(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 436 667**

(21) Número de solicitud: 201330977

(51) Int. CI.:

G01N 33/52 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A2

(22) Fecha de presentación:

28.06.2013

(30) Prioridad:

28.06.2012 EP 12382257

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

03.01.2014

(71) Solicitantes:

FUNDACIÓ INSTITUT D'INVESTIGACIÓ BIOMÈDICA DE BELLVITGE (IDIBELL) (33.3%)
Hospital Duran i Reynals 3ª planta, Gran Vía de l'Hospitalet, 199
08908 L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona) ES;
INSTITUT CATALÀ D'ONCOLOGIA (33.3%) y
UNIVERSITAT DE BARCELONA (33.3%)

(72) Inventor/es:

MORENO AGUADO, Victor ;
CROUS BOU, Marta ;
SOLÉ ACHA, Xavier ;
CORDERO ROMERA, David ;
BERENGUER LLERGO, Antoni ;
GUINÓ DOMÉNECH, Elisabeth y
SANZ PAMPLONA, Rebeca

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

(54) Título: **SUERO BIOMARCADOR PARA DIAGNOSTICAR EL CÁNCER COLORRECTAL**

(57) Resumen:

Suero biomarcador para diagnosticar el cáncer colorrectal.

La presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de cáncer colorrectal en un sujeto utilizando un nuevo biomarcador basado en una proteína en suero. Dicho método comprende determinar el nivel de proteína de COL10A1 en un biofluido. Además, la presente invención se refiere a la evaluación de una terapia de cáncer colorrectal mediante dicho biomarcador, un método para la identificación de una terapia útil en el tratamiento de cáncer colorrectal cáncer utilizando dicho biomarcador, el uso de un anticuerpo a dicho biomarcador y kits para todos estos aspectos.

ES 2 436 667 A2

DESCRIPCIÓN

SUERO BIOMARCADOR PARA DIAGNOSTICAR EL CÁNCER COLORRECTAL

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere al diagnóstico de cáncer colorrectal utilizando un nuevo biomarcador de cáncer colorrectal basado en una proteína sérica. Además, se refiere a la evaluación de una terapia de cáncer colorrectal utilizando dicho biomarcador, un método para identificar una terapia útil en el tratamiento del cáncer colorrectal utilizando dicho biomarcador, el uso de un anticuerpo para dicho biomarcador y kits para todos estos aspectos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer colorrectal (CCR), conocido comúnmente como el cáncer de intestino grueso, es la tercera neoplasia maligna más común en el mundo y representa aproximadamente el diez por ciento de la incidencia mundial de cáncer. Es causado por un crecimiento celular descontrolado (neoplasia), en el colon, el recto o el apéndice vermiforme. Los cánceres colorrectales comienzan en el epitelio del intestino grueso. Si se deja sin tratamiento, pueden crecer invadiendo las capas musculares y luego atravesar la pared intestinal. La mayoría de ellos comienzan como un pequeño tumor en la pared del intestino: un pólipo o adenoma colorrectal. Estos son usualmente benignos, pero algunos se convierten en cáncer con el tiempo.

La posibilidad de sobrevivir al CCR está estrechamente relacionada con el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico; cuanto antes se realiza el diagnóstico, mayor es la probabilidad de supervivencia. Por ejemplo, hay una probabilidad de menos del 20% de supervivencia a 5 años cuando se diagnostica tarde y ya ha producido metástasis (estadio IV), mientras que la probabilidad de supervivencia es superior al 90% a 5 años cuando se diagnostica temprano (estadio I). Los pacientes con CCR se benefician enormemente de la detección precoz, debido a la efectividad del tratamiento quirúrgico temprano.

Los procedimientos más comunes para la detección precoz del CCR disponibles en la actualidad son (i) el análisis de sangre oculta en heces (SOH), que se basa en la suposición de que los cánceres sangran, y por lo tanto la sangre puede ser detectada en las heces utilizando ensayos químicos o inmunológicos; por lo general debe existir un tumor de tamaño significativo antes de que se detecte sangre en heces, (ii) los métodos de imagen como la colonoscopia virtual, y (iii) los métodos invasivos que identifican anomalías graves, como la sigmoidoscopia o la colonoscopia.

La sangre oculta en heces es la prueba clínicamente útil más extendida que se usa para el diagnóstico del CCR y consiste, bien en una prueba de la actividad peroxidasa del grupo hemo de la hemoglobina (la prueba del guayaco) o bien en un anticuerpo específico para detectar la hemoglobina (test inmunológico). Sin embargo, esta técnica de cribado sufre de un cierto número de desventajas: El principal inconveniente es su sensibilidad mediocre de aproximadamente 50%, con sólo un 20% de sensibilidad para los adenomas (que, si son de tamaño grande, se traducirá en el desarrollo de cáncer en un caso de cada 10), debido al hecho de que no todos los adenomas y CCR sangran. La prueba tampoco es muy específica, pues la aparición de sangre en las heces puede estar relacionada con una enfermedad no tumoral (por ejemplo, colitis ulcerosa, hemorroides, fístulas, etc.). Por tanto, tras un resultado positivo para el análisis de SOH se debe realizar una colonoscopia, con los inconvenientes descritos más adelante.

La colonografía por tomografía computarizada (CTC) o colonoscopia virtual, es una técnica no invasiva reciente para obtener imágenes del colon. Las características de rendimiento de la prueba varían considerablemente según los estudios (con una especificidad que oscila entre el 39% y el 94%), debido principalmente a las diferencias tecnológicas en la preparación del paciente y el hardware y el software utilizado para el análisis. Otras limitaciones de la CTC son altas tasas de falsos positivos, la incapacidad para detectar los adenomas planos, no hay capacidad para extirpar los pólipos, las dosis de radiación repetitivas y acumuladas, y el costo.

Los métodos invasivos para la identificación de anomalías graves incluyen la sigmoidoscopia y la colonoscopia. La colonoscopía es generalmente el método preferido para el cribado en individuos de riesgo elevado y en mayores de 50 años que tengan un historial de pólipos adenomatosos o CCR previo, u otras enfermedades

predisponentes, como la enfermedad inflamatoria intestinal. Aunque la colonoscopia sigue siendo la prueba estándar para determinar la presencia o ausencia de pólipos y CCR, se puede perder hasta un 15% de las lesiones de >1 cm de diámetro. Las complicaciones de la colonoscopia puede incluir perforación, hemorragia, depresión respiratoria, arritmias, y la infección. Aproximadamente uno de cada 1.000 pacientes sufre perforaciones y tres en 1000 hemorragia. Como resultado del procedimiento pueden darse entre una y tres muertes cada 10.000 pruebas. Otros inconvenientes son la falta de personal capacitado para realizar colonoscopias, el malestar del paciente, el alto costo y el bajo nivel de aceptabilidad (alrededor del 20%), lo que hace improbable que la colonoscopia se convierta en un método sistemático de cribado del CCR en la población general. La mayoría de los CCR esporádicos se cree que se desarrollan a partir de adenomas benignos, de los cuales sólo un pequeño número van a desarrollar a la malignidad. Teniendo en cuenta que el plazo para la transformación maligna de un adenoma benigno es de cinco a diez años, la detección de adenomas en toda la población en general por medio de colonoscopia requeriría un tratamiento excesivo de los pacientes, tratamiento que sería a la vez costoso y potencialmente dañino. El papel de la colonoscopia es el de prueba confirmatoria y terapéutica después de un resultado de SOH positivo, pues ésta última tiene un 60% de tasa de falsos positivos.

En la actualidad no hay ninguna prueba serológica de cribado para el diagnóstico precoz del CCR. Warren et al (BMC Med 9 (2011) 133) han descrito recientemente la metilación del gen Septina 9 como un análisis de sangre sensible y específico para el cáncer colorrectal. Aunque existe una prueba comercial, ésta no se utiliza rutinariamente para el cribado, pues esta prueba requiere la extracción de ADN y el análisis de la metilación, que es más difícil y caro que una prueba serológica.

En los últimos años se han identificado una gran cantidad de los llamados “genes específicos del CCR”. La gran mayoría de los trabajos de investigación correspondientes o solicitudes de patentes se basan en datos obtenidos mediante el análisis de los perfiles de expresión de ARN del tejido tumoral de cáncer de colon en comparación con el tejido normal adyacente o tejido sano del colon. Sin embargo, las diferencias observadas en el ARNm no se reflejan necesariamente en diferencias en las proteínas correspondientes. Una proteína codificada por un ARNm raro se puede encontrar en cantidades muy altas y una proteína codificada por un ARNm abundante,

sin embargo, puede ser difícil de detectar o no encontrar en absoluto. Esta falta de correlación entre los niveles de ARNm y los niveles de proteína es debida a diversos nitivos, como la estabilidad del ARNm, la eficiencia de la traducción, la estabilidad de la proteína, etc.

También hay enfoques recientes que investigan las diferencias en los patrones de proteínas entre los diferentes tejidos o entre tejidos sanos y enfermos con el fin de identificar moléculas candidatas a biomarcadores que puedan ser utilizadas en el diagnóstico precoz del CCR. Bruenagel et al. Bruenagel et al. (Cancer Research 62 (2002) 2437-2442), han identificado siete proteínas de la matriz nuclear que parecen ser más abundantes en el tejido tumoral del CCR, en comparación con el tejido normal adyacente. Además, el documento WO 2010/061996 A1 describe distintos biomarcadores proteicos, algunos de los cuales se puede detectar en el suero de pacientes con CCR.

Sin embargo, a pesar de que se han propuesto varios candidatos a biomarcadores proteicos, hasta la fecha no se ha demostrado su utilidad para la clínica o el diagnóstico. Idealmente, un nuevo biomarcador diagnóstico también debería proporcionar un progreso en la sensibilidad y/o especificidad para el diagnóstico, si se utiliza solo o en combinación con uno o más de otros marcadores, en comparación con los métodos de diagnóstico utilizados actualmente. En la actualidad, por ejemplo, las pruebas de diagnóstico de la sangre basados en la detección de antígeno carcinoembrionario (CEA) están disponibles para ayudar diagnóstico en el campo del CCR. Sin embargo, el CEA se utiliza principalmente para el seguimiento y no puede ser utilizado para la detección precoz de CCR porque su sensibilidad y su especificidad son insuficientes. Esto se debe a que este marcador se expresa por otros tipos de cáncer, y en patologías benignas. A pesar de todo, es posible aumentar la sensibilidad sin perder especificidad mediante la combinación del CEA con otro marcador tumoral.

La identificación de biomarcadores específicos en el suero humano para el diagnóstico precoz del CCR o para la evaluación de la terapia del CCR podría ser muy beneficiosa para la evaluación del riesgo de CCR, la prevención y/o su tratamiento. Una prueba diseñada para medir estos biomarcadores podría ser ampliamente aceptada por la población en general, ya que sería mínimamente invasiva y podría ser usada para evaluar la probabilidad de que el individuo padezca la enfermedad antes de ser

diagnosticada clinicamente como prueba de cribado sola, o en combinación con otros métodos de detección convencionales.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico del cáncer colorrectal, que comprende la determinación del nivel de proteína COL10A1 en un biofluido de un sujeto, en el que un aumento del nivel de proteína COL10A1 es indicativo de cáncer colorrectal.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para controlar el efecto de una terapia en al menos un paciente que sufre de cáncer colorrectal, que comprende

(I) determinar el nivel de proteína COL10A1 en un biofluido de dicho paciente, y

(II) comparar dicho nivel de proteína COL10A1 con al menos un nivel de proteína COL10A1 en dicho biofluido de dicho paciente determinado al comienzo de la terapia y/o determinado previamente durante dicho tratamiento,

en donde un estancamiento y/o una disminución del nivel de proteína COL10A1 en dicho paciente indica un efecto positivo de dicha terapia.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la identificación de una terapia útil para el cáncer colorrectal, que comprende

i. determinar el nivel de proteína COL10A1 en un biofluido de al menos un paciente que sufre cáncer colorrectal y que está siendo tratado con una terapia candidato, y

ii. comparar el nivel de proteína COL10A1 determinado en la etapa (i) con al menos un valor de referencia para dicho nivel de proteína COL10A1 en el que un estancamiento y/o una disminución del nivel de proteína COL10A1 en el biofluido con respecto al valor de referencia indica que la terapia candidata es útil para tratar el cáncer colorrectal

en el que dicho valor de referencia se selecciona del grupo de los niveles de expresión de la proteína COL10A1 en el biofluido de dicho paciente determinado al comienzo de

la terapia, los niveles de expresión de proteína COL10A1 en el biofluido de dicho paciente determinado previamente durante dicho tratamiento y el nivel de proteína COL10A1 en el biofluido de al menos un paciente de control no tratado con dicha terapia candidata.

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere al uso de un anticuerpo proteína COL10A1 para el diagnóstico de cáncer colorrectal, para monitorizar el efecto de un tratamiento en un paciente que sufre de cáncer colorrectal o para la identificación de una terapia para el cáncer colorrectal.

En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende medios para llevar a cabo uno o más métodos de cualquiera de los aspectos anteriores.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: niveles de expresión de ARN de COL10A1 en tumor de colon (T, muestra derecha, n = 100), la mucosa normal de pacientes con cáncer (N, muestra central, n = 100) y en la mucosa normal de los individuos sanos (M, muestra izquierda, n = 50).

Figura 2: concentración de proteína COL10A1 en suero de pacientes con CCR (caso n = 16) e individuos sanos (control, n = 16).

Figura 3: valores de concentración de COL11A1 en suero en pacientes con CCR y en individuos sanos, con duplicados (16 casos duplicados, N = 32)

Figura 4: valores de la concentración sérica de COL10A1 según el estadío tumoral en el momento del diagnóstico del cáncer.

Figura 5: curva ROC de COL10A1 en suero .

Figura 6: valor de significación pronóstica de los niveles de expresión de ARN de COL10A1 en pacientes con cáncer de colon (n = 100).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han descubierto un nuevo marcador tumoral, a saber, el colágeno tipo X alfa 1 (COL10A1), que es liberado por tumores CCR fuera de los tejidos cancerosos y es característico de estos tumores, tal que puede ser detectado en biofluidos alejados de los tumores. COL10A1 es uno de los 28 tipos de colágeno, que

han sido identificados hasta ahora. Los diferentes tipos de colágeno varían significativamente en su estructura, función, lugar de expresión e importancia para la enfermedad. COL10A1 es un colágeno de cadena corta expresado por los condrocitos hipertróficos durante la osificación endocondral y está implicado en enfermedades tales como, por ejemplo, la displasia metafisaria de Schmid. Sin embargo, hasta ahora era desconocido que la proteína COL10A1 puede ser utilizada como un marcador en tejidos no tumorales tal como biofluidos para diagnosticar el CCR. Además, los inventores han encontrado sorprendentemente que COL10A1 tiene una sensibilidad y especificidad para el diagnóstico del CCR que supera la de los métodos convencionales, así como la de otros biomarcadores para el diagnóstico CCR.

Método de diagnóstico de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico del cáncer colorrectal, que comprende la determinación del nivel de proteína COL10A1 en un biofluido de un sujeto, en el que un aumento del nivel de proteína COL10A1 es indicativo de cáncer colorrectal.

El término "diagnóstico" como se usa aquí se refiere tanto al proceso de tratar de determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir, el procedimiento de diagnóstico, y la opinión alcanzada por este proceso, es decir, la opinión de diagnóstico. Como tal, también puede ser considerado como un intento de clasificación de la condición de un individuo en categorías separadas y distintas que permiten decisiones médicas sobre el tratamiento y el pronóstico a realizar.

El término "cáncer colorrectal" (CCR) se utiliza en el sentido más amplio y se refiere a (1) todas los estadios y todas las formas de cáncer derivado de las células epiteliales del intestino grueso y/o el recto y/o (2) todos los estadios y todas las formas de cáncer que afecta el revestimiento del intestino grueso y/o el recto. El término "cáncer colorrectal", como se usa aquí, también incluye los adenomas. En los sistemas de clasificación utilizados para la clasificación del cáncer de colon y recto, el colon y el recto son tratados como un solo órgano.

El término "sujeto", como se usa aquí, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se limita a, los animales domésticos y

de granja, los primates y los seres humanos, por ejemplo, seres humanos, los primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el paciente es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza Un sujeto puede o puede no tener o padecer de CCR. En otras palabras, no se sabe si el sujeto tiene o padece de CCR.

En una realización preferida de la invención, dicho cáncer colorrectal (CCR) es el cáncer de colon, cáncer rectal y/o cáncer del apéndice vermiforme. En otra realización de la invención, el cáncer colorrectal está en estadio 0, estadio I, estadio II, estadio III y/o estadio IV del cáncer colorrectal. Los estadios a que se refiere en este documento corresponden a la convención de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) para el estadiaje del CCR, si bien otros métodos de estadiaje, como el de Dukes y el de Astler-Coller, se puede utilizar igualmente.

"Estadio 0" se refiere al cáncer en la etapa más temprana. No ha crecido más allá de la capa interna (mucosa) del colon o del recto. Este estadio también se conoce como *carcinoma in situ* o *carcinoma intramucoso.*

"Estadio I" se refiere al cáncer que ha crecido a través de la muscularis mucosa hasta la submucosa *o* también después de haber crecido dentro de la muscular propia. No se ha diseminado a los ganglios linfáticos o sitios distantes.

"Estadio II", incluyendo sub-estadios A, B y C se refiere al cáncer (A) que ha crecido por las capas más externas del colon o del recto, pero no ha pasado por ellas, no ha llegado a los órganos cercanos y aún no se ha extendido a los ganglios linfáticos cercanos o lugares distantes, (B) que ha crecido a través de la pared del colon o el recto, pero no ha crecido hasta alcanzar otros tejidos u órganos adyacentes, aún no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o lugares distantes, y/o (C) ha crecido a través de la pared del colon o del recto y se une o se ha convertido en otros tejidos u órganos adyacentes, aún no se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o lugares distantes.

"Estadio III", incluyendo sub-estadios A, B y C se refiere a lo siguiente: (A) Al menos se da una de las siguientes condiciones: (i) El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa y también puede haber crecido en el muscular propia. Se ha diseminado a 1 a 3 ganglios linfáticos cercanos o en las áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos pero no a los propios ganglios. No se ha propagado a lugares

distantes. (ii) El cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa. Se ha diseminado a 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. No se ha propagado a lugares distantes. (B) Al menos se da uno de los siguientes casos: (i) El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto a través del peritoneo visceral, pero no ha llegado a los órganos cercanos. Se ha diseminado a 1 a 3 ganglios linfáticos cercanos o en las áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos pero no a los propios ganglios. No se ha propagado a lugares distantes. (ii) El cáncer ha crecido hacia la capa muscular propia o en las capas más externas del colon o del recto. Se ha diseminado a 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. No se ha propagado a lugares distantes. (iii) el cáncer ha crecido a través de la mucosa hasta la submucosa o también puede haber crecido en la muscular propia. Se ha propagado a 7 o más ganglios linfáticos cercanos. No se ha propagado a lugares distantes. (C) Al menos se da uno de los siguientes casos: (i) El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto (incluyendo el peritoneo visceral), pero no ha llegado a los órganos cercanos. Se ha diseminado a 4 a 6 ganglios linfáticos cercanos. No se ha propagado a lugares distantes. (ii) El cáncer ha crecido hacia las capas más externas del colon o del recto oa través del peritoneo visceral, pero no ha llegado a los órganos cercanosSe ha propagado a 7 o más ganglios linfáticos cercanos. No se ha propagado a lugares distantes. (iii) El cáncer ha crecido a través de la pared del colon o del recto y se une o se ha convertido en otros tejidos u órganos adyacentes. Se ha propagado a al menos uno de los ganglios linfáticos cercanos o en las áreas de grasa cerca de los ganglios linfáticos. No se ha propagado a lugares distantes.

"Estadio IV", incluyendo sub-estadios A y B se refiere a lo siguiente: (A) El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto, y puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos cercanos. Se ha diseminado a un órgano distante (como el hígado o el pulmón) o a un grupo de ganglios linfáticos. (B) El cáncer puede o no haber crecido a través de la pared del colon o del recto, y puede o no haberse propagado a los ganglios linfáticos cercanos. Se ha propagado a más de un órgano distante (como el hígado o el pulmón) o grupo de ganglios linfáticos o se ha propagado a partes distantes del peritoneo (el revestimiento de la cavidad abdominal).

El término "COL10A1" o "proteína COL10A1", como se usa aquí, se refiere a una proteína que es codificada por el gen humano *COL10A1* u ortologos del mismo. En una realización preferida de la invención, es el COL10A1 humano (RefSeq NP_000484

en la base de datos NCBI, la versión de 22 de octubre 2011). En una realización más preferida, el COL10A1 carece de las secuencias señal (aminoácidos 1 a 18 en el polipéptido mostrado en la base de datos NCBI bajo el número de NP_000484). Dentro del alcance de este término, sin embargo, se incluyen también las variantes de esta proteína, donde dichas variantes tienen una secuencia que es al menos el 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% o preferiblemente al menos 99% idénticas a la COL10A1 humana o sus ortologas. Las variantes preferidas son las variantes de origen natural, especialmente las variantes que se correlacionan con una predisposición al CCR. Además, el término "COL10A1" se refiere también a fragmentos de la COL10A1 que pueden aparecer en el biofluido, la concentración de los cuales en el biofluido pueda ser tan informativa con respecto a la presencia de CCR como el COL10A1 de longitud completa. Los fragmentos adecuados de COL10A1 que pueden aparecer en un biofluido y sean adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, los fragmentos de al menos 50 aminoácidos, al menos 100 aminoácidos, al menos 150 aminoácidos, al menos 200 aminoácidos, al menos 250 aminoácidos, al menos 300 aminoácidos, al menos 350 aminoácidos, al menos 400 aminoácidos, al menos 450 aminoácidos, al menos 500 aminoácidos, al menos 550 aminoácidos, al menos 600 aminoácidos, al menos 650 aminoácidos.

Los niveles de proteína COL10A1 pueden ser determinados por una plétora de técnicas de medición de proteínas conocidas y descritas suficientemente en la técnica. En una realización preferida, el nivel de la proteína COL10A1 se determinó empleando una técnica de medición de proteína seleccionada entre el grupo formado por ELISA, Western Blot, dot Blot, inmunocromatografía, ensayo Luminex, espectrometría de masas, MALDI-TOF, SELDI TOF-u otras técnicas proteómicas y combinaciones de las mismas.

Ejemplos de ELISA incluyen el ELISA directo, utilizando un anticuerpo marcado que reconoce un antígeno inmovilizado sobre un soporte sólido; ELISA indirecto, utilizando un anticuerpo marcado que reconoce un anticuerpo de captura para formar complejos con un antígeno inmovilizado sobre un soporte sólido; ELISA sandwich directo, utilizando un anticuerpo marcado que reconoce un antígeno unido a un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido; y ELISA sandwich indirecto, en el que un antígeno capturado unido a un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido

se detecta por adición en primer lugar de un anticuerpo específico para el antígeno y, a continuación de un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo específico del antígeno. Más preferiblemente, los niveles de expresión de proteínas son detectados por ELISA sandwich, donde una muestra reacciona con un anticuerpo inmovilizado sobre un soporte sólido, y los resultantes complejos antígeno-anticuerpo se detectan mediante la adición de un anticuerpo marcado específico para el antígeno, seguido por un desarrollo enzimático, o añadiendo en primer lugar un anticuerpo específico para el antígeno y luego un anticuerpo secundario marcado que se une al anticuerpo específico para el antígeno, seguido por el desarrollo enzimático. La información necesaria para el diagnóstico del CCR puede ser proporcionada por la medición del grado de formación de complejos de una proteína biomarcador CCR y un mismo anticuerpo.

Además, la medición de los niveles de expresión de la proteína se consigue preferiblemente mediante transferencia Western utilizando uno o más anticuerpos. Además, la medición de los niveles de expresión de la proteína se realiza preferiblemente por inmunocromatografía. Además, la medición de los niveles de expresión de la proteína puede llevarse a cabo con un ensayo de Luminex.

El anticuerpo para ser utilizado con la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal, policlonal o recombinante, que tiene una alta especificidad y afinidad para cada proteína marcadora y raramente tiene o no tiene reactividad cruzada con otras proteínas.

El término "biofluido" es un fluido biológico y se refiere a un fluido acuoso de origen biológico. Se puede obtener de cualquier localización (tales como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, el humor vítreo o acuoso, o cualquier secreción corporal).

En una realización preferida de la invención, el biofluido es sangre, plasma o suero. En una realización más preferida, es suero.

El objeto del método de acuerdo con el primer aspecto es un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente humano. El sujeto puede o no tener CCR. En una realización preferida, no se sabe si el sujeto tiene CCR. Además, el sujeto puede ser saludable o no con respecto a otras enfermedades. En una realización, el sujeto es un sujeto con al menos un (o al menos 3, o al menos 5) factor de riesgo de CCR. "Los factores de riesgo de CCR" son cualquier factor no modificable o los

factores ambientales de riesgo de CCR. En una realización preferida, los factores de riesgo no modificables de CCR se seleccionan del grupo que consiste de edad elevada (por ejemplo, al menos 40 años, al menos 50 años, al menos 60 años o al menos 70), antecedentes personales de pólipos adenomatosos, antecedentes personales de enfermedad inflamatoria intestinal, antecedentes familiares de cáncer colorrectal o pólipos adenomatosos y el riesgo genético hereditario. En otra realización preferida, los factores ambientales de riesgo de CCR se seleccionan del grupo formado por prácticas nutricionales predisponentes al CCR, escasa actividad física, la obesidad, el tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol. Más información sobre los factores de riesgo de CCR se presentan en Haggar y Boushey et al., Clin Colon Rectal Surg. 2009; 22(4): 191–197.

Un nivel de proteína COL10A1 se considera aumentado si el nivel se incrementa en comparación con una referencia que es indicativa de cáncer colorrectal al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25 %, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100%, al menos 110%, al menos 120%, al menos 130%, al menos 140%, o al menos 150%.

En una realización preferida de la invención, un incremento de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, o al menos 50% en comparación con una referencia que es indicativa de cáncer colorrectal. Dicho valor de referencia puede ser cualquier valor estadístico derivado de los niveles de COL10A1 en un biofluido derivado de un grupo de sujetos que no tienen cáncer colorrectal y, preferiblemente, que no tengan un historial de cáncer colorrectal. En una realización preferida, dicha referencia es el nivel de media o mediana de la proteína COL10A1 en un biofluido en un grupo de sujetos que no tienen cáncer colorrectal. Dicho grupo de sujetos comprende al menos 3, al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 30 o al menos 50 sujetos que no tengan cáncer colorrectal.

Como se indicó anteriormente, el método del primer aspecto es superior a los métodos convencionales para el diagnóstico CCR así como los métodos que utilizan otros biomarcadores para el diagnóstico CCR con respecto a la evaluación establecida para métodos de diagnóstico, tales como la sensibilidad o especificidad.

En una realización preferida, el método del primer aspecto se caracteriza por tener una sensibilidad de al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 93%. El término "sensibilidad" al que se refiere este documento corresponde a la capacidad del método para identificar resultados positivos. Mide la proporción de positivos reales que se han identificado correctamente como positivos tales, es decir, verdaderos. Se calcula dividiendo el número de verdaderos positivos por la suma de verdaderos positivos y falsos negativos.

En otra realización preferida, el método del primer aspecto se caracteriza por tener una especificidad de al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, o al menos 88%. El término "especificidad" al que se refiere este documento corresponde a la capacidad del método para identificar los resultados negativos. Mide el número de resultados negativos que se han identificado correctamente, es decir, verdaderos negativos. Se calcula dividiendo el número de verdaderos negativos por la suma de verdaderos negativos y falsos positivos.

En otra realización preferida, el método del primer aspecto se caracteriza por tener un valor predictivo positivo de al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos el 85%, o al menos 87%. El término "valor predictivo positivo", como se menciona en este documento, también conocida como tasa de precisión, es la proporción de sujetos con resultados positivos a la prueba que se diagnostican correctamente. Se calcula dividiendo el número de verdaderos positivos por la suma de positivos verdaderos y falsos positivos.

En otra realización preferida, el método del primer aspecto se caracteriza por tener un valor predictivo negativo de al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos el 90%, o al menos 93%. El término "valor predictivo negativo", como se menciona en este documento, es la proporción de sujetos con un resultado negativo que se diagnostican correctamente. Se calcula dividiendo el número de verdaderos negativos por la suma de verdaderos negativos y falsos negativos.

En otra realización preferida, el método del primer aspecto se caracteriza por tener un área bajo la curva (AUC) de la característica operativa del receptor (ROC) de al menos 0,75, al menos 0,80, al menos 0,85, al menos 0,90 o menos 0,93. Una curva ROC

es una representación gráfica de la sensibilidad, o tasa de verdaderos positivos, frente a tasa de falsos positivos (1 - especificidad o 1 - tasa de verdaderos negativos), para un sistema clasificador binario mientras se varia su umbral de discriminación. la curva ROC también puede ser representada de manera equivalente por el trazado de la fracción de verdaderos positivos de los positivos (TVP = tasa de verdaderos positivos) frente a la fracción de falsos positivos entre los negativos (TFP = tasa de falsos positivos). La precisión de una prueba diagnóstica depende de lo bien que la prueba separa el grupo está probando en personas con y sin la enfermedad en cuestión. La precisión se mide por el área bajo la curva ROC. El área bajo la curva ROC especifica la probabilidad de que, cuando se elige un ejemplo positivo y uno negativo al azar, la función de decisión asigne un valor superior al positivo que al negativo. Un área de 1 representa una prueba perfecta, un área de 0,5 representa una prueba sin valor. Una guía general para la clasificación de la exactitud de una prueba diagnóstica es el sistema tradicional de putuación académica: 0,90 a 1 = excelente (A), 0.80-0.90 = buena (B), 0.70-0.80 = regular (C), 0.60-0.70 = pobre (D), 0.50-0.60 = suspenso (F). En consecuencia, la prueba de diagnóstico de la invención se clasifica como excelente, con una AUC de 0.938 (ver Figura 4). Otros parámetros adecuados para evaluar la calidad de los biomarcadores incluyen, sin limitación, la sensibilidad y especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo exactitud y precisión.

En una realización preferida del método del primer aspecto, dicho método comprende además la determinación de uno o más marcadores seleccionados del grupo que consiste de CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD1L, IL-1b, SRPX2 , SLCO4A1, TESC, y/o IL-23a. En una realización aún más preferida, un aumento de los niveles o uno o más de dichos biomarcadores CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD1L, IL-1b, SRPX2, SLCO4A1, TESC es indicativo de cáncer colorrectal.

La proteína CEA (antígeno carcinoembrionario) es una glicoproteína implicada en la adhesión celular. En una realización preferida, el término "CEA" se refiere a CEA humana (NCBI Secuencia de Referencia: NP_004354.2).

La proteína TCN (transcobalamina-1) es una glicoproteína producida por las glándulas salivales de la cavidad oral, en respuesta a la ingestión de alimentos. En una

realización preferida, el término "TCN" se refiere a TCN humana (Secuencia NCBI Referencia: NP_001053.2).

La proteína SULT2B1 (miembro de la familia sulfotransferasa citosólica 2B 1) es catalizadora de la conjugación de sulfato de hormonas, neurotransmisores, fármacos y compuestos xenobióticos químicos. En una realización preferida, el término "SULT2B1" se refiere a SULT2B1 humana (Secuencia NCBI Referencia: NP_004596.2).

La proteína ALDOB (aldolasa B) también conocida como fructosa bifosfato aldolasa B, o aldolasa de tipo hepática es uno de los tres isoenzimas (A, B y C) de la enzima fructosa 1,6-bifosfato aldolasa clase I (CE 4.1.2.13), y desempeña un papel clave tanto en la glucólisis y la gluconeogénesis. En una realización preferida, el término "ALDOB" se refiere a ALDOB humana (Secuencia NCBI Referencia: NP_000026.2).

La proteína COL11A1 (colágeno alfa-1 (XI) de la cadena) es un colágeno fibrilar menor. En una realización preferida, el término "COL11A1" se refiere a COL11A1 humana (GenBank: AAI17698.1).

La proteína PI3 (inhibidor de la peptidasa 3) contiene dominio de tipo WAP de núcleo con cuatro disulfuros (WFDC). En una realización preferida, el término "PI3" se refiere a PI3 humana (NCBI Secuencia de Referencia: NP_002629.1).

La proteína CCL20 (quimioquinas (motivo CC) ligando 20) es una citoquina pequeña perteneciente a la familia de quimioquinas CC y es muy quimiotactica para linfocitos y atrae débilmente a neutrófilos. En una realización preferida, el término "CCL20" se refiere a CCL20 humana (Secuencia NCBI Referencia: NP_001123518.1).

La proteína MTHFD1L (metilentetrahidrofolato deshidrogenasa (NADP + dependiente) 1-al igual que) es una enzima implicada en la síntesis de THF en la mitocondria. En una realización preferida, el término "MTHFD1L" se refiere a MTHFD1L humana (GenBank: CAI95775.1).

La proteína IL-1b (IL-1 beta) es un importante mediador de la respuesta inflamatoria, y está involucrado en una variedad de actividades celulares, incluyendo la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. En una realización preferida, el término "IL-1b" se refiere a la IL-1b humana (Secuencia NCBI Referencia: NP_000567.1).

La proteína SRPX2 (Sushi repetir que contienen proteínas SRPX2) es una peroxirredoxina putativa. En una realización preferida, el término "SRPX2" se refiere a SRPX2 humana (NCBI Secuencia de Referencia: NP_055282.1).

La proteína SLCO4A1 (transportadores de solutos orgánicos de la familia transportador de aniones, mernber 4A1) tiene la función del transporte independiente Na + de aniones orgánicos tales como la hormona tiroidea T3. En una realización preferida, el término "SLCO4A1" se refiere a SLCO4A1 humanA (Secuencia NCBI Referencia: NP_057438.3).

La proteína TESC (tescalcin) es una proteína que liga el calcio vinculada a la regulación del intercambiador 1 de Na+ / H+. En una realización preferida, el término "TESC" se refiere a TESC humana (GenBank: AAL35615.1).

La proteína IL-23a (interleuquina-23 subunidad alfa) es una parte importante de la respuesta inflamatoria contra la infección. Promueve la regulación positiva de la metaloproteasa matriz MMP9, aumenta la angiogénesis y reduce la infiltración de células T CD8+. En una realización preferida, el término "IL-23a" se refiere a la IL-23a humana (Secuencia NCBI Referencia: NP_057668.1).

En otra realización preferida del método del primer aspecto, dicho método comprende además uno o más medios de diagnóstico seleccionados del grupo formado por examen rectal digital, prueba de sangre oculta en heces, sigmoidoscopia, colonoscopia, colonografía, examen de imagen (por ejemplo, rayos X, ecografía, tomografía computarizada o una resonancia magnética).

En otra realización preferida del primer método de la invención, el método comprende además la determinación de la presencia de sangre en las heces, en donde la presencia de sangre en las heces es indicativo de la presencia de cáncer colorrectal

Son medios adecuados para determinar la presencia de sangre en las heces, sin limitación, la prueba de sangre oculta en heces (SOH), también llamada prueba de gauayaco o Hemoccult, como se describe en las patentes US 3,996,006 y 4,333,734 y 4,071,317. Esta prueba utiliza indicadores químicos o inmunológicos para detectar la presencia de sangre en muestras de heces.

Método para monitorizar el efecto de una terapia

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para ssupervisar el efecto de una terapia en al menos un paciente que sufre de cáncer colorrectal, que comprende

i. determinar el nivel de proteína COL10A1 en un biofluido de dicho paciente, y

ii. comparar dicho nivel de proteína COL10A1 con al menos un nivel de proteína COL10A1 en dicho biofluido de dicho paciente determinado al comienzo de la terapia y/o determinado previamente durante dicho tratamiento,

en donde un estancamiento y/o una disminución del nivel de proteína COL10A1 en dicho paciente indica un efecto positivo de dicha terapia.

El término "terapia" o "tratamiento", como se usa aquí, se refiere a la recuperación tentativa de un problema de salud, por lo general después de un diagnóstico. Como tal, no es necesariamente una cura, es decir, una reversión completa de una enfermedad. Dicha terapia puede tener o no se sabe si tiene un efecto positivo sobre el CCR o, en otras palabras, para ser útil para tratar el CCR. Las terapias incluyen, sin limitación, cirugía, radioterapia, quimioterapia o terapias dirigidas (por ejemplo, el uso de anticuerpos) y la elección de una terapia o una combinación de terapias depende, por ejemplo, en el estadio del cáncer, si el cáncer ha recurrido y el estado de salud general del paciente.

El término "cirugía", como se usa aquí, significa cualquier procedimiento terapéutico que implica una acción metódica de la mano o de la mano con un instrumento, en el cuerpo de un humano u otro mamífero, para producir un efecto curativo o de recuperación.

El término "radioterapia" se refiere a varios tipos de terapia de radiación, incluyendo terapias de radiación interna y externa o radioinmunoterapia, y el uso de diversos tipos de radiaciones como los rayos X, rayos gamma, partículas alfa, partículas beta, los fotones, electrones, neutrones, radioisótopos , y otras formas de radiaciones ionizantes.

En una realización preferida, el tratamiento es la quimioterapia neoadyuvante o adyuvante. El término "terapia neoadyuvante", como se usa aquí, se refiere a cualquier

tipo de tratamiento del cáncer se administra antes de la resección quirúrgica del tumor primario, en un paciente.

Tal como se usa aquí, el término "quimioterapia" se refiere al uso de un fármaco químico o una combinación de los mismos para el tratamiento de cáncer, tumores o neoplasia maligna, incluyendo ambos fármacos citotóxicos o citostáticos. Ejemplos de agentes de quimioterapia que pueden estar de acuerdo con la presente invención incluyen: agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida, estreptozocina, carmustina, lomustina, melfalán, busulfán, dacarbazina, temozolomida, tiotepa o altretamine); fármacos de platino (por ejemplo cisplatino, carboplatino y oxaliplatino), los medicamentos antimetabolitos (por ejemplo 5-fluorouracilo, la capecitabina, la 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina o pemetrexed), antibióticos antitumorales (por ejemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, actinomicina-D, bleomicina, mitomicina C, o mitoxantrona), inhibidores de la mitosis (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, ixabepilona, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina o estramustina), y inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, tenipósido, topotecan, irinotecan, diflomotecan o elomotecan).

El término "terapia dirigida" se refiere a un tipo de medicamento que bloquea el crecimiento o mata las células cancerosas al interferir con moléculas específicas en el interior o en las células tumorales en lugar de simplemente interferir con células de división rápida (por ejemplo, con la quimioterapia tradicional). Los tipos de agentes principales que se utilizan para las terapias dirigidas son pequeñas moléculas y anticuerpos.

El término "paciente", como se usa aquí, se refiere a un sujeto como se ha definido anteriormente, que sufre y se sabe que sufre de CCR.

"Inicio de dicha terapia" significa un punto de tiempo justo antes de la terapia se aplica, de preferencia inmediatamente antes de, por ejemplo, antes y en el mismo o el día anterior. El término "previamente", como se usa aquí, se refiere a cualquier punto de tiempo anterior. Preferiblemente sin embargo, significa al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 10 días, al menos 2 semanas, al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 6 semanas, al menos 2 meses o al menos 3 meses antes. Se hace hincapié en que el nivel de la etapa

(i) puede ser comparado con más de un nivel de la etapa (ii), en donde los más de un nivel de la etapa (ii) se determina preferiblemente en diferentes puntos temporales, por ejemplo, cualquiera de los puntos de tiempo se citan anteriormente.

"Estancamiento" significa preferiblemente un nivel dentro de un 3%, un 5%, un 8%, un 10%, un 15%, o un 20% similar a un nivel determinado antes, por ejemplo previamente como se definió anteriormente. En una realización preferida, este "nivel determinado antes" es el valor determinado en el inicio de la terapia.

"Disminución" se refiere preferentemente a un nivel de al menos 3%, al menos 5%, al menos 8%, al menos 10%, al menos 15%, o al menos 20% menor que un nivel determinado antes, por ejemplo previamente como se ha definido anteriormente. De manera similar, la disminución puede referirse a un nivel de al menos 5%, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 35%, al menos 40%, al menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% (es decir, ausente) inferior a un nivel determinado antes, por ejemplo previamente como se definió anteriormente. En una realización preferida, este "nivel determinado antes" es el valor determinado en el inicio de la terapia.

Un "efecto positivo de una terapia" significa que dicho tratamiento ralentiza la progresión de la enfermedad, previene la progresión de la enfermedad, reduce o elimina la carga tumoral (es decir, tamaño y/o el número de tumores), y/o cura el paciente. También puede significar un aumento en la duración del intervalo libre de recidiva (RFI), un aumento en el tiempo de supervivencia o la supervivencia global (SG), un aumento en el tiempo de supervivencia sin enfermedad (DFS), un aumento en la duración de intervalo libre de recidiva a distancia (DRFI), y/o similares.

En una realización preferida del método del segundo aspecto, una disminución del nivel de la proteína COL10A1 en un paciente con CCR en estadio 0, estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV indica un efecto positivo de dicha terapia. En otra realización preferida, un estancamiento del nivel de proteína COL10A1 en un paciente en estadio III CCR indica un efecto positivo de dicha terapia.

Otros términos utilizados para definir el método del segundo aspecto tienen el significado como se define con respecto al método del primer aspecto. Igualmente, las

realizaciones descritas para caracterizar mejor el método del primer aspecto también caracterizar mejor el método del segundo aspecto, en su caso.

Los métodos para la identificación de una terapia en CCR

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la identificación de la terapia para el cáncer colorrectal, que comprende

(i) determinar el nivel de proteína COL10A1 en un biofluido de al menos un paciente que sufre cáncer colorrectal y que está siendo tratado con una terapia candidata, y

(ii) comparar el nivel de proteína COL10A1 determinado en la etapa (i) con al menos un valor de referencia para dicho nivel de proteína COL10A1 en la que un estancamiento y/o una disminución del nivel de proteína COL10A1 en el biofluido con respecto al valor de referencia indica que la terapia candidata es útil para tratar el cáncer colorrectal

en el que dicho valor de referencia es seleccionado del grupo que consiste en los niveles de expresión de proteína COL10A1 en el biofluido de dicho paciente determinado al comienzo de la terapia, los niveles de expresión de proteína COL10A1 en el biofluido de dicho paciente determinado previamente durante dicho tratamiento y el nivel de proteína COL10A1 en el biofluido de control de al menos un paciente no tratado con dicha terapia candidata.

Una "terapia útil" es una terapia que tiene un efecto positivo sobre el cáncer colorrectal en al menos un, preferiblemente más de un paciente que sufre de CCR, pero no necesariamente en todos los pacientes que sufren de CCR. Una "terapia candidata" de acuerdo con el método del segundo aspecto es una terapia que puede ser, pero todavía no se conoce si es una terapia útil en general.

El método del tercer aspecto también puede llevarse a cabo para la identificación de una terapia útil para el cáncer colorrectal en un subgrupo de pacientes con CCR. Tal "subgrupo de pacientes con CCR" es un grupo de pacientes que se unificaron por una característica relevante del CCR, que otros pacientes con CCR no comparten con este subgrupo. Esta característica puede ser la base genética (por ejemplo, la de los gemelos idénticos, clones, familiares, miembros de la misma raza,

etc), una mutación genética específica, preferiblemente una mutación que aumenta el riesgo de CCR, uno o más factores de riesgo de CCR, etc.

Otros términos utilizados para definir el método del tercer aspecto tienen el significado como se define con respecto a los métodos de la primera y el segundo aspecto. Igualmente, las realizaciones descritas para caracterizar mejor los métodos de la primera y segunda aspecto también caracterizar mejor el método del tercer aspecto, en su caso.

Kit de la invención

En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende medios para llevar a cabo uno o más métodos de cualquiera de los aspectos anteriores.

Tal como se usa aquí, el término "kit" se utiliza en referencia a una combinación de los artículos que facilitan un proceso, método, uso o aplicación. Estos kits proporcionan los materiales necesarios para llevar a cabo la aplicación descrita en la presente invención.

En algunas realizaciones, los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de una o más proteínas comprenden al menos 50%, al menos 55% al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, a al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos el 99% de la cantidad total de los reactivos que forman el kit. En una realización preferida, dichos "reactivos" son anticuerpos que se unen a dichas proteínas.

En una realización preferida, los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de una o más proteínas son anticuerpos.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, se refiere a una inmunoglobulina / proteína que reconoce una parte única de una proteína específica y podría unirse a ella.

El término "anticuerpo" como se usa para describir este y otros aspectos de la invención puede ser un anticuerpo natural policlonal o monoclonal o un anticuerpo no natural, por ejemplo, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única de fragmento variable, un microanticuerpo, etc. Métodos para producir tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

Otros términos utilizados para definir el uso del cuarto aspecto tienen el significado como se define con respecto a los métodos de los aspectos anteriores. Igualmente, las realizaciones descritas para caracterizar mejor los métodos de los aspectos anteriores también caracterizan mejor el uso del cuarto aspecto, en su caso.

En una realización más preferida, dicho kit comprende un anticuerpo de COL10A1 y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en los anticuerpos de CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD1L, IL-1b, SRPX2, SLCO4A1, TESC, y/o IL-23a.

Preferiblemente, dicho kit contiene hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, hasta 10, hasta 11, hasta 12, hasta a 13 o hasta 14 diferentes anticuerpos, es decir, anticuerpos dirigidos a dicho número (s) de proteínas diferentes.

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para los marcadores de la invención se marca con un marcador detectable (por ejemplo, un colorante fluorescente o una enzima detectable), o son modificados para facilitar la detección (por ejemplo, con biotina para permitir la detección con un avidina o estreptavidina). En otras realizaciones, el reactivo biomarcador no será directamente marcado o modificado.

Ciertos kits de la invención también incluyen uno o más agentes para la detección de reactivo enlazado. Como será evidente para los expertos en la técnica, la identidad de los agentes de detección dependerá del tipo de reactivo(s) específico(s) para el biomarcador incluido en el kit, y el sistema de detección deseado. Agentes de detección incluyen los anticuerpos específicos para los reactivos específicos del biomarcador (por ejemplo, anticuerpos secundarios), los cebadores para la amplificación de un biomarcador basado en nucleótidos (por ejemplo, aptámero) o de un nucleótido `etiqueta` unido al biomarcador reactivo específico, conjugados de avidina o estreptavidina para la detección de un biomarcador modificado por biotina, y similares. Los sistemas de detección son bien conocidos en la técnica, y no necesitan ser descritos aquí.

En ciertas realizaciones, los kits para su uso en los métodos aquí descritos incluyen los reactivos en la forma de una matriz. La matriz incluye al menos dos reactivos diferentes adecuados para la determinación de los niveles de expresión de una o más proteínas (cada reactivo, específico para una proteína diferente) unidos a un sustrato en un patrón predeterminado (por ejemplo, una rejilla). En consecuencia, la

presente invención proporciona matrices que comprenden los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de una o más proteínas incluyen, pero no se limitan al anticuerpo COL10A1 y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo que consiste de anticuerpos CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD1L, IL-1b, SRPX2, SLCO4A1, TESC, y/o IL-23 bis. La localización de los diferentes reactivos (los "reactivos de captura") permite la medición de los niveles de un número de diferentes proteínas en la misma reacción. Kits que incluyen los reactivos en forma matricial son comúnmente en formato sándwich, por lo que tales kits pueden contener también reactivos de detección. Normalmente, en el kit se incluyen diferentes reactivos de detección, cada reactivo de detección específicos para un anticuerpo diferente. Los reactivos de detección en tales realizaciones son normalmente reactivos específicos para las mismas proteínas que los reactivos unidos al sustrato (aunque los reactivos de detección típicamente se unen a una porción diferente o en el sitio en la proteína de los reactivos enlazados al sustrato), y son generalmente reactivos de detección por afinidad. Al igual que con los reactivos de detección de cualquier otro formato de ensayo, los reactivos de detección pueden ser modificados con un resto detectable, modificados para permitir la unión de un resto detectable por separado, o sin modificar se. Los kits de tipo matriz que incluyen reactivos de detección que están modificados o no modificados para permitir la unión de un resto detectable también pueden contener restos adicionales detectables (por ejemplo, restos detectables que se unen al reactivo de detección, tales como anticuerpos marcados que se unen sin modificar reactivos de detección o estreptavidina modificada con un resto detectable para la detección de biotina modificados reactivos de detección).

Kits que comprenden un solo reactivo tendrán generalmente el reactivo encerrado en un contenedor (por ejemplo, un frasco, ampolla, u otro recipiente de almacenamiento adecuado), aunque los kits incluyendo el reactivo unido a un sustrato (por ejemplo, una superficie interior de un recipiente de reacción de ensayo) también se contemplan. Asimismo, los kits que incluyen más de un reactivo también puede tener los reactivos en recipientes (por separado o en una mezcla) o pueden tener los reactivos unidos a un sustrato.

El kit puede comprender, además, un envase que permite mantener los reactivos dentro de unos límites determinados. Los materiales adecuados para la preparación de

tales envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, frascos, papel, sobres y similares.

El kit de la invención puede contener adicionalmente instrucciones para el uso de los componentes contenidos en él, en especial las mencionadas con respecto a los aspectos anteriores de la invención (por ejemplo, los anticuerpos o herramientas ELISA). Las instrucciones relativas a la utilización del kit para la realización de la invención generalmente describen cómo se utiliza el contenido del kit para llevar a cabo los métodos de la invención. Las instrucciones pueden incluir información como los requisitos de la muestra (por ejemplo, la forma, el procesamiento de pre-ensayo, y el tamaño), los pasos necesarios para medir los biomarcadores (s), y la interpretación de los resultados.

Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico que puede almacenar instrucciones tales que puedan ser leídos por un sujeto, como los medios electrónicos de almacenamiento (discos magnéticos, cintas y similares), los medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios de comunicación pueden, además, o bien contienen sitios de Internet que ofrecen dichas instrucciones.

Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y no limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras y la evaluación de la expresión génica de la serie de Discovery

Para el descubrimiento de biomarcadores candidatos se utilizó un conjunto homogéneo y bien caracterizado de muestras: 100 muestras apareadas de tejido de tumor-mucosa de pacientes diagnosticados de CCR en estadio II. Todos los pacientes fueron tratados quirúrgicamente y no recibieron quimioterapia neoadyuvante. Además, se estudiaron como grupo control las muestras de mucosa del colon obtenida durante la colonoscopia a partir de 50 donantes sanos.

Para todas estas muestras, se analizó la expresión de mRNA con el microarray de Affymetrix “Human Genome U219”. Este array contiene alrededor de 530.000

sondas que cubren más de 36.000 transcripciones y variantes, que representan más de 20.000 genes mapados en UniGene o anotados en RefSeq. En concreto, el array contiene dos sondas para el gen COL10A1 que fueron utilizadas para evaluar los niveles de expresión de RNA de dicho gen en tumor de colon, mucosa normal de pacientes con cáncer y en mucosa normal de individuos sanos.

Validación técnica y biológica

Se utilizó la técnica de PCR cuantitiva en tiempo real (qPCR) para validar con una técnica diferente los niveles de expresión de COL10A1 en las mismas muestras de tumor de colon y mucosa pareada y en la mucosa normal de individuos sanos. Para la validación biológica, se analizó una serie independiente de pacientes con cáncer colorrectal también mediante la técnica de PCR cuantitativa. En este caso se analizaron 80 casos de cáncer colorrectal en estadios I-IV, sin excluir los casos de MSI, y 30 controles sanos.

Estudio de prueba de concepto: muestras utilizadas y evaluación de los niveles de proteína en suero

La expresión diferencial de RNA de COL10A1 entre tejido tumoral y mucosa no es útil para una prueba de detección. Por lo tanto, para convertirse en un candidato a biomarcador, se midió el nivel de proteína de COL10A1 en sangre. Se utilizó un kit comercial de ELISA para medir los niveles de proteína en muestras de suero de casos de cáncer de colon y controles sanos. Los individuos estudiados fueron seleccionados a partir de una serie de cribado clínico, es decir, los pacientes consecutivos que se sometieron a una colonoscopia después de la sospecha de patología colónica. Los niveles en suero de COL10A1 en 16 pacientes con cáncer de colon y 16 individuos sanos se determinaron por duplicado (N = 32).

Análisis estadístico

Para evaluar la capacidad predictiva de los biomarcadores, se han calculado las siguientes medidas: el área bajo la curva ROC (AUC), la tasa de error de clasificación, la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo, el valor predictivo negativo, y el coeficiente de correlación Matthews.

Para evaluar el valor pronóstico del potencial biomarcador, se realizaron curvas de Kaplan-Meier para determinar la supervivencia libre de enfermedad a los 10 años para todos los grupos de pacientes. Los pacientes fueron separados en dos grupos según los niveles medios de expresión de los biomarcadores. Se utilizaron técnicas de estadística univariante para evaluar las diferencias entre las curvas de supervivencia y valorar la importancia pronóstica de los biomarcadores. Concretamente, se calcularon los tests de log rank.

RESULTADOS

Análisis de la expresión de mRNA de COL10A1 en la mucosa del colon

Los análisis realizados sobre los datos de expresión de COL10A1 muestran diferencias significativas entre los diferentes tipos de tejidos. La expresión es muy baja en la mucosa de donantes sanos o mucosa normal de los casos, mientras que el tejido tumoral muestra valores de expresión muy elevados (Figura 1).

Las diferencias en los niveles medios de expresión de RNA entre tumor de colon, mucosa normal de pacientes y mucosa de individuos sanos son estadísticamente significativas ($p < 0{,}001$). Estas diferencias también se observan en los datos de validación técnica y biológica (resultados no mostrados).

Análisis en suero de la proteína COL10A1

Los niveles en suero de COL10A1 medidos por ELISA fueron significativamente diferentes entre casos y controles ($p < 0{,}0001$, Figura 2). Por otra parte, se ha observado una buena correlación entre los duplicados (Figura 3).

Estas diferencias en los niveles de proteína COL10A1 en suero no se deben a diferencias en el estadiaje de los casos de cáncer de colon, ya que los tumores en estadio II ya muestra niveles altos de expresión de COL10A1 (Figura 4).

En esta primera prueba, el biomarcador candidato muestra valores elevados de sensibilidad y especificidad. Como se muestra en la Figura 5, el AUC es de 0,938.

Análisis de supervivencia

Los resultados preliminares muestran que los niveles de expresión de RNA de los biomarcadores candidatos en pacientes con cáncer de colon tienen un valor pronóstico muy pequeño, no significativo estadísticamente (Figura 6). Sin embargo, puesto que la presencia de COL10A1 en suero es indicativa de tumor colorrectal, este biomarcador puede ser útil para controlar la respuesta terapéutica.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar el cáncer colorrectal en un sujeto determinando el nivel de la proteína COL10A1 en un biofluido de dicho sujeto, en donde un nivel de proteína COL10A1 aumentado es indicativo de cáncer colorrectal.

2. El método de la reivindicación 1, en donde dicho cáncer colorrectal es cáncer colorrectal de estadio 0, estadio I, estadio II, estadio III y/o estadio IV.

3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el sujeto es un sujeto al cual se le aplica al menos un factor de riesgo de cáncer colorrectal.

4. El método que comprende cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el aumento se determina por comparación a un valor de referencia.

5. El método según la reivindicación 4, en donde el valor de referencia es el valor medio o mediana de la proteína COL10A1 en el biofluido en un grupo de sujetos que no tienen cáncer colorrectal.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además la determinación de los niveles de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo consistente en CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD11, IL-1b, SRPX2, SCL04A1, TESC y/o IL-23a en donde un aumento en los niveles de uno o más de dichos biomarcadores es indicativo de cáncer colorrectal.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más medios de diagnóstico seleccionados del grupo consistente en examen rectal digital, test de sangre oculta en heces, sigmoidoscopia, colonoscopia, colonoscopia virtual y test de diagnóstico por la imagen.

8. Un método para monitorizar el efecto de una terapia en al menos un paciente que padece cáncer colorrectal y que se está tratando con dicha terapia, que pretende

(i) determinar el nivel de la proteína COL10A1 en un biofluido de dicho paciente, y

(ii) comparar dicho nivel de la proteína COL10A1 con al menos un nivel de la proteína COL10A1 en dicho biofluido de dicho paciente determinado al inicio de la terapia y/o determinado previamente durante dicha terapia,

en donde un estancamiento y/o un descenso del nivel de la proteína COL10A1 en dicho paciente indica un efecto positivo de dicha terapia.

9. Un método para la identificación de una terapia para el cáncer colorrectal que pretende

(i) determinar el nivel de la proteína COL10A1 en un biofluido de al menos un paciente que padece cáncer colorrectal y que se está tratando con una terapia candidata, y

(ii) comparar el nivel de la proteína COL10A1 determinado en el paso (i) con al menos un valor de referencia para dichos niveles de proteína COL10A1 en donde un estancamiento y/o un descenso del nivel de la proteína COL10A1 en el biofluido con respecto al valor de referencia indica que la terapia candidata es útil para tratar el cáncer colorrectal

en donde dicho valor de referencia se selecciona del grupo consistente en los niveles de expresión de la proteína COL10A1 en el biofluido de dicho paciente determinados al inicio de la terapia, los niveles de expresión de la proteína COL10A1 en el biofluido de dicho paciente determinados previamente durante dicha terapia y el nivel de la proteína COL10A1 en el biofluido de al menos un paciente control no tratado con dicha terapia candidata.

10. El método de la reivindicación 8 o 9, que comprende además la determinación de los niveles de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo consistente en CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD11, IL-1b, SRPX2, SCL04A1, TESC y/o IL-23a

en donde un estancamiento y/o un descenso del nivel de uno o más de dichos biomarcadores es indicativo de un efecto positivo de dicha terapia, o en donde un estancamiento y/o un descenso del nivel de uno o más de dichos biomarcadores en el biofluido con respecto al valor de referencia indica que la terapia candidata es útil para el tratamiento del cáncer colorrectal.

11. El método de las reivindicaciones 8, 9 o 10, que comprende además uno o más medios de diagnóstico seleccionados del grupo consistente en examen rectal digital, test de sangre oculta en heces, sigmoidoscopia, colonoscopia, colonoscopia virtual y test de diagnóstico por la imagen.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde dicho biofluido es sangre, plasma o suero, y preferiblemente es suero.

13. El uso de un anticuerpo contra la proteína COL10A1 para el diagnóstico del cáncer colorrectal, para monitorizar el efecto de una terapia en un paciente que padece cáncer colorrectal o para la identificación de una terapia para el cáncer colorrectal.

14. Un kit que consta de los medios necesarios para llevar a cabo el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o para el uso según la reivindicación 13 en donde dicho kit comprende un anticuerpo contra COL10A1 y uno o más anticuerpos seleccionados del grupo consistente en un anticuerpo contra CEA, TCN, SULT2B1, ALDOB, COL11A1, PI3, CCL20, MTHFD11, IL-1b, SRPX2, SCL04A1, TESC y/o IL-23a.

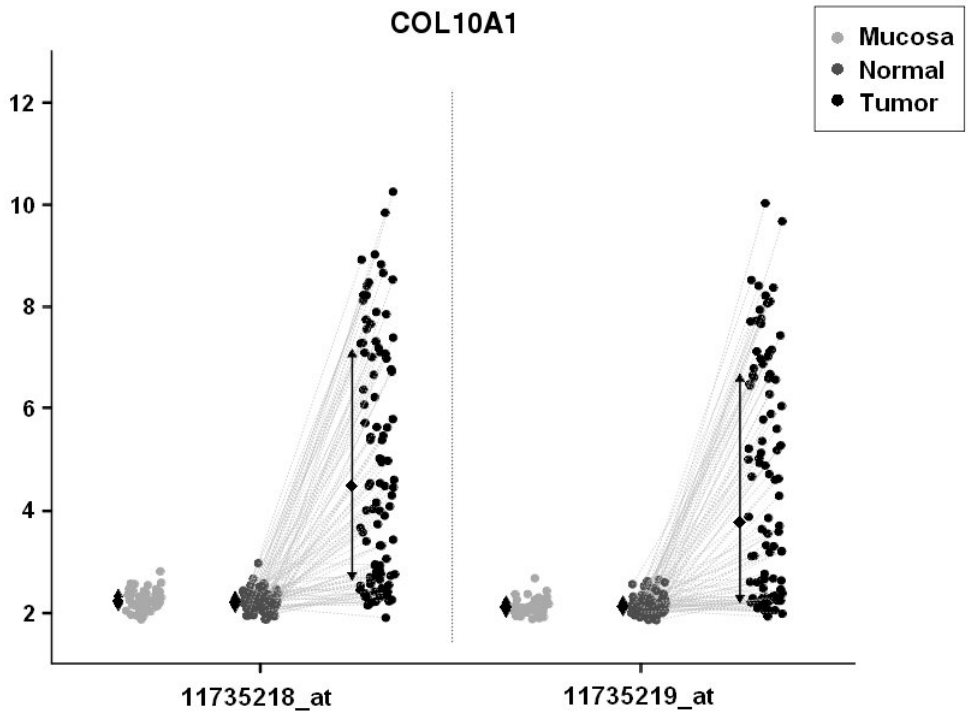
COL10A1
Mucosa
Normal
Tumor
12
10
8
6
4
2
11735218_at
11735219_at

Fig. 1

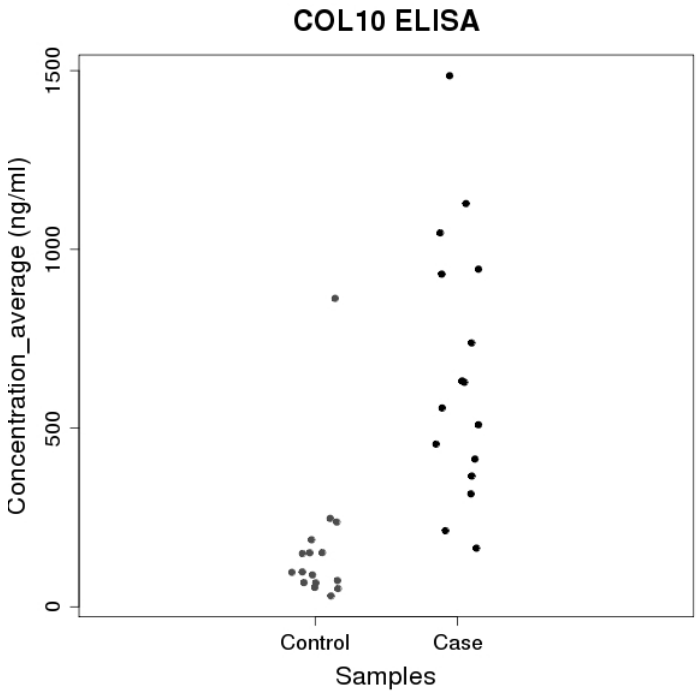
COL10 ELISA
Concentration_average (ng/ml)
1500
1000
500
0
Control
Case
Samples

Fig. 2

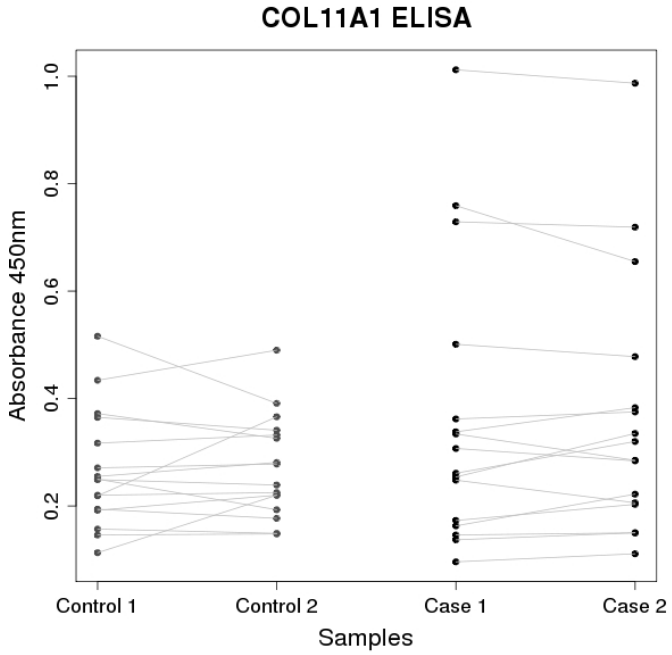
COL11A1 ELISA
Absorbance 450nm
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
Control 1
Control 2
Case 1
Case 2
Samples

Fig. 3

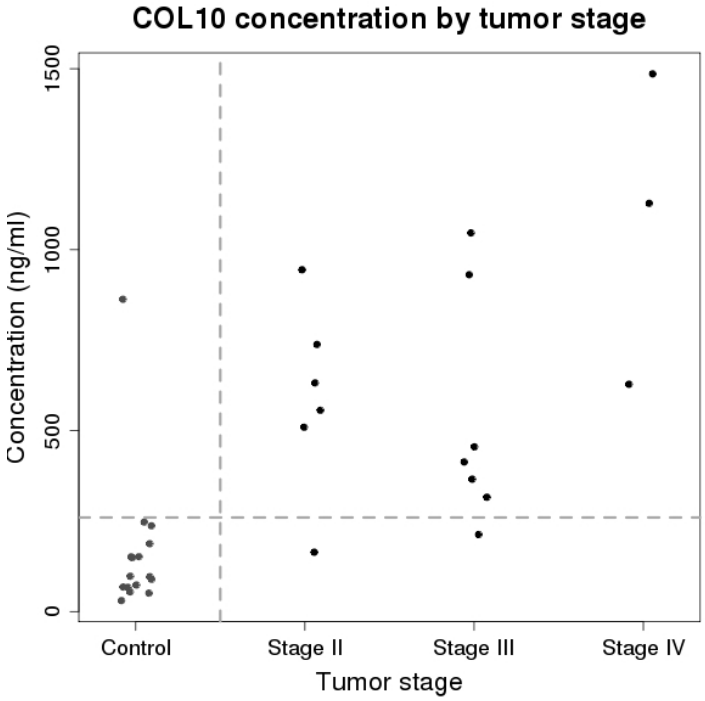
COL10 concentration by tumor stage
Concentration (ng/ml)
0
500
1000
1500
Control
Stage II
Stage III
Stage IV
Tumor stage

Fig. 4

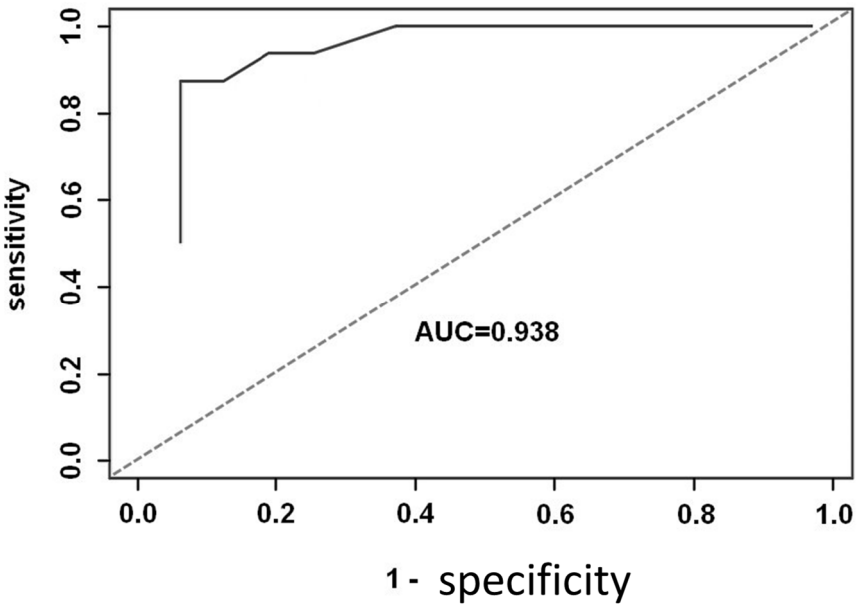
sensitivity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
AUC=0.938
1 - specificity

Fig. 5

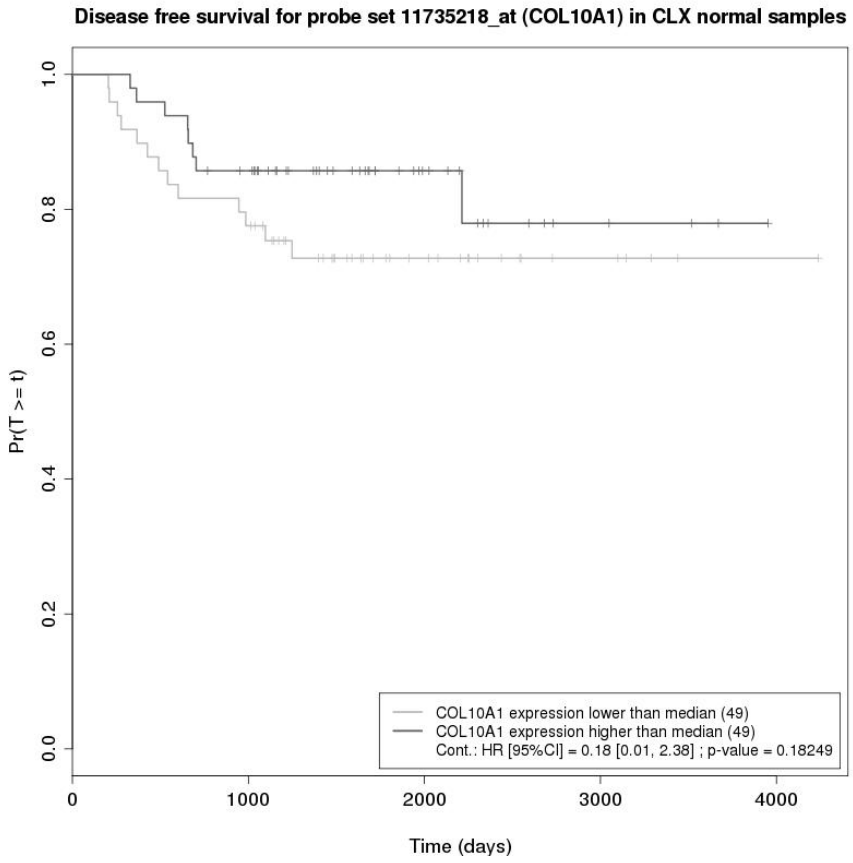
Disease free survival for probe set 11735218_at (COL10A1) in CLX normal samples
Pr(T >= t)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
1000
2000
3000
4000
Time (days)
COL10A1 expression lower than median (49)
COL10A1 expression higher than median (49)
Cont.: HR [95%CI] = 0.18 [0.01, 2.38] ; p-value = 0.18249

Fig. 6