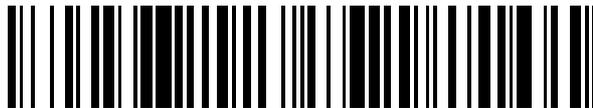


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 366**

21 Número de solicitud: 201231918

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**10.12.2012**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**10.07.2014**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN IMDEA ALIMENTACIÓN (50.0%)  
C/ Faraday, 7, Planta 1ª D106. Edificio CLAUD-  
PCM. Ciudad Universitaria de Cantoblanco  
28049 Madrid (Madrid) ES y  
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE  
LA PAZ (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RAMÍREZ DE MOLINA, Ana I.;  
REGLERO RADA, Guillermo;  
VARGAS ALONSO, Teodoro;  
MOLINA ARRANZ, Susana;  
GONZÁLEZ-VALLINAS GARRACHÓN, Margarita;  
MORENO RUBIO, Juan;  
CEJAS GUERRERO, Paloma y  
FELIÚ BATLLE, Jaime**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Métodos y kits para el pronóstico del cáncer colorrectal**

57 Resumen:

Métodos y kits para el pronóstico del cáncer colorrectal.

La invención se refiere a los métodos para predecir el riesgo de recaída de los pacientes con cáncer colorrectal, así como a los métodos para proporcionar medicina personalizada a dichos pacientes, basándose en los niveles de expresión de los genes ACSL1, ACSL4 y, opcionalmente, GCNT3, LPL, APOC1, SCD, cuyos productos de expresión están implicados en el metabolismo energético celular. La invención también se refiere a los kits para llevar a cabo los métodos predictivos y de medicina predictiva.

ES 2 475 366 A1

## DESCRIPCIÓN

### MÉTODOS Y KITS PARA EL PRONÓSTICO DEL CÁNCER COLORRECTAL

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

La invención se refiere al campo del diagnóstico y, más en particular, a los métodos para predecir el riesgo de recaída de los pacientes con cáncer, así como métodos para proporcionar medicina personalizada a dichos pacientes. La invención se refiere también a kits para llevar a cabo los métodos de la medicina diagnóstica y predictiva.

10

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15

El cáncer colorrectal (CCR) es una de las neoplasias más frecuentes en el mundo occidental, es la tercera causa de muerte en los hombres, después del cáncer de pulmón y cáncer de próstata y es el segundo en frecuencia entre las mujeres, después del cáncer de mama. El cáncer colorrectal es el tercer cáncer más común en los hombres (663 000 casos, 10,0% del total) y el segundo en mujeres (571 000 casos, 9,4% del total) en todo el mundo. Se estiman unas 608 000 muertes por cáncer colorrectal en todo el mundo, representando el 8% de las muertes por cáncer, por lo que es la cuarta causa más común de muerte por cáncer. (GLOBOCAN.iarc.fr)

20

La principal opción de tratamiento para el cáncer colorrectal es la cirugía, con o sin quimioterapia y / o radioterapia adyuvante, dependiendo de la clasificación individual del paciente y otros factores médicos.

25

La selección de un tratamiento adecuado es fundamental tanto para el paciente como por razones económicas. Para la supervivencia del paciente, es esencial saber cuándo utilizar de inmediato un protocolo de tratamiento pesado y agresivo para prevenir la extensión de un cáncer colorrectal maligno. De lo contrario, la supervivencia del paciente puede verse comprometida. Por el contrario, la realización de un tratamiento fuerte y agresivo cuando no es necesario es altamente perjudicial para el paciente. Estos tratamientos someten a los pacientes a un grado de molestias e inconvenientes derivados de la toxicidad adversa que puedan afectar significativamente a la calidad de vida del paciente. Cabe destacar que cada paciente incurre en una posibilidad de 1 en 400 de que el tratamiento se traduzca en toxicidad fatal. Además, los tratamientos pesados y agresivos suelen ser muy costosos, y, por lo tanto, se deben realizar sólo cuando sea necesario.

30

En la actualidad, la selección del tratamiento se basa en la estadificación del tumor, que se realiza generalmente con el test del Tumor/Nódulos/Metástasis (TNM) de la *American Joint*

35

*Committee on Cancer (AJCC)*. El sistema TNM asigna un número en base a tres categorías. "T" denota el grado de invasión de la pared intestinal, "N" el grado de afectación del nódulo linfático, y "M" el grado de metástasis. El estadio de un cáncer suele ser citado como un número I, II, III, IV derivado del valor de TNM agrupado por pronóstico, donde un número más alto indica un cáncer más avanzado y es probable que un resultado peor. Aunque la clasificación AJCC proporciona información valiosa sobre la etapa en que se ha diagnosticado el cáncer colorrectal, no da información sobre la agresividad del tumor y su utilidad para el pronóstico es limitada. Considerando que es claro que los pacientes en estadio IV tienen mal pronóstico, el diagnóstico de cáncer colorrectal en una etapa temprana no excluye la posibilidad de que el tumor se pueda desarrollar muy rápidamente. En particular, se desconocen las causas por las que de un 20 a un 40 por ciento de los pacientes con estadio II de cáncer colorrectal (cáncer temprano ni con metástasis ni con invasión de los ganglios linfáticos en el diagnóstico) se agravan rápidamente y mueren. Algunos estudios sugieren que un subgrupo de pacientes con alto riesgo de cáncer de colon en estadio II se podrían beneficiar de la terapia adyuvante (Quasar et al, Lancet 2007; 370:2020-2029). Sin embargo, las variables histopatológicas, tales como características de alto riesgo en la enfermedad en estadio II, son sólo directrices en la terapia estadificativa. Cuando los ganglios linfáticos son invadidos por las células tumorales, los resultados de las pruebas TNM predicen un mal pronóstico y el paciente suele ser sometido a cirugía seguida de quimioterapia pesada. Los estudios clínicos muestran que por cada 25 pacientes identificados como de alto riesgo en estadio II CCR, 20 se cura, independientemente de si reciben o no tratamiento (Quasar et al, Lancet 2007;. 370:2020-2029). Del mismo modo, un subgrupo de pacientes con cáncer de colon en estadio III tratados sólo con cirugía no recaen en 5 años, incluso sin tratamiento adyuvante (Ranghammar et al, Acta Oncologica 2001; 40: 282-308). La quimioterapia adyuvante es la recomendación estándar para la fase III de CCR, sin embargo, la identificación prospectiva de este subgrupo de pacientes con cáncer de colon en fase III podría hacer que se prescindiera de la terapia. Por lo tanto, un método exacto y fiable que identificara a los pacientes en situación de riesgo mayor y menor (por ejemplo, de "alto riesgo" en estadio II y de "bajo riesgo" en estadio III del cáncer de colon) podría mejorar la selección de la terapia individualizada dentro de estos grupos. Por esta razón se han descrito varios métodos para predecir el resultado de los pacientes que sufren cáncer colorrectal en base a los niveles de expresión de marcadores moleculares.

US7695913 describe un método para predecir el pronóstico de un paciente que sufre CCR que comprende la determinación de los niveles de expresión normalizada de los genes

INHBA, MYBL2, FAP y Ki67 en la que un incremento en la expresión de INHBA y FAP correlaciona negativamente con una mayor probabilidad de un pronóstico positivo y en donde la expresión de los genes MYBL2 y Ki67 se correlaciona positivamente con una mayor posibilidad de un pronóstico positivo. El método descrito en este documento constituye la base del kit de Oncotype DX, aunque el kit incluye la determinación de 12 genes, incluyendo los genes INHBA, MYBL2, FAP y Ki67.

WO02057787 informa de los resultados de un estudio diseñado para determinar si el mRNA de la survivina se puede utilizar para predecir muerte por un carcinoma colorrectal recurrente. El estudio se basó en datos obtenidos de biopsias de tumores congelados de 144 pacientes. El estudio muestra que la expresión de survivina se asocia con un riesgo significativamente mayor de muerte por cáncer recurrente en pacientes con estadio II del cáncer colorrectal.

Rosati et al. (Tumor Biol. 2004, 25:258-63) reporta los resultados de un estudio diseñado para determinar si la expresión de las proteínas timidilato sintasa (TS), p53, bcl-2, Ki-67 y p27 en el adenocarcinoma colorrectal es capaz de predecir supervivencia sin recaídas o supervivencia general. Se examinaron muestras de 103 pacientes por inmunohistoquímica. Según esta referencia, no existe una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de cualquiera de las proteínas TS, p53, bcl-2, Ki-67 y p27 y un resultado clínico a pesar de que se observó una asociación estadísticamente significativa entre un resultado desfavorable y una combinación de expresión negativa de p53 y una expresión positiva de Ki-67 y los cánceres en etapa C.

Sin embargo, a pesar de las investigaciones realizadas sobre este tema, hoy en día hay muy pocos marcadores tumorales que sean útiles desde el punto de vista clínico, tanto para el diagnóstico del CCR como para determinar el estadio de un carcinoma de CCR. Una prueba capaz de cuantificar la probabilidad del paciente de beneficiarse de la quimioterapia en estadios III sería de gran utilidad. Un paciente en estadio III con un bajo riesgo de recurrencia similar al de un paciente en estadio II y una baja probabilidad de beneficiarse de la quimioterapia podría optar por renunciar a la quimioterapia. Un paciente con un riesgo de recurrencia alta y una baja probabilidad de beneficiarse de quimioterapia con 5-FU podría elegir un tratamiento alternativo.

Por lo tanto, hay una necesidad no cubierta en el campo de los marcadores o los paneles de marcadores que permiten el diagnóstico del CCR y la clasificación del estadio de los carcinomas colorrectales con una alta fiabilidad.

Por lo tanto, un método exacto y confiable que identifique a los pacientes en situación de mayor y menor riesgo (por ejemplo, de "alto riesgo" en estadio II y de "bajo riesgo" en

estadio III del cáncer de colon) podría mejorar la selección de la terapia individualizada dentro de estos grupos.

### **DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION**

5 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para determinar el pronóstico de un paciente que sufre de cáncer colorrectal que comprende determinar en una muestra obtenida de dicho paciente los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 y/o una  
10 disminución en los niveles de expresión del gen GCNT3 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene un mal pronóstico.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método para seleccionar un tratamiento adecuado para pacientes que sufren cáncer colorrectal que comprende la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3,  
15 LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 y/o una disminución en los niveles de expresión del gen GCNT3 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene que ser tratado es candidato para recibir radioterapia o quimioterapia después del tratamiento quirúrgico.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 y, opcionalmente, los reactivos para la determinación de los niveles de expresión de uno o más genes control, de expresión constitutiva o "housekeeping".

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de un kit de acuerdo con la invención  
25 para predecir el resultado (pronóstico) de un paciente que sufre de cáncer colorrectal o para determinar si un paciente con cáncer colorrectal es candidato a la quimioterapia o radioterapia después de la cirugía.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

30 **Figura 1:** Valor pronóstico del gen LPL en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.

**Figura 2:** Valor pronóstico del gen APOC1 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.

**Figura 3:** Valor pronóstico del gen SCD en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.

**Figura 4:** Valor pronóstico del gen ACSL1 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon. ) Valor pronóstico de ACSL1 en la serie inicial de pacientes. B) Valor predictivo de respuesta a quimioterapia de ACSL1 en los pacientes de la serie inicial.  
C) Valor predictivo de respuesta a quimioterapia de ACSL1 en la serie de validación.

**Figura 5:** A) Valor pronóstico del gen ACSL4 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon. B) Valor pronóstico del gen ACSL4 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon que no han sido tratados con quimioterapia.

**Figura 6:** Valor pronóstico del gen GCNT3 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.

**Figura 7:** Valor pronóstico de una huella metabólica basada en la determinación de los niveles de genes combinados. Se presenta el valor predictivo de una huella genómica basada en la determinación de 4 (A) y 5 genes (B), tanto en la serie inicial (panel superior) como en la de validación (panel central), así como el compromiso de sensibilidad y especificidad del test (panel inferior).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Método pronóstico de la invención

Los autores de la presente invención han identificado distintos genes cuyos niveles de expresión permite la identificación de pacientes con CCR con menor y mayor riesgo de recaída (por ejemplo, de "alto riesgo" en estadio II y de "bajo riesgo" en estadio III del cáncer de colon). Por ejemplo, como se muestra en los ejemplos 1 a 5 de la invención, los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1, ACSL4 y GCNT3 se expresan diferencialmente en muestras de tumores de pacientes que tienen un peor pronóstico (determinado por medio de la supervivencia libre de enfermedad) que en aquellos pacientes que tienen un mejor pronóstico. Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método (en adelante "método pronóstico de la invención") para predecir el resultado de un paciente que sufre de cáncer colorrectal que comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 y/o una disminución en los niveles de expresión del gen GCNT3 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene un mal pronóstico.

El término "determinar el pronóstico ", se utiliza aquí para referirse a la probabilidad de que un paciente tenga un resultado clínico concreto, ya sea positivo o negativo. Los métodos de predicción de la presente invención pueden ser usados clínicamente para tomar decisiones sobre la elección del tratamiento más adecuado para cada paciente en particular. Los métodos de predicción de la presente invención son herramientas valiosas para predecir si un paciente va a responder favorablemente a un régimen de tratamiento, como la quimioterapia. La predicción puede incluir factores pronósticos. Como comprenderán los expertos en el campo, la predicción, aunque se preferiría, no tiene que ser correcta para el 100% de los sujetos que se puedan diagnosticar o evaluar. El término, sin embargo, requiere que una parte significativa de los sujetos puedan ser identificados como con mayor probabilidad de tener un resultado determinado. Si un sujeto es estadísticamente significativo se puede determinar sin más por el experto en la materia, usando diferentes herramientas de evaluación estadística conocidas, por ejemplo, la determinación de los intervalos de confianza, la determinación del valor-p, validación cruzada tasas de clasificación y los detalles, etc, como se muestra en Dowdy y Wearden, Estadística para la Investigación de Wiley, John & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza recomendados son por lo menos 50%, por lo menos el 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80%, al menos 90% o al menos el 95%. Los valores-p son, preferentemente, 0,01, 0,005 o menos.

El término "paciente", 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: humanos, 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.

El término "cáncer colorrectal" se utiliza en su sentido más amplio y se refiere a (1) todas las etapas y todas las formas de cáncer que se origina de las células epiteliales del intestino grueso y / o el recto y / o (2) todos los estadios y todas las formas de cáncer que afectan el revestimiento del intestino grueso y / o el recto. En los sistemas de estadificación para la clasificación del cáncer colorrectal, el colon y el recto son tratadas como un solo órgano.

En la modalidad preferida, el paciente presenta un estadio I, II, III o IV, en donde el estadio I se define como T1 N0 M0 o T2 N0 M0, el estadio II se define como T3 N0 M0 o T4 N0 M0, el estadio III se define como cualquier T, N1-2, M0 y el estadio IV corresponde a cualquier T, cualquier N, M1. De acuerdo con sistema de estadificación de tumor/nodo/metástasis (TNM) de la *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* (Greene et al. (eds.), cáncer del AJCC

Staging Manual. 6<sup>a</sup> ed. Nueva York, NY: Springer, 2002), las distintas etapas del cáncer colorrectal se definen como sigue:

- Tumor: T1: el tumor invade la submucosa, T2: el tumor invade la muscularis propia, T3: el tumor invade a la muscularis propia en la subserosa, o los tejidos pericólicos o perirrectal; T4: El tumor invade directamente otros órganos o estructuras, y / o perfora.
- Nodo: N0: No hay metástasis a los ganglios linfáticos regionales; N1: metástasis en 1 a 3 ganglios linfáticos regionales, N2: Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos regionales.
- Metástasis: M0: Metástasis distante mp; M1: metástasis distante presente.

En una modalidad preferida, el paciente cuyo resultado se predice es un paciente que ha sido diagnosticado con cáncer colorrectal y que ha pasado por una intervención quirúrgica del cáncer. En una modalidad preferida, el paciente ha tenido una intervención quirúrgica de un tumor en estadio I, de un tumor en estadio II, de un tumor en estadio III o de un tumor en estadio IV.

En la presente invención, el término "muestra" o "muestra biológica", se refieren el material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador que se desee y puede comprender células y / o material no-celular del sujeto. La muestra puede ser aislado de cualquier tejido o fluido biológico adecuado, como por ejemplo, tejido de la próstata, sangre, plasma sanguíneo, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o de las heces. Las muestras utilizadas para la determinación de los genes marcadores son muestras de tejido de colon preferentemente obtenidas por biopsia.

Por otra parte, las muestras son muestras de biofluidos. Los términos "fluido biológico" y "biofluido" se utilizan indistintamente en este documento y se refieren a fluidos acuosos de origen biológico.

El biofluido se puede obtener desde cualquier localización (tales como sangre, plasma, suero, orina, bilis, líquido cefalorraquídeo, humor vítreo o acuoso, o cualquier secreción corporal), un exudado (como el líquido obtenido a partir de un absceso o cualquier otro sitio de infección o inflamación), o el líquido obtenido a partir de una articulación (por ejemplo, una articulación normal o una articulación afectada por una enfermedad como la artritis reumatoide).

En un primer paso, el primer método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en una muestra de dicho paciente.

El término "GCNT3", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la glucosaminil (N-acetil) transferasa 3 tipo mucina, también conocido como C2/4GnT, C2GnT-M, C2GnT2 e identificado en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso O95395. El gen GCNT3 humano tiene el número de acceso 4205 en la base de datos HGNC.

5 El término "LPL", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína lipoprotein lipasa, P06858. El gen LPL humano tiene el número de acceso 6677 en la base de datos HGNC

10 El término "APOC1", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína ApoC1, y que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso P02654. El gen APOC1 humano tiene el número de acceso 607 en la base de datos HGNC.

El término "SCD", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína estearoil-CoA desaturasa (también llamada delta-9 desaturasa) y que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso O00767. El gen SCD humano tiene el número de acceso 1057 en la base de datos HGNC.

15 El término "ACLS1", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la isoforma 1 de la acil-CoA sintetasa de cadena larga y que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso P33121. El gen ACLS1 humano tiene el número de acceso 3569 en la base de datos HGNC.

20 El término "ACLS4", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la isoforma 4 de la acil-CoA sintetasa de cadena larga y que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso O60488. El gen ACLS4 humano tiene el número de acceso 3571 en la base de datos HGNC.

25 Se entenderá que el procedimiento según la presente invención puede comprender la determinación de las variantes polimórficas de origen natural de uno o más de los genes anteriormente.

En una realización preferida, el método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de cada uno de los genes de forma individual.

30 En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de dos en dos. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes pares de genes GCNT3 y LPL; GCNT3 y APOC1; GCNT3 y SCD; GCNT3 y ACSL1; GCNT3 y ACSL4; LPL y APOC1; LPL y SCD; LPL y ACSL1; LPL y ACSL4; APOC1 y SCD; APOC1 y ACSL1; APOC1 y ACSL4; SCD y ACSL1; SCD y ACSL4; ACSL1 y ACSL4.

35 En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de tres en tres. Así, la

invención comprende la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL y APOC1; GCNT3, LPL y SCD; GCNT3, LPL y ACSL1; GCNT3, LPL y ACSL4; GCNT3, APOC1 y SCD; GCNT3, APOC1 y ACSL1; GCNT3, APOC1 y ACSL4; GCNT3, SCD y ACSL1; GCNT3, SCD y ACSL4; GCNT3, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1 y SCD; LPL, APOC1 y ACSL1; LPL, APOC1 y ACSL4; LPL, SCD y ACSL1; LPL, SCD y ACSL4; LPL, ACSL1 y ACSL4; APOC1, SCD y ACSL1; APOC1, SCD y ACSL4; APOC1, ACSL1 y ACSL4; SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de cuatro en cuatro. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1 y SCD; GCNT3, LPL, APOC1 y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD y ACSL1; GCNT3, LPL, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD y ACSL1; GCNT3, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD y ACSL1; LPL, APOC1, SCD y ACSL4; LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de cinco en cinco. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1, SCD, y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de uno o más de uno de los genes ABCA1, APOE, FADS2, CD36 en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes ABCA1, APOE, FADS2 y/o CD36 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene un mal pronóstico.

El término "ABCA1", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína ABCA1 (*ATP-binding cassette subfamily A member 1*), que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso O95477. El gen ABCA1 humano tiene el número de acceso 29 en la base de datos HGNC.

El término "APOE", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína apolipoproteína E o Apo-E, que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso P02649. El gen APOE humano tiene el número de acceso 613 en la base de datos HGNC.

5 El término "FADS2", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína "*delta(6) fatty acid desaturase*" o "*fatty acid desaturase 2*", que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso O95864. El gen FADS2 humano tiene el número de acceso 3575 en la base de datos HGNC.

10 El término "CD36", como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína "platelet glycoprotein 4 (thrombospondine receptor)", que se identifica en la base de datos UniProtKB/SwissProt con el número de acceso UniProtKB/Swiss-Prot:P16671. El gen CD36 humano tiene el número de acceso en la base de datos HGNC.

En una forma preferida de realización, el método de la invención comprende determinar los niveles de expresión de uno de los siguientes grupos de genes:

- 15
- ACSL4, SCD, APOE y FADS2;
  - ACSL4, SCD, ABCA1 y FADS2;
  - ACSL4, SCD, ABCA1 y APOC1;
  - ACSL4, ACSL1, SCD y ABCA1;
  - ACSL4, ACSL1, SCD, FADS2 y ABCA1

20

  - ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y ABCA1
  - ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y CD36
  - ACSL4, SCD, FADS2, ABCA1 y CD36

25 Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado en el marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de dichos marcadores genéticos. A modo de ejemplo no limitativo, los niveles de expresión se determinan mediante la cuantificación de los niveles de ARNm codificados por los genes involucrados o por medio de la cuantificación de los niveles de las proteínas correspondientes.

30 Los métodos para determinar la cantidad de ARNm son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico que contiene la muestra (por ejemplo, células o tejidos preparada a partir de la paciente) se extrae primero de acuerdo con los métodos estándar, por ejemplo, el uso de enzimas líticas o soluciones químicas o extraídas con ácidos nucleicos resinas de fijación siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARNm extraído es detectado por hibridación (por ejemplo, el análisis de Northern blot o microarrays de ADN después de la conversión del ARNm en una cDNA marcado) y/o amplificación (por ejemplo, RT-PCR). La

35

determinación puede llevarse a cabo de forma cualitativa, cuantitativa, o semi-cuantitativa. La determinación cuantitativa en tiempo real o semi-cuantitativos de RT-PCR es particularmente ventajosa. Preferiblemente, los pares de cebadores se diseñan de forma que incluyan una región que contiene un intrón, de forma que se pueda distinguir la  
5 amplificación de cDNA de la contaminación genómica putativo. Los cebadores adecuados pueden ser fácilmente diseñados por el experto. Otros métodos de amplificación incluyen reacción en cadena de ligasa (LCR), la transcripción mediada por la amplificación (TMA), la amplificación de desplazamiento de cadena (SDA) y la amplificación de secuencias de ácido nucleico basada (NASBA). Preferiblemente, la cantidad de ARNm se mide cuantitativa o  
10 semi-cuantitativos de RT-PCR o cuantitativa en tiempo real o semi-cuantitativos de RT-PCR. El término "hibridación específica", como se usa aquí, se refiere a las condiciones que permiten la hibridación de dos secuencias de polinucleótidos en condiciones de alta rigurosas o condiciones moderadamente severas. Las expresiones " condiciones altamente estrictas" y "condiciones moderadamente estrictas" se definen a continuación en relación  
15 con el kit de la invención y son igualmente aplicables en el contexto del presente método.

Por otra parte, también es posible determinar los niveles de expresión de los genes marcadores por medio de la determinación de los niveles de expresión de las proteínas codificadas por dichos genes, debe tener lugar un aumento de la cantidad de proteína correspondiente. La determinación de los niveles de expresión de las proteínas diferentes se  
20 puede realizar utilizando cualquier método convencional. A modo de ejemplo no limitativo, dicha determinación se puede realizar utilizando anticuerpos con capacidad de unirse específicamente a la proteína a determinar (o fragmentos de éstos con los determinantes antigénicos) y posterior cuantificación de los derivados complejos antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos que se van a utilizar en este tipo de análisis puede ser, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de  
25 anticuerpos, Fv, Fab, Fab ' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triabodies, tetrabodies y anticuerpos humanizados. Al mismo tiempo, los anticuerpos pueden ser o no ser etiquetados. Ilustrativos, pero no exclusiva, los ejemplos de marcadores que pueden ser utilizados incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores de la enzima o sustratos, inhibidores de la enzima, las partículas, colorantes, etc  
30 Hay una amplia variedad de ensayos bien conocidos que pueden ser utilizado en la presente invención, no se usen los anticuerpos marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios), las cuales incluyen técnicas de Western-blot o inmunoblot, ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), RIA (radioinmunoensayo), la competencia EIA ( inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (anticuerpos doble sandwich  
35

ELISA), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de biochips o microarrays de proteínas como anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como las tiras reactivas. Otras formas de detección y cuantificación de la proteína incluyen las técnicas de cromatografía de afinidad, de unión al ligando ensayos, etc.

Una vez que los niveles de expresión de los genes por encima de una muestra de un paciente se han determinado, los niveles se comparan con valores de referencia para cada uno de dichos genes. Normalmente, los valores de referencia son el nivel de expresión de los genes que se comparan en una muestra de referencia.

Una "muestra de referencia", como se usa aquí, significa una muestra obtenida de un grupo de sujetos sanos que no tiene un estado de enfermedad o fenotipo particular. Por ejemplo, la muestra de referencia puede incluir muestras de la mucosa del colon de pacientes que no sufren cáncer de colon o que no tienen antecedentes de cáncer de colon. Por otra parte, la muestra de referencia podría ser una muestra o un conjunto de muestras de cáncer de colon con un bajo riesgo de recurrencia. Esta muestra o conjunto de muestras pueden ser obtenidas de pacientes que han tenido una resección quirúrgica del tumor y que no han sufrido una recaída, de preferencia en ausencia de quimioterapia adyuvante. En otra realización, la muestra de referencia es una muestra de un tipo que CCR o un grupo de tipo I CCR.

Los niveles de referencia adecuada expresión de los genes puede ser determinada mediante la medición de los niveles de expresión de dichos genes en varios temas adecuados, y esos niveles de referencia se puede ajustar a las poblaciones específicas (por ejemplo, un nivel de referencia puede estar relacionada con la edad, por lo que las comparaciones se puede hacer entre los niveles de expresión en las muestras de los sujetos de una cierta edad y niveles de referencia para una enfermedad particular, el fenotipo, o falta de ella en un determinado grupo de edad). En una realización preferida, la muestra de referencia se obtiene de varios sujetos sanos o pacientes sin historia previa de cáncer colorrectal. Por otra parte, la muestra de referencia es una muestra o un conjunto de muestras de cáncer de colon de pacientes que han tenido una resección quirúrgica del tumor y que no han sufrido una recaída, de preferencia en ausencia de quimioterapia adyuvante. El experto en la técnica apreciará que el tipo de muestra de referencia puede variar dependiendo del método específico a realizar. Así, en el caso de que un diagnóstico o pronóstico de la enfermedad se lleva a cabo, la muestra hace referencia puede ser un conjunto de tejido no tumoral de tejido colorrectal, el de las personas que no tienen un historial de cáncer colorrectal o de un grupo distal de los tejidos no tumorales con respecto a

los tejidos tumorales respectivos, o de una muestra o un conjunto de muestras de cáncer de colon de pacientes que han tenido una resección quirúrgica del tumor y que no han sufrido una recaída, de preferencia en ausencia de quimioterapia adyuvante. En el caso de que el método de la invención está dirigida a determinar el efecto de una terapia en un paciente, la muestra de referencia es preferible una muestra obtenida de dicho paciente antes de iniciar el tratamiento.

El perfil de expresión de los genes en la muestra de referencia de preferencia pueden ser generados a partir de una población de dos o más personas. La población, por ejemplo, pueden contener 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más personas. Además, el perfil de expresión de los genes en la muestra de referencia y en la muestra de la persona que va a ser diagnosticada de acuerdo con los métodos de la presente invención pueden ser generados a partir de la misma persona, siempre que los perfiles sean analizados y el perfil de referencia son generados a partir de las muestras biológicas tomadas en diferentes momentos y se comparan entre sí. Por ejemplo, una muestra de un individuo puede obtener en el inicio de un período de estudio. Un perfil de marcador biológico de referencia de esta muestra se pueden comparar con los perfiles de biomarcadores generados a partir de las muestras posteriores de la misma persona. En una realización preferida, la muestra de referencia es un conjunto de muestras de varios individuos, y corresponde a porciones de tejido de colon que están lejos de la zona del tumor y que han sido obtenidos de preferencia en la misma biopsia, pero que no tienen ninguna característica anatomopatológica del tumor los tejidos.

Una vez que los niveles de expresión de los genes marcadores en relación con los valores de referencia para dichos genes se han determinado, es necesario identificar si existen alteraciones en la expresión de dichos genes (aumento o disminución de la expresión). La expresión de un gen se considera aumentada en una muestra de la materia objeto de estudio cuando los niveles de incremento con respecto a la muestra de referencia son al menos de un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, al menos un 25%, por lo menos 30%, por lo menos el 35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por menos por lo menos 65%, por lo menos el 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100%, por lo menos 110 %, por lo menos 120%, por lo menos 130%, por lo menos 140%, por lo menos 150%, o más. Del mismo modo, la expresión de un gen se considerada disminuida cuando sus niveles disminuyen con respecto a la muestra de referencia en al menos un 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos el 20%, por lo menos el 25%, al menos un 30%, por lo menos el

35%, por lo menos el 40%, por lo menos 45%, por lo menos el 50%, por lo menos el 55%, por lo menos el 60%, por lo menos el 65%, por lo menos 70%, por lo menos el 75%, por lo menos el 80%, por lo menos el 85%, por lo menos el 90%, por lo menos el 95%, por lo menos 100% (es decir, ausente).

5 Por último, el paciente se clasifica como de riesgo elevado de resultado negativo, si los genes marcadores muestran un aumento de los niveles de expresión con respecto a una muestra de referencia y que tienen un bajo riesgo de resultados negativos, si los genes marcadores muestran una disminución en los niveles de expresión con respecto a una muestra de referencia. En una modalidad preferida, el paciente se clasifica como de riesgo  
10 elevado de resultado negativo, si los niveles de expresión del gen es más alto que el nivel de expresión del mismo gen en una muestra o un conjunto de muestras de cáncer de colon de pacientes que han tenido una resección quirúrgica del tumor y que no han sufrido una recaída, de preferencia en ausencia de quimioterapia adyuvante.

El término "buen pronóstico", según se usa en la presente invención, se usa para indicar  
15 una mejora en alguna medida del estado del paciente, incluyendo aquellas que se usan normalmente en la técnica, tales como un aumento en la duración del intervalo libre de recidiva (RFI), un aumento en el tiempo de la supervivencia global (SG), un aumento en el tiempo libre de enfermedad de supervivencia (DFS), un aumento en la duración de la distancia intervalo libre de recidiva (DRFI), y similares. Un aumento en la probabilidad de los  
20 resultados clínicos positivos corresponde a una disminución en la probabilidad de recurrencia del cáncer.

El término "mal pronóstico", según se usa en la presente invención, se usa para indicar un empeoramiento de cualquier medida del estado del paciente, incluso las usan normalmente  
25 en la técnica, tales como una disminución en la duración del intervalo libre de recidiva (RFI), una disminución en el tiempo de la supervivencia global (SG), una disminución en el tiempo libre de enfermedad de supervivencia (DFS), una disminución en la duración de la distancia intervalo libre de recidiva (DRFI), y similares. Un aumento en la probabilidad de que el resultado clínico negativo corresponde a un aumento en la probabilidad de recurrencia del  
cáncer.

30 En una modalidad preferida, el resultado en un paciente determinado se mide como la supervivencia libre de enfermedad.

El término "supervivencia libre de enfermedad", como se usa aquí, se refiere al tiempo transcurrido entre el tratamiento primario del cáncer y el tiempo en el que paciente sobrevive sin la aparición de signos o síntomas de la enfermedad.

Los factores pronósticos son aquellas variables relacionadas con la historia natural del cáncer colorrectal, que influyen en las tasas de recurrencia y pronóstico de los pacientes una vez que han desarrollado cáncer colorrectal. Los parámetros clínicos que se han asociado con un peor pronóstico, por ejemplo, la participación de los ganglios linfáticos y tumores de alto grado. Los factores pronósticos son frecuentemente utilizados para categorizar a los pacientes en subgrupos con diferentes riesgos basales recaída. En una modalidad preferida, el factor pronóstico clínico utilizado en el método de la invención es la etapa del tumor, etapa en que el aumento del tumor es indicativo de un mayor riesgo de recurrencia o en la que disminuye el estadio tumoral es indicativo de que el paciente muestra un riesgo bajo de recurrencia.

Los pacientes analizados de acuerdo con la presente invención, pueden haber sido tratados con una o más terapias dirigidas a disminuir el tamaño del tumor. Por lo tanto, en una realización preferida, los pacientes son tratados antes de la determinación de los niveles de expresión de los genes diferentes de acuerdo con la invención con una terapia seleccionada del grupo que consiste en quimioterapia, radioterapia o cirugía. Los términos "quimioterapia", "Radioterapia" y "cirugía" se definen a continuación en detalle y se usan con el mismo significado en el contexto de la presente invención. En una forma preferida de realización, los pacientes han sido tratados con una terapia basada en fluoropiridinas. La expresión "terapia basada en fluoropiridinas", según se usa en la presente invención, se refiere a una terapia que comprende una fluoropiridina como principio activo, e incluye tanto terapias en donde la fluoropiridina es el único principio activo como composiciones que comprenden una fluoropiridina y uno o más principios activos. El término "fluoropiridina", según se usa en la presente invención, se refiere a un agente de quimioterapia que comprende un anillo de pirimidina en donde dicho anillo se encuentra sustituido por un átomo de fluor. Ejemplos de fluoropiridinas incluyen, sin limitación, 5-fluorouracilo, floxuridina, tegafur, 5-fluoro-2'-deoxiuridina, ftorafur, emitefur, eniluracil y capecitabina. Composiciones que comprenden una fluoropiridina y uno o más principios activos incluyen, sin limitación, FOLFOX (una composición que comprende ácido folínico, 5-FU y oxaliplatino), XELOX (una composición que comprende capecitabina y oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU, leucovirin e irinotecan), S-1 (una combinación de ftorafur (una prodroga de 5-FU) y 2 moduladores de 5-FU llamados 5-cloro-2,4-dihidroxipuridine y ácido oxónico en un relación molar de 1:0.4:1). UFT (una combinación de ftorafur y uracilo en una relación molar de 1:4).

#### Métodos de terapia personalizada

Los métodos de pronóstico definido anteriormente también permiten ofrecer terapias personalizadas para los pacientes que sufren cáncer colorrectal. En particular, los pacientes considerados como que tienen un mal pronóstico son candidatos a una terapia adyuvante (tras la extirpación del tumor). Por el contrario, los pacientes que muestran un bajo riesgo de recaída pueden renunciar a un tratamiento terapéutico adicional tras la cirugía y evitarse los efectos indeseados de la terapia adyuvante.

Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método (en adelante, primer método de terapéutica personalizada de la invención) para la selección de un adecuado tratamiento para el cáncer colorrectal en un paciente que comprende la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en una muestra de dicho paciente, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 y/o una disminución en los niveles de expresión del gen GCNT3 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene que ser tratado con terapia adyuvante.

Como se usa aquí, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad recurrente o trastorno, o con el fin de prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento.

El término "cáncer colorrectal" ha sido descrito en detalle en el contexto del método pronóstico de la invención y se utiliza con el mismo significado en el contexto de los métodos personalizados de acuerdo a la invención.

En un primer paso, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación del nivel de expresión de la GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en una muestra de dicho paciente.

Los términos "cáncer colorrectal", "paciente", "gen GCNT3", "gen LPL", "gen APOC1", "gen SCD", gen "ACSL1", gen "ACSL4", "niveles de expresión", "muestra" se han descrito en detalle anteriormente, y se aplican por igual a los métodos de acuerdo con el método actual.

En una realización preferida, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de cada uno de los genes de forma individual.

En otra forma preferida de realización, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de dos en dos. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes pares de genes GCNT3 y LPL; GCNT3 y APOC1; GCNT3 y SCD; GCNT3 y ACSL1; GCNT3 y

ACSL4; LPL y APOC1; LPL y SCD; LPL y ACSL1; LPL y ACSL4; APOC1 y SCD; APOC1 y ACSL1; APOC1 y ACSL4; SCD y ACSL1; SCD y ACSL4; ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de tres en tres. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL y APOC1; GCNT3, LPL y SCD; GCNT3, LPL y ACSL1; GCNT3, LPL y ACSL4; GCNT3, APOC1 y SCD; GCNT3, APOC1 y ACSL1; GCNT3, APOC1 y ACSL4; GCNT3, SCD y ACSL1; GCNT3, SCD y ACSL4; GCNT3, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1 y SCD; LPL, APOC1 y ACSL1; LPL, APOC1 y ACSL4; LPL, SCD y ACSL1; LPL, SCD y ACSL4; LPL, ACSL1 y ACSL4; APOC1, SCD y ACSL1; APOC1, SCD y ACSL4; APOC1, ACSL1 y ACSL4; SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de cuatro en cuatro. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1 y SCD; GCNT3, LPL, APOC1 y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD y ACSL1; GCNT3, LPL, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD y ACSL1; GCNT3, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD y ACSL1; LPL, APOC1, SCD y ACSL4; LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes agrupados de cinco en cinco. Así, la invención comprende la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1, SCD, y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el método de la invención comprende adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de uno o más de uno de los genes ABCA1, APOE, FADS2, CD36 en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes ABCA1, APOE, FADS2 y/o CD36 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene que ser tratado con quimioterapia adyuvante.

Los términos "ABCA1", "APOE", "FADS2" y " CD36" se han definido en el contexto del primer método de la invención.

En una forma preferida de realización, el método de la invención comprende determinar los niveles de expresión de uno de los siguientes grupos de genes:

- 5           -       ACSL4, SCD, APOE y FADS2;
- ACSL4, SCD, ABCA1 y FADS2;
- ACSL4, SCD, ABCA1 y APOC1;
- ACSL4, ACSL1, SCD y ABCA1.
- ACSL4, ACSL1, SCD, FADS2 y ABCA1
- 10          -       ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y ABCA1
- ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y CD36
- ACSL4, SCD, FADS2, ABCA1 y CD36

Los niveles de expresión de los genes diferentes utilizados en el primer método de terapéutica personalizada de la invención se pueden determinar mediante la determinación de los niveles de mRNA codificado por los genes involucrados o por determinación de los niveles del polipéptido codificado por los genes involucrados. En un segundo paso, el método de asignación de una terapia personalizada de acuerdo con la invención comprende la identificación de aquellos pacientes que presentan un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4, solos o combinados con un aumento de expresión de los genes ABCA1, APOE, FADS2, CD36 y/o una disminución en los niveles de expresión del gen GCNT3 con respecto a un valor de referencia para dichos genes como candidatos para recibir radioterapia adyuvante o quimioterapia después del tratamiento quirúrgico o de los pacientes que muestra disminución de los niveles de expresión de los genes con respecto a un valor de referencia como un paciente que no es un candidato para recibir radioterapia o quimioterapia después de la cirugía.

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 una curación o recuperación.

Como se usa aquí el término "quimioterapia", "droga de quimioterapia" se refiere ampliamente a la utilización de un medicamento químico o una combinación de ambos para el tratamiento del cáncer, tumores o neoplasias malignas, incluyendo tanto los 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);
- 5 - Fármacos antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, la capecitabina, la 6-mercaptopurina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, fludarabina o pemetrexed);
- Antibióticos anti-tumor (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
- 10 - Inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, etopósido, tenipósido, topotecan, irinotecan, o diflomotecan elomotecan).

El término "radioterapia" es un término comúnmente utilizado en la técnica para referirse a varios tipos de terapia de radiación, incluidas las terapias de radiación interna y externa, o radioinmunoterapia, y el uso de varios tipos de radiaciones como los rayos X, rayos gamma, partículas alfa, beta partículas, los fotones, electrones, neutrones, radioisótopos, y otras formas de radiaciones ionizantes.

En una modalidad preferida, el tratamiento es la quimioterapia adyuvante o neoadyuvante.

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 una paciente con un cáncer. La razón más común para la terapia neoadyuvante es reducir el tamaño del tumor con el fin de facilitar una cirugía más efectiva. Terapias neoadyuvante incluyen radioterapia y, de preferencia la terapia sistémica, como la terapia hormonal, quimioterapia, inmunoterapia y terapia con anticuerpos monoclonales.

El término "terapia adyuvante", como se usa aquí, se refiere a cualquier tipo de tratamiento del cáncer (por ejemplo, la quimioterapia o la radioterapia) como tratamiento adicional, por lo general después de la resección quirúrgica del tumor primario, en una paciente con un cáncer que se encuentra en riesgo de metástasis y / o probable que se repita. El objetivo de este tipo de tratamiento adyuvante para mejorar el pronóstico. Las terapias adyuvantes incluyen radioterapia y, preferentemente, la terapia sistémica, como la terapia hormonal, quimioterapia, inmunoterapia y terapia con anticuerpos monoclonales.

En una forma preferida de realización, la terapia es una quimioterapia distinta a una terapia basada en fluoropiridinas. Las expresiones "terapia basada en fluoropiridinas" y "fluoropiridina", se han descrito en detalle en relación al método pronóstico de la invención y se usan en el contexto del presente método con el mismo significado.

Kits de la invención

5 En otra realización, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4.

10 En el contexto de la presente invención, "kit" se entiende como un producto que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención adaptado para permitir su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para el embalaje de los componentes del kit incluyen (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares) de cristal, plástico, botellas, frascos, papel, sobres, etc. Además, los kits de la invención puede contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separada, de los diferentes componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden ser en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de  
15 manera que puedan ser leídos por un tema, como los medios electrónicos de almacenamiento (discos magnéticos, cintas y similares), los medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios de comunicación pueden contener las direcciones de Internet que ofrecen dichas instrucciones.

20 La expresión "reactivo que permite determinar el nivel de expresión de un gen" significa un compuesto o grupo de compuestos que permite determinar el nivel de expresión de un gen, tanto por medio de la determinación del nivel de ARNm como por medio de la determinación del nivel de de la proteína. Por lo tanto, los reactivos del primer tipo incluyen sondas capaces de hibridar específicamente con el ARNm codificado por los genes involucrados. Los reactivos del segundo tipo son compuestos que se unen específicamente a las  
25 proteínas codificadas por los genes marcadores y, preferentemente, se incluyen los anticuerpos, aunque pueden ser aptámeros específicos.

30 En una realización preferida, los reactivos adecuados para la determinación de niveles de expresión de uno o más genes comprenden al menos un 10%, al menos 20%, al menos 30%, menos un 40%, al menos 50%, menos el 60% , por lo menos 70%, por lo menos un 80%, por lo menos el 90% o menos del 100% del importe total de los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de los genes que forman el kit. Así, en el caso particular de kits que comprenden los reactivos para la determinación de los niveles de expresión de los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4, los reactivos específicos para dicho gen (por ejemplo, las sondas que son capaces de hibridar bajo  
35 condiciones estrictas con los ARNm codificados por los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD,

ACSL1 y/o ACSL4) comprenden al menos un 10%, al menos 20%, al menos 30%, menos un 40%, al menos 50%, menos el 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80 %, por lo menos el 90% o menos el 100% de las sondas presentes en el kit.

5 En otras realizaciones, los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de uno o más genes comprenden al menos un 55% por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, menos el 75%, 80% como mínimo, en por lo menos 90%, al menos el 95%, por lo menos 96%, al menos el 97%, por lo menos un 98% o menos el 99% del importe total de los reactivos que forman el kit.

10 En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene reactivos adecuados para la determinación de al menos dos de los genes marcadores. Así, la invención comprende kits que comprenden reactivos adecuados para la determinación de los siguientes pares de genes GCNT3 y LPL; GCNT3 y APOC1; GCNT3 y SCD; GCNT3 y ACSL1; GCNT3 y ACSL4; LPL y APOC1; LPL y SCD; LPL y ACSL1; LPL y ACSL4; APOC1 y SCD; APOC1 y ACSL1; APOC1 y ACSL4; SCD y ACSL1; SCD y ACSL4; ACSL1 y ACSL4.

15 En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene reactivos adecuados para la determinación de al menos tres de los genes marcadores. Así, la invención comprende kits que comprenden reactivos adecuados para la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL y APOC1; GCNT3, LPL y SCD; GCNT3, LPL y ACSL1; GCNT3, LPL y ACSL4; GCNT3, APOC1 y SCD; GCNT3, APOC1 y ACSL1; GCNT3, APOC1 y ACSL4; GCNT3, SCD y ACSL1; GCNT3, SCD y ACSL4; GCNT3, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1 y SCD; LPL, APOC1 y ACSL1; LPL, APOC1 y ACSL4; LPL, SCD y ACSL1; LPL, SCD y ACSL4; LPL, ACSL1 y ACSL4; APOC1, SCD y ACSL1; APOC1, SCD y ACSL4; APOC1, ACSL1 y ACSL4; SCD, ACSL1 y ACSL4.

20 En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene reactivos adecuados para la determinación de al menos cuatro de los genes marcadores. Así, la invención comprende kits que comprenden reactivos adecuados para la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1 y SCD; GCNT3, LPL, APOC1 y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD y ACSL1; GCNT3, LPL, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD y ACSL1; GCNT3, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD y ACSL1; LPL, APOC1, SCD y ACSL4; LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

25 En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene reactivos adecuados para la determinación de al menos cinco de los genes marcadores. Así, la invención

comprende kits que comprenden reactivos adecuados para la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1, SCD, y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

5 En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene reactivos adecuados para la determinación de al menos cinco de los genes marcadores. Así, la invención comprende kits que comprenden reactivos adecuados para la determinación de los siguientes grupos de genes: GCNT3, LPL, APOC1, SCD, y ACSL1; GCNT3, LPL, APOC1, SCD y ACSL4; GCNT3, LPL, APOC1, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, LPL, SCD, ACSL1 y ACSL4; GCNT3, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4; LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4;

10 En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene reactivos adecuados para la determinación de los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

En otra forma preferida de realización, el kit de la invención contiene adicionalmente reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de uno o más de uno genes seleccionados del grupo ABCA1, APOE, FADS2 y CD36.

15 En formas preferidas de realización, el kit de la invención comprende reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de los siguientes grupos de genes:

- ACSL4, SCD, APOE y FADS2;
- ACSL4, SCD, ABCA1 y FADS2;
- 20 - ACSL4, SCD, ABCA1 y APOC1;
- ACSL4, ACSL1, SCD y ABCA1.
- ACSL4, ACSL1, SCD, FADS2 y ABCA1
- ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y ABCA1
- ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y CD36
- 25 - ACSL4, SCD, FADS2, ABCA1 y CD36

En una realización particular de los kit de la invención, los reactivos del kit son los ácidos nucleicos que son capaces de detectar específicamente el nivel de mRNA de los genes mencionados anteriormente y/o el nivel de proteínas codificadas por uno o más de los genes mencionados anteriormente. Dicha detección se consigue gracias a la capacidad de los ácidos nucleicos de hibridar específicamente con los genes antes mencionados. Los ácidos nucleicos que forman parte del kit de la invención pueden ser sondas que reconocen de forma específica los genes diana o pueden ser uno o más pares de oligonucleótidos cebadores para la amplificación específica de fragmentos de los ARNm (o de sus correspondientes ADNc) de dichos genes.

En una modalidad preferida, el primer componente del kit de la invención comprende una sonda que se pueden hibridar específicamente a los genes mencionados anteriormente.

El término "hibridación específica", como se usa aquí, se refiere a las condiciones que permiten la hibridación de dos polinucleótidos en condiciones altamente rigurosas o condiciones moderadamente rigurosas.

"Rigor" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por un experto en la materia, y por lo general es un cálculo empírico depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para el recocido adecuado, mientras más corto sondas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado de reanillarse cuando las hebras complementarias están presentes en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridizable, mayor es la temperatura relativa, que puede ser utilizado. Como resultado, se deduce que las temperaturas más altas en relación tenderían a hacer que las condiciones de reacción más astringentes, mientras que las temperaturas más bajas no tanto. Para obtener más detalles y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones de alta rigurosidad", tal como se define en la presente invención, implican, por lo general: (1) fuerza iónica baja y alta temperatura para el lavado, por ejemplo de cloruro de sodio 0,015 /citrate de sodio 0.0015 M /0.1% dodecil sulfato de sodio a 50 ° C ., (2) emplean durante la hibridación de un agente de desnaturalización, tales como formamida, por ejemplo, el 50% (v / v) formamida con 0,1% de albúmina de suero bovino /0.1% Ficoll/0.1% polivinilpirrolidone/ tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro de sodio a 750 mM, 75 mM de citrato sódico a 42 ° C, o (3) emplean el 50% formamida, 5xSSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sodio), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 veces solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 mg / ml), 0,1% SDS, y el 10% de sulfato de dextrano a 42 ° C, con lavados a 42 ° C en 0.2xSSC (cloruro sódico / citrato de sodio) y el 50% de formamida, seguido por un lavado de alto rigor que consiste en 0.1xSSC contiene EDTA a 55° C.

"Condiciones moderadamente rigurosas" pueden ser identificados según lo descrito por Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y las condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y% SDS) menos estrictas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de las condiciones moderadamente rigurosas es la incubación

durante la noche a 37 ° C en una solución que comprende: un 20% formamida, 5xSSC (150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, 10% de sulfato de dextrano, y 20 mg / ml de DNA desnaturalizado esquilada de esperma de salmón, seguido por el lavado de los filtros en 1xSSC a unos 37-50° C. El experto en la materia reconocen la forma de ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para dar cabida a factores como la longitud de la sonda y similares.

En el caso de que los niveles de expresión de varios de los genes identificados en la presente invención se determinen al mismo tiempo, es útil incluir las sondas para todos los genes cuya expresión es que se determinará en una hibridación de micromatrices.

Las micromatrices comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos que son distribuidos espacialmente y asociados de forma estable a un soporte (por ejemplo, un biochip). Los ácidos nucleicos tienen una secuencia complementaria a subsecuencias particulares de genes cuya expresión se debe detectar, de forma que son capaces de hibridar con dichos ácidos nucleicos. En los métodos de la invención, una micromatriz que comprende un conjunto de ácidos nucleicos se pone en contacto con una preparación de los ácidos nucleicos aislados del paciente objeto del estudio. La incubación de las micromatrices en la preparación de los ácidos nucleicos se lleva a cabo en las condiciones adecuadas para la hibridación. Posteriormente, tras la eliminación de los ácidos nucleicos que no se han unido al soporte, se detecta el patrón de hibridación, lo que proporciona información sobre el perfil genético de la muestra analizada. A pesar de que las micromatrices son capaces de proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa de los ácidos nucleicos presentes en una muestra, la invención requiere el uso de matrices y metodologías capaces de proporcionar información cuantitativa.

La invención contempla una variedad de matrices en relación con el tipo de sondas y en relación con el tipo de soporte utilizado. Las sondas incluidas en las matrices que son capaces de hibridar con los ácidos nucleicos pueden ser ácidos nucleicos o análogos de los mismos que mantienen la capacidad de hibridación, como por ejemplo, los ácidos nucleicos en el que ha sido el enlace fosfodiéster sustituido con un fosfortioato, metilimina, metilfosfonato, fosforamidato, ácidos nucleicos en los que se sustituye la ribosa de los nucleótidos por otra hexosa, péptido nucleico (APN). La longitud de las sondas pueden de 5 a 50 nucleótidos y, preferiblemente, de 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, los nucleótidos 100 y varían en el rango de 10 a 1000 nucleótidos, preferiblemente en el intervalo de 15 a 150 nucleótidos, más preferiblemente en el rango de 15 a 100 nucleótidos y ácidos nucleicos pueden ser de cadena simple o de doble hebra. La matriz puede contener todas las sondas específicas de un determinado ARNm de una cierta longitud o pueden

contener sondas seleccionadas de diferentes regiones de un ARNm. Cada sonda se analiza en paralelo con una sonda con una base de cambio, de preferencia en una zona céntrica de la sonda. La matriz se pone en contacto con una muestra que contiene los ácidos nucleicos con secuencias complementarias a las sondas de la matriz y la señal de hibridación con cada una de las sondas y los controles de hibridación correspondiente se determina. Las sondas en el que se observa una mayor diferencia entre la señal de hibridación con la sonda y su control de hibridación son seleccionados. El proceso de optimización puede incluir una segunda ronda de optimización en el que se hibrida la matriz de la hibridación con una muestra que no contiene secuencias complementarias a las sondas de la matriz. Después de la segunda ronda de selección, las sondas con las señales de hibridación inferior a un umbral serán seleccionados. Por lo tanto, las sondas que pasan los controles, es decir, que muestran un nivel mínimo de hibridación no específica y un nivel máximo de hibridación específica con el ácido nucleico diana se seleccionan.

Las micromatrices de la invención no sólo contienen sondas específicas para los polinucleótidos que indica una determinada situación fisiopatológica, sino que también contiene una serie de sondas de control, que puede ser de tres tipos: los controles de la normalización, control de nivel de expresión y los controles de hibridación.

En el caso particular de los controles de expresión, es útil el uso de sondas que reconocen de forma específica genes que codifican las proteínas que ejercen funciones esenciales de la célula y que, por tanto, muestran una expresión constante a lo largo del ciclo celular. De forma orientativa, se pueden usar genes tales como  $\beta$ -2-microglobulina 18S ubiquitina, proteína ribosomal, la ciclofilina A, receptor de la transferrina, la actina, GAPDH, tirosina 3 - monooxigenasa / triptófano 5-monooxigenasa activación de la proteína (YWHAZ) y beta-actina.

Los microarrays pueden ser matrices de alta densidad, obtenidas por fijación de miles de oligonucleótidos usando fotolitografía (Fodor et al., 1991, Science, 767 a 773). Este tipo de matrices suelen ser redundante, es decir, se incluyen varias sondas para cada ARNm que ha de ser detectado. En una realización preferida, las matrices son matrices de baja densidad o LDA contienen menos de 10.000 sondas por centímetro cuadrado. En dichas matrices de baja densidad, las sondas de diferentes aplicados manualmente con la ayuda de una pipeta en diferentes lugares de un soporte sólido (por ejemplo, una superficie de cristal, una membrana). Los soportes utilizados para fijar las sondas pueden ser obtenidos a partir de una gran variedad de materiales, como plástico, cerámica, metales, geles, membranas, cristales, etc. Los microarrays se pueden obtener con cualquier metodología conocida por el experto en el arte.

Después de la hibridación, en los casos en que el ácido nucleico no hibridado es capaz de emitir una señal en el paso de detección, se usa una etapa previa de lavado para eliminar dichos ácidos nucleicos no hibridados. La etapa de lavado se lleva a cabo utilizando métodos y soluciones conocidos por el experto en la materia.

5 En el caso de que los niveles de expresión de los genes de acuerdo con la presente invención se determinen mediante la medición de los niveles del polipéptido o polipéptidos codificados por dicho gen o genes, los kits de acuerdo con la presente invención comprenden reactivos que son capaces de unirse específicamente a dicho polipéptido o polipéptidos. Así, en una realización, la invención se refiere a un kit que comprende  
10 anticuerpos específicos para el polipéptido codificado por los genes GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4.

Para ello, es posible el empleo de matrices de anticuerpos como los descritos por De Wildt et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:989-994; Lueking et al. (1999) Anal. Biochem. 270:103-111; Ge et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28, e3, I-VII; MacBeath y Schreiber (2000) Ciencia  
15 289:1760-1763, WO01/40803 y WO 99/51773A1 son útiles. Los anticuerpos de la matriz incluyen cualquier agente inmunológico capaz de unirse a un ligando de alta afinidad, incluyendo IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, así como moléculas similares a los anticuerpos que tiene un sitio de unión al antígeno, tales como Fab', Fab, F(ab')<sub>2</sub>, los anticuerpos de dominio único o DABS, Fv, scFv y similares. Las técnicas para la preparación de dichos  
20 anticuerpos son muy bien conocidos por el experto en la técnica e incluyen los métodos descritos por Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons (1992)).

En otro aspecto, la invención se refiere a la utilización de un kit de la invención para determinar el pronóstico de un paciente que sufre de cáncer colorrectal o para determinar si  
25 un paciente con cáncer colorrectal es el candidato a la terapia adyuvante. En una modalidad preferida, el uso de los kits de acuerdo con la invención se lleva a cabo en pacientes con estadio II o estadio III CCR.

#### Métodos terapéuticos

30 En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un agente inhibidor de un gen seleccionado del grupo formado por LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En otro aspecto, la invención se refiere a un agente inhibidor de un gen seleccionado del grupo formado por LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4 para su uso en el tratamiento del  
35 cáncer.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para el tratamiento del cáncer en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de un agente inhibidor de un gen seleccionado del grupo formado por LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

El término “inhibidor de un gen”, según se usa en la presente invención, se refiere tanto a un compuesto capaces de provocar una disminución de la actividad del producto de expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4 así como a compuestos capaces de provocar una disminución de la expresión de dichos genes, bien inhibiendo la transcripción del correspondiente gen, bien inhibiendo la traducción del correspondiente ARNm o bien provocando una disminución de los niveles de los correspondientes ARNhn o ARNm.

En una forma preferida de realización, el inhibidor de los genes ACSL1 y ACSL4 se selecciona del grupo formado por los inhibidores de la Tabla 1.

|   |
|---|
| Triacsin C  |
| Valproato o ácido valproico.  |
| Compuestos de la familia de las tiazolidinedionas, (por ejemplo troglitazone, rosiglitazone y pioglitazone).              |
| Enoximone   |
| Antiinflamatorios no esteroideos (por ejemplo ácido 2-arilpropiónico, ibuprofeno, fenoprofeno, quetoprofeno y naproxeno). |

**Tabla 1:** Inhibidores de ACSL1 y ACSL4. El valproato o ácido valproico: es un inhibidor específico de ACSL4, las tiazolidinedionas son inhibidores específicos de ACSL4.

En una forma preferida de realización, el inhibidor de APOC1 es Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid o SAHA).

En una forma preferida de realización, el inhibidor del gen SCD se selecciona del grupo formado por los inhibidores de la Tabla 2

|   |
|---|
| Rapamicina  |
| Piperazina  |
| 3-(2-hidroxietoxi)-N-(5-benziltiazol-2-il)-benzamidias  |
| 3-[4- (2-cloro-5-fluorofenoxi)-1 -piperidinil]-6- (5-metil-1,3,4-oxadiazol-2-yl)- piridazina                                |
| Ácido 5- (tetradeciloxi)-2- furancarboxílico o TOFA   |
| (N- (2- (6- (3,4-diclorobenzilamino)-2 -(4 -methoxifenil