad del producto de la expresión de, al menos, uno de los genes seleccionados de la lista que comprende *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* en una muestra biológica aislada de un sujeto.

40 26. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, que además comprende los elementos necesarios para comparar la cantidad detectada con una cantidad de referencia.

40

45

50

55

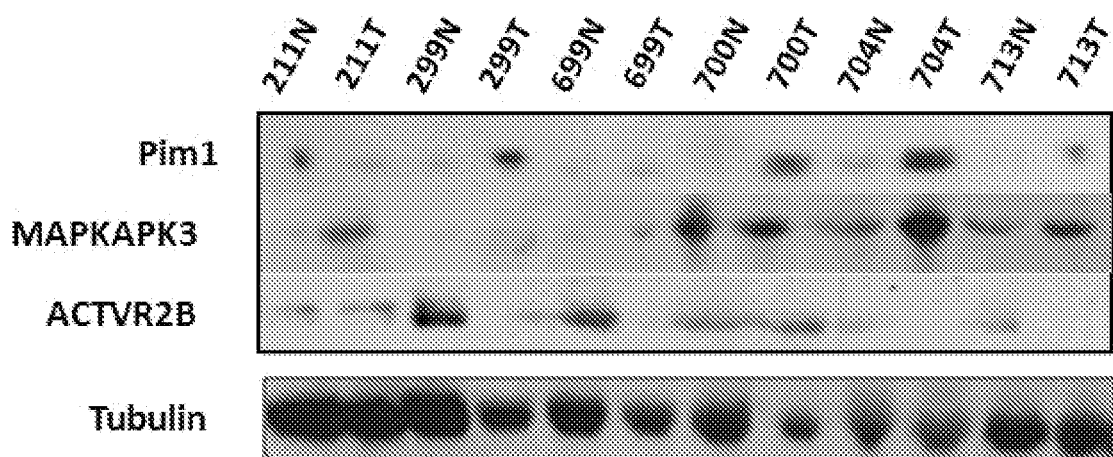
60

65

FIG.1

A

Extractos de tejidos pareados normales y tumorales



B

Extractos de líneas celulares

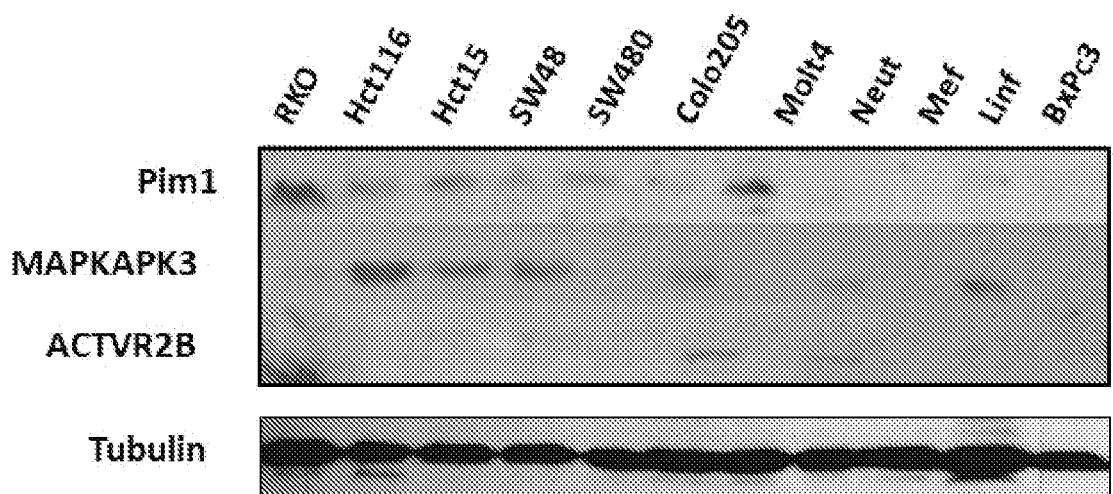


FIG.1

C

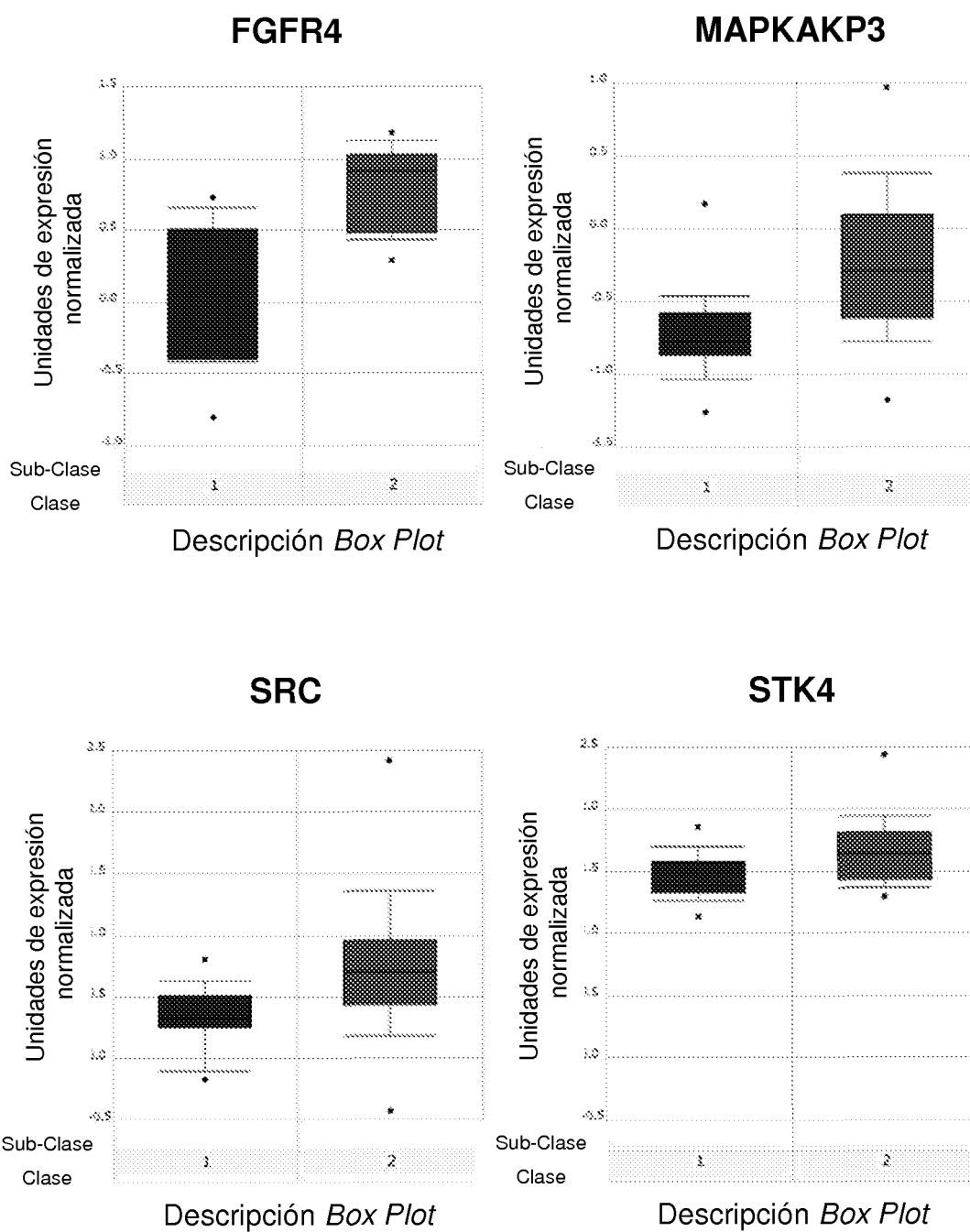


FIG.1

D

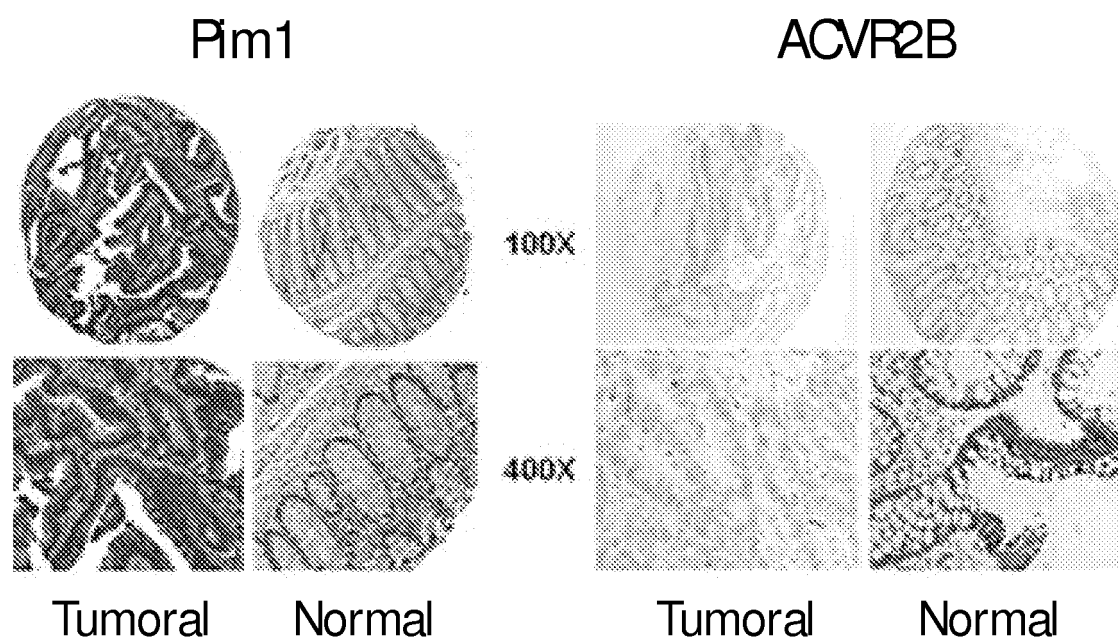


FIG.2

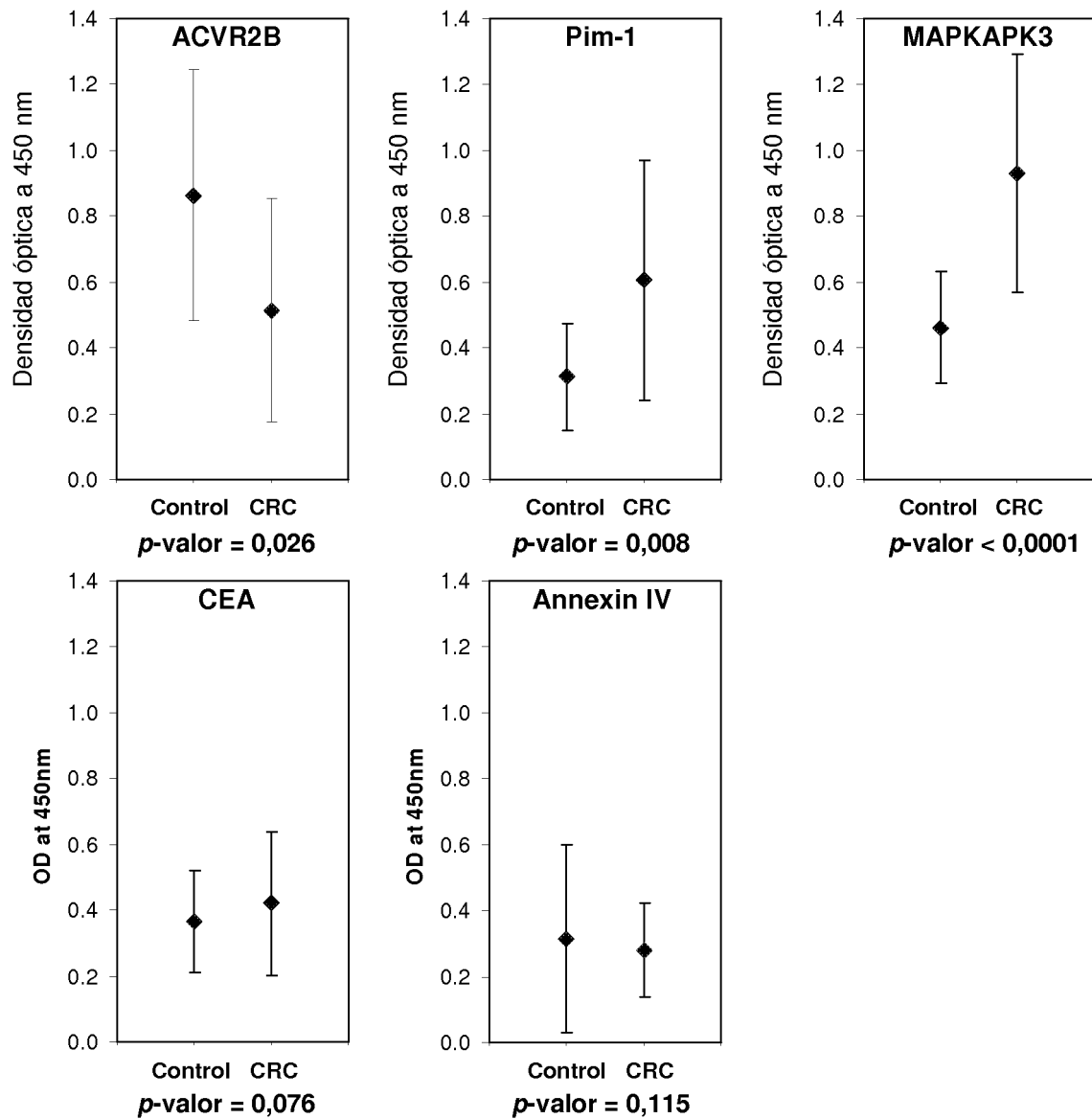
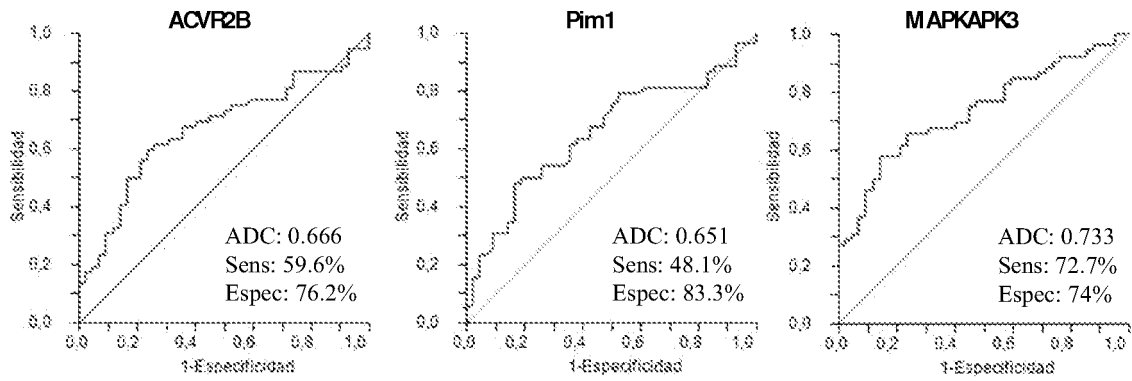
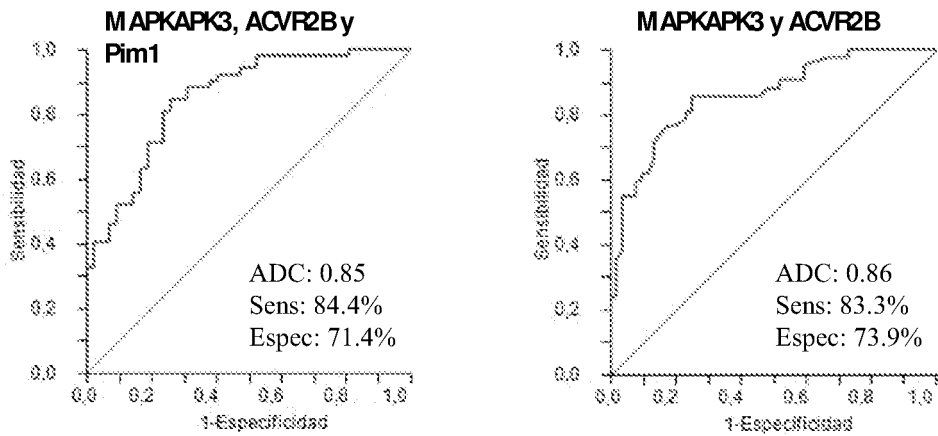


FIG.3

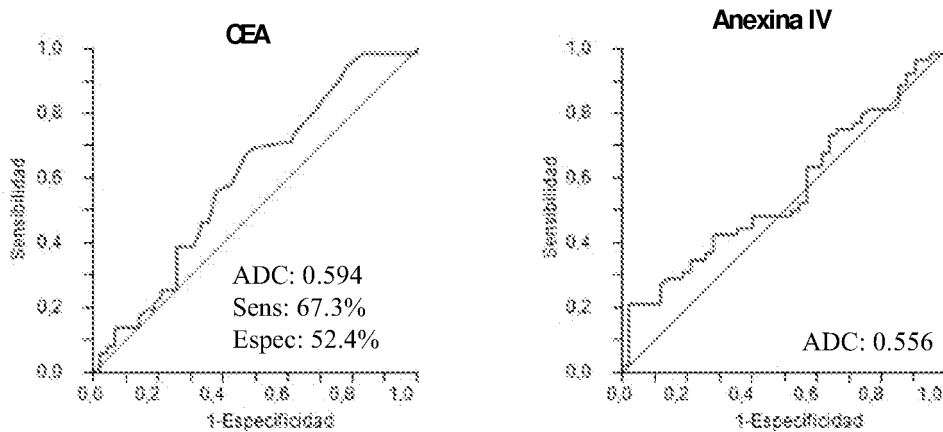
A



B



C



ES 2 361 808 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

5

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico o el pronóstico del cáncer colorrectal

<130> ES1641.298

10

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

15

<210> 1

<211> 313

<212> PRT

20

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

25

Met Leu Leu Ser Lys Ile Asn Ser Leu Ala His Leu Arg Ala Ala Pro
1 5 10 15

30

Cys Asn Asp Leu His Ala Thr Lys Leu Ala Pro Gly Lys Glu Lys Glu
20 25 30

35

Pro Leu Glu Ser Gln Tyr Gln Val Gly Pro Leu Leu Gly Ser Gly Gly
35 40 45

40

Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn Leu Pro Val
50 60

45

Ala Ile Lys His Val Glu Lys Asp Arg Ile Ser Asp Trp Gly Glu Leu
65 70 75 80

50

Pro Asn Gly Thr Arg Val Pro Met Glu Val Val Leu Leu Lys Lys Val
85 90 95

55

Ser Ser Gly Phe Ser Gly Val Ile Arg Leu Leu Asp Trp Phe Glu Arg
100 105 110

60

Pro Asp Ser Phe Val Leu Ile Leu Glu Arg Pro Glu Pro Val Gln Asp
115 120 125

65

Leu Phe Asp Phe Ile Thr Glu Arg Gly Ala Leu Gln Glu Glu Leu Ala
130 135 140

Arg Ser Phe Phe Trp Gln Val Leu Glu Ala Val Arg His Cys His Asn
145 150 155 160

Cys Gly Val Leu His Arg Asp Ile Lys Asp Glu Asn Ile Leu Ile Asp
165 170 175

Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu

ES 2 361 808 A1

	180		185		190											
5	Leu	Lys	Asp 195	Thr	Val	Tyr	Thr	Asp 200	Phe	Asp	Gly	Thr	Arg 205	Val	Tyr	Ser
10	Pro	Pro 210	Glu	Trp	Ile	Arg	Tyr 215	His	Arg	Tyr	His	Gly 220	Arg	Ser	Ala	Ala
15	Val 225	Trp	Ser	Leu	Gly	Ile 230	Leu	Leu	Tyr	Asp	Met 235	Val	Cys	Gly	Asp	Ile 240
20	Pro	Phe	Glu	His	Asp 245	Glu	Glu	Ile	Ile	Arg 250	Gly	Gln	Val	Phe	Phe 255	Arg
25	Gln	Arg	Val	Ser 260	Ser	Glu	Cys	Gln	His 265	Leu	Ile	Arg	Trp	Cys 270	Leu	Ala
30	Leu	Arg	Pro 275	Ser	Asp	Arg	Pro	Thr 280	Phe	Glu	Glu	Ile	Gln 285	Asn	His	Pro
35	Trp	Met 290	Gln	Asp	Val	Leu	Leu 295	Pro	Gln	Glu	Thr	Ala 300	Glu	Ile	His	Leu
40	His 305	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly 310	Pro	Ser	Lys							
45	<210> 2															
50	<211> 536															
55	<212> PRT															
60	<213> <i>Homo sapiens</i>															
65	<400> 2															
70	Met 1	Gly	Ser	Asn 5	Lys	Ser	Lys	Pro	Lys	Asp 10	Ala	Ser	Gln	Arg	Arg	Arg 15
75	Ser	Leu	Glu	Pro 20	Ala	Glu	Asn	Val	His 25	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly 30	Ala	Phe
80	Pro	Ala	Ser 35	Gln	Thr	Pro	Ser	Lys 40	Pro	Ala	Ser	Ala	Asp 45	Gly	His	Arg
85	Gly	Pro 50	Ser	Ala	Ala	Phe	Ala 55	Pro	Ala	Ala	Ala	Glu 60	Pro	Lys	Leu	Phe
90	Gly 65	Gly	Phe	Asn	Ser	Ser 70	Asp	Thr	Val	Thr	Ser 75	Pro	Gln	Arg	Ala	Gly 80
95	Pro	Leu	Ala	Gly	Gly 85	Val	Thr	Thr	Phe	Val 90	Ala	Leu	Tyr	Asp	Tyr 95	Glu

ES 2 361 808 A1

	Ser	Arg	Thr	Glu 100	Thr	Asp	Leu	Ser	Phe 105	Lys	Lys	Gly	Glu	Arg 110	Leu	Gln
5	Ile	Val	Asn 115	Asn	Thr	Glu	Gly	Asp 120	Trp	Trp	Leu	Ala	His 125	Ser	Leu	Ser
10	Thr	Gly 130	Gln	Thr	Gly	Tyr	Ile 135	Pro	Ser	Asn	Tyr	Val 140	Ala	Pro	Ser	Asp
15	Ser 145	Ile	Gln	Ala	Glu	Glu 150	Trp	Tyr	Phe	Gly	Lys 155	Ile	Thr	Arg	Arg	Glu 160
20	Ser	Glu	Arg	Leu	Leu 165	Leu	Asn	Ala	Glu	Asn 170	Pro	Arg	Gly	Thr	Phe 175	Leu
25	Val	Arg	Glu	Ser 180	Glu	Thr	Thr	Lys	Gly 185	Ala	Tyr	Cys	Leu	Ser 190	Val	Ser
30	Asp	Phe	Asp 195	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu 200	Asn	Val	Lys	His	Tyr 205	Lys	Ile	Arg
35	Lys	Leu 210	Asp	Ser	Gly	Gly	Phe 215	Tyr	Ile	Thr	Ser	Arg 220	Thr	Gln	Phe	Asn
40	Ser 225	Leu	Gln	Gln	Leu	Val 230	Ala	Tyr	Tyr	Ser	Lys 235	His	Ala	Asp	Gly	Leu 240
45	Cys	His	Arg	Leu	Thr 245	Thr	Val	Cys	Pro	Thr 250	Ser	Lys	Pro	Gln	Thr 255	Gln
50	Gly	Leu	Ala	Lys 260	Asp	Ala	Trp	Glu	Ile 265	Pro	Arg	Glu	Ser	Leu 270	Arg	Leu
55	Glu	Val	Lys 275	Leu	Gly	Gln	Gly	Cys 280	Phe	Gly	Glu	Val	Trp 285	Met	Gly	Thr
60	Trp	Asn 290	Gly	Thr	Thr	Arg	Val 295	Ala	Ile	Lys	Thr	Leu 300	Lys	Pro	Gly	Thr
65	Met 305	Ser	Pro	Glu	Ala	Phe 310	Leu	Gln	Glu	Ala	Gln 315	Val	Met	Lys	Lys	Leu 320
70	Arg	His	Glu	Lys	Leu 325	Val	Gln	Leu	Tyr	Ala 330	Val	Val	Ser	Glu	Glu 335	Pro
75	Ile	Tyr	Ile	Val 340	Thr	Glu	Tyr	Met	Ser 345	Lys	Gly	Ser	Leu	Leu 350	Asp	Phe
80	Leu	Lys	Gly 355	Glu	Thr	Gly	Lys	Tyr 360	Leu	Arg	Leu	Pro	Gln 365	Leu	Val	Asp

ES 2 361 808 A1

Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn
 370 375 380
 5 Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn
 385 390 395 400
 10 Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp
 405 410 415
 15 Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr
 420 425 430
 20 Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val
 435 440 445
 25 Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val
 450 455 460
 30 Pro Tyr Pro Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg
 465 470 475 480
 35 Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp
 485 490 495
 40 Leu Met Cys Gln Cys Trp Arg Lys Glu Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe
 500 505 510
 45 Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro
 515 520 525
 50 Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu
 530 535
 55 <210> 3
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 60 <400> 3
 65 Met Asp Gly Glu Thr Ala Glu Glu Gln Gly Gly Pro Val Pro Pro Pro
 1 5 10 15
 70 Val Ala Pro Gly Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg
 20 25 30
 75 Glu Pro Lys Lys Tyr Ala Val Thr Asp Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Gln
 35 40 45
 80 Val Leu Gly Leu Gly Val Asn Gly Lys Val Leu Glu Cys Phe His Arg

ES 2 361 808 A1

	50		55		60													
5	Arg 65	Thr	Gly	Gln	Lys	Cys 70	Ala	Leu	Lys	Leu	Leu 75	Tyr	Asp	Ser	Pro	Lys 80		
10	Ala	Arg	Gln	Glu	Val 85	Asp	His	His	Trp	Gln 90	Ala	Ser	Gly	Gly	Pro 95	His		
15	Ile	Val	Cys	Ile 100	Leu	Asp	Val	Tyr	Glu 105	Asn	Met	His	His	Gly 110	Lys	Arg		
20	Cys	Leu	Leu 115	Ile	Ile	Met	Glu	Cys 120	Met	Glu	Gly	Gly	Glu 125	Leu	Phe	Ser		
25	Arg	Ile 130	Gln	Glu	Arg	Gly	Asp 135	Gln	Ala	Phe	Thr	Glu 140	Arg	Glu	Ala	Ala		
30	Glu 145	Ile	Met	Arg	Asp	Ile 150	Gly	Thr	Ala	Ile	Gln 155	Phe	Leu	His	Ser	His 160		
35	Asn	Ile	Ala	His	Arg 165	Asp	Val	Lys	Pro	Glu 170	Asn	Leu	Leu	Tyr	Thr 175	Ser		
40	Lys	Glu	Lys	Asp 180	Ala	Val	Leu	Lys	Leu 185	Thr	Asp	Phe	Gly	Phe 190	Ala	Lys		
45	Glu	Thr	Thr 195	Gln	Asn	Ala	Leu	Gln 200	Thr	Pro	Cys	Tyr	Thr 205	Pro	Tyr	Tyr		
50	Val	Ala 210	Pro	Glu	Val	Leu	Gly 215	Pro	Glu	Lys	Tyr	Asp 220	Lys	Ser	Cys	Asp		
55	Met 225	Trp	Ser	Leu	Gly	Val 230	Ile	Met	Tyr	Ile	Leu 235	Leu	Cys	Gly	Phe	Pro 240		
60	Pro	Phe	Tyr	Ser	Asn 245	Thr	Gly	Gln	Ala	Ile 250	Ser	Pro	Gly	Met	Lys 255	Arg		
65	Arg	Ile	Arg	Leu 260	Gly	Gln	Tyr	Gly	Phe 265	Pro	Asn	Pro	Glu	Trp 270	Ser	Glu		
70	Val	Ser	Glu 275	Asp	Ala	Lys	Gln	Leu 280	Ile	Arg	Leu	Leu	Leu 285	Lys	Thr	Asp		
75	Pro	Thr 290	Glu	Arg	Leu	Thr	Ile 295	Thr	Gln	Phe	Met	Asn 300	His	Pro	Trp	Ile		
80	Asn 305	Gln	Ser	Met	Val	Val 310	Pro	Gln	Thr	Pro	Leu 315	His	Thr	Ala	Arg	Val 320		

ES 2 361 808 A1

	Asn	Pro	Thr	Pro 180	Thr	Ile	Arg	Trp	Leu 185	Lys	Asp	Gly	Gln	Ala 190	Phe	His
5	Gly	Glu	Asn 195	Arg	Ile	Gly	Gly	Ile 200	Arg	Leu	Arg	His	Gln 205	His	Trp	Ser
10	Leu	Val 210	Met	Glu	Ser	Val	Val 215	Pro	Ser	Asp	Arg	Gly 220	Thr	Tyr	Thr	Cys
15	Leu 225	Val	Glu	Asn	Ala	Val 230	Gly	Ser	Ile	Arg	Tyr 235	Asn	Tyr	Leu	Leu	Asp 240
20	Val	Leu	Glu	Arg	Ser 245	Pro	His	Arg	Pro	Ile 250	Leu	Gln	Ala	Gly	Leu 255	Pro
25	Ala	Asn	Thr	Thr 260	Ala	Val	Val	Gly	Ser 265	Asp	Val	Glu	Leu	Leu 270	Cys	Lys
30	Val	Tyr	Ser 275	Asp	Ala	Gln	Pro	His 280	Ile	Gln	Trp	Leu	Lys 285	His	Ile	Val
35	Ile	Asn 290	Gly	Ser	Ser	Phe	Gly 295	Ala	Asp	Gly	Phe	Pro 300	Tyr	Val	Gln	Val
40	Leu 305	Lys	Thr	Ala	Asp	Ile 310	Asn	Ser	Ser	Glu	Val 315	Glu	Val	Leu	Tyr	Leu 320
45	Arg	Asn	Val	Ser	Ala 325	Glu	Asp	Ala	Gly	Glu 330	Tyr	Thr	Cys	Leu	Ala 335	Gly
50	Asn	Ser	Ile	Gly 340	Leu	Ser	Tyr	Gln	Ser 345	Ala	Trp	Leu	Thr	Val 350	Leu	Pro
55	Glu	Glu	Asp 355	Pro	Thr	Trp	Thr	Ala 360	Ala	Ala	Pro	Glu	Ala 365	Arg	Tyr	Thr
60	Asp	Ile 370	Ile	Leu	Tyr	Ala	Ser 375	Gly	Ser	Leu	Ala	Leu 380	Ala	Val	Leu	Leu
65	Leu 385	Leu	Ala	Gly	Leu	Tyr 390	Arg	Gly	Gln	Ala	Leu 395	His	Gly	Arg	His	Pro 400
70	Arg	Pro	Pro	Ala	Thr 405	Val	Gln	Lys	Leu	Ser 410	Arg	Phe	Pro	Leu	Ala 415	Arg
75	Gln	Phe	Ser	Leu 420	Glu	Ser	Gly	Ser	Ser 425	Gly	Lys	Ser	Ser	Ser 430	Ser	Leu

ES 2 361 808 A1

Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly
 435 440 445

5

 Leu Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg
 450 455 460

10

 Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln
 465 470 475 480

15

 Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly Met Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln
 485 490 495

20

 Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys
 500 505 510

25

 Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly
 515 520 525

30

 Arg His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly
 530 535

35

 Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Cys Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu
 545 550 555 560

40

 Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly
 565 570 575

45

 Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Val Leu Val Ser Cys
 580 585 590

50

 Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys
 595 600 605

55

 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn
 610 615 620

60

 Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile
 625 630 635 640

65

 Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met
 645 650 655

70

 Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val
 660 665 670

75

 Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser
 675 680 685

80

 Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu
 690 695 700

ES 2 361 808 A1

Gly His Arg Met Asp Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly
 705 710 715 720
 5 Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe
 725 730 735
 10 Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu
 740 745 750
 15 Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly
 755 760 765
 20 Gly Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His
 770 775 780
 25 Asp Pro Leu Pro Leu Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val
 785 790 795 800
 30 Gln Thr
 <210> 5
 <211> 487
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 5
 40 Met Glu Thr Val Gln Leu Arg Asn Pro Pro Arg Arg Gln Leu Lys Lys
 1 5 10 15
 45 Leu Asp Glu Asp Ser Leu Thr Lys Gln Pro Glu Glu Val Phe Asp Val
 20 25 30
 50 Leu Glu Lys Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Ser Val Tyr Lys Ala Ile
 35 40 45
 55 His Lys Glu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ile Lys Gln Val Pro Val Glu
 50 55 60
 60 Ser Asp Leu Gln Glu Ile Ile Lys Glu Ile Ser Ile Met Gln Gln Cys
 65 70 75 80
 65 Asp Ser Pro His Val Val Lys Tyr Tyr Gly Ser Tyr Phe Lys Asn Thr
 85 90 95
 70 Asp Leu Trp Ile Val Met Glu Tyr Cys Gly Ala Gly Ser Val Ser Asp
 100 105 110
 75 Ile Ile Arg Leu Arg Asn Lys Thr Leu Thr Glu Asp Glu Ile Ala Thr

ES 2 361 808 A1

	115		120			125										
5	Ile	Leu 130	Gln	Ser	Thr	Leu	Lys 135	Gly	Leu	Glu	Tyr	Leu 140	His	Phe	Met	Arg
10	Lys 145	Ile	His	Arg	Asp	Ile 150	Lys	Ala	Gly	Asn	Ile 155	Leu	Leu	Asn	Thr	Glu 160
15	Gly	His	Ala	Lys	Leu 165	Ala	Asp	Phe	Gly	Val 170	Ala	Gly	Gln	Leu	Thr 175	Asp
20	Thr	Met	Ala	Lys 180	Arg	Asn	Thr	Val	Ile 185	Gly	Thr	Pro	Phe	Trp 190	Met	Ala
25	Pro	Glu	Val 195	Ile	Gln	Glu	Ile	Gly 200	Tyr	Asn	Cys	Val	Ala 205	Asp	Ile	Trp
30	Ser	Leu 210	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile 215	Glu	Met	Ala	Glu	Gly 220	Lys	Pro	Pro	Tyr
35	Ala 225	Asp	Ile	His	Pro	Met 230	Arg	Ala	Ile	Phe	Met 235	Ile	Pro	Thr	Asn	Pro 240
40	Pro	Pro	Thr	Phe	Arg 245	Lys	Pro	Glu	Leu	Trp 250	Ser	Asp	Asn	Phe	Thr 255	Asp
45	Phe	Val	Lys	Gln 260	Cys	Leu	Val	Lys	Ser 265	Pro	Glu	Gln	Arg	Ala 270	Thr	Ala
50	Thr	Gln	Leu 275	Leu	Gln	His	Pro	Phe 280	Val	Arg	Ser	Ala	Lys 285	Gly	Val	Ser
55	Ile	Leu 290	Arg	Asp	Leu	Ile	Asn 295	Glu	Ala	Met	Asp	Val 300	Lys	Leu	Lys	Arg
60	Gln 305	Glu	Ser	Gln	Gln	Arg 310	Glu	Val	Asp	Gln	Asp 315	Asp	Glu	Glu	Asn	Ser 320
65	Glu	Glu	Asp	Glu	Met 325	Asp	Ser	Gly	Thr	Met 330	Val	Arg	Ala	Val	Gly 335	Asp
70	Glu	Met	Gly	Thr 340	Val	Arg	Val	Ala	Ser 345	Thr	Met	Thr	Asp	Gly 350	Ala	Asn
75	Thr	Met	Ile 355	Glu	His	Asp	Asp	Thr 360	Leu	Pro	Ser	Gln	Leu 365	Gly	Thr	Met
80	Val	Ile 370	Asn	Ala	Glu	Asp	Glu 375	Glu	Glu	Glu	Gly	Thr 380	Met	Lys	Arg	Arg

ES 2 361 808 A1

Asp Glu Thr Met Gln Pro Ala Lys Pro Ser Phe Leu Glu Tyr Phe Glu
 385 390 395 400
 5 Gln Lys Glu Lys Glu Asn Gln Ile Asn Ser Phe Gly Lys Ser Val Pro
 405 410 415
 10 Gly Pro Leu Lys Asn Ser Ser Asp Trp Lys Ile Pro Gln Asp Gly Asp
 420 425 430
 15 Tyr Glu Phe Leu Lys Ser Trp Thr Val Glu Asp Leu Gln Lys Arg Leu
 435 440 445
 20 Leu Ala Leu Asp Pro Met Met Glu Gln Glu Ile Glu Glu Ile Arg Gln
 450 455 460
 25 Lys Tyr Gln Ser Lys Arg Gln Pro Ile Leu Asp Ala Ile Glu Ala Lys
 465 470 475 480
 30 Lys Arg Arg Gln Gln Asn Phe
 485
 <210> 6
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 6
 Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Trp
 1 5 10 15
 40 Pro Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr
 20 25 30
 45 Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg
 35 40 45
 50 Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Ala
 50 55 60
 55 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp
 65 70 75 80
 60 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn
 85 90 95
 65 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg
 100 105 110
 65 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro
 115 120 125

ES 2 361 808 A1

Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu
 130 135 140

5

 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr
 145 150 155 160

10

 Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro
 165 170 175

15

 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu
 180 185 190

20

 Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln
 195 200 205

25

 Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys
 210 215 220

30

 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys
 225 230 235 240

35

 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn
 245 250 255

40

 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
 260 265 270

45

 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys
 275 280 285

50

 His Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp
 290 295 300

55

 Val Pro Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg
 305 310 315 320

60

 Asp Phe Lys Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val
 325 330 335

65

 Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro
 340 345 350

70

 Gly Asp Thr His Gly Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu
 355 360 365

75

 Val Leu Glu Gly Ala Ile Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile
 370 375 380

ES 2 361 808 A1

	Asp 385	Met	Tyr	Ala	Met	Gly 390	Leu	Val	Leu	Trp	Glu 395	Leu	Val	Ser	Arg	Cys 400
5	Lys	Ala	Ala	Asp	Gly 405	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr 410	Met	Leu	Pro	Phe	Glu 415	Glu
10	Glu	Ile	Gly	Gln 420	His	Pro	Ser	Leu	Glu 425	Glu	Leu	Gln	Glu	Val 430	Val	Val
15	His	Lys	Lys 435	Met	Arg	Pro	Thr	Ile 440	Lys	Asp	His	Trp	Leu 445	Lys	His	Pro
20	Gly	Leu 450	Ala	Gln	Leu	Cys	Val 455	Thr	Ile	Glu	Glu	Cys 460	Trp	Asp	His	Asp
25	Ala 465	Glu	Ala	Arg	Leu	Ser 470	Ala	Gly	Cys	Val	Glu 475	Glu	Arg	Val	Ser	Leu 480
30	Ile	Arg	Arg	Ser	Val 485	Asn	Gly	Thr	Thr	Ser 490	Asp	Cys	Leu	Val	Ser 495	Leu
35	Val	Thr	Ser	Val 500	Thr	Asn	Val	Asp	Leu 505	Pro	Pro	Lys	Glu	Ser 510	Ser	Ile
40																
45																
50																
55																
60																
65																



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 200930203

②² Fecha de presentación de la solicitud: 25.05.2009

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤¹ Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	RAN, Y. et al., 'Profiling tumor-associated autoantibodies for the detection of colon cancer.', CLINICAL CANCER RESEARCH, 2008, Vol. 14, No. 9, páginas 2696-2700, ISSN 1078-0432, todo el documento.	1-25
A	EMADUDDIN, M. et al., 'Cell growth, global phosphotyrosine elevation, and c-Met phosphorylation through Src family kinases in colorectal cancer cells.' PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (U S A), 2008, Vol. 105, No. 7, páginas 2358-2362, ISSN: 0027-8424, todo el documento.	1-25
A	SCANLAN, M.J. et al., 'Cancer-related serological recognition of human colon cancer: identification of potential diagnostic and immunotherapeutic targets.', CANCER RESEARCH, 2002, Vol. 62, No. 14, páginas 4041-4047, ISSN: 0008-5472, todo el documento.	1-25
A	HANASH, S.M. et al., 'Mining the plasma proteome for cancer biomarkers.', NATURE, 2008, Vol. 452, No. 7187, páginas 571-579, ISSN: 0028-0836, todo el documento.	1-25
A	WO 2008061104 A2 (INVITROGEN CORP.) 22.05.2008, todo el documento.	1-25
A	WO 2006056766 A2 (ST GEORGE'S ENTERPRISES LTD.) 01.06.2006, todo el documento.	1-25

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
23.05.2011

Examinador
J. Vizán Arroyo

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N, C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, BIOSIS, MEDLINE, EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-25	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RAN, Y. et al., <i>Clin. Cancer Res.</i> , (2008), 14(9): 2696-700	2008
D02	EMADUDDIN, M. et al., <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.</i> , (2008), 105(7): 2358-62	2008
D03	SCANLAN, M.J. et al., <i>Cancer Res.</i> , (2002), 62(14): 4041-7	2002
D04	HANASH, S.M. et al., <i>Nature</i> , (2008), 452(7187): 571-9	
D05	WO 2008061104 A2 (INVITROGEN CORP.)	22.05.2008
D06	WO 2006056766 A2 (ST GEORGE'S ENTERPRISES LTD.)	01.06.2006

En D1-D3 se describen métodos de detección del cáncer colorrectal basados en el análisis de diferentes marcadores serológicos.

D4 se analizan biomarcadores plasmáticos del cáncer.

D5-D6 se describe Pim-1 como un biomarcadores del cáncer de próstata.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. El objeto de las reivindicaciones independientes 1 y 3 consiste en el uso de autoanticuerpos frente a las proteínas PIM-1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B como biomarcadores de cáncer colorrectal y en un método para el diagnóstico, pronóstico o evolución del cáncer colorrectal basado en la detección de autoanticuerpos frente a PIM-1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B. Análogamente, las reivindicaciones 14 y 15 se refieren al uso de los genes PIM-1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B como marcadores de cáncer colorrectal y a un método de diagnóstico, pronóstico o evolución del cáncer colorrectal basado en la detección del producto de la expresión de los genes PIM-1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D1-D6, no se han divulgado ni los usos ni los métodos reivindicados en la solicitud internacional. Además, dichos usos y métodos no se deducen de una manera obvia del estado de la técnica.

1.2. La presente solicitud satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes, pues el objeto de las reivindicaciones 1-25 es nuevo y tiene actividad inventiva de acuerdo con los Arts. 6.1. y 8.1. de la Ley de Patentes.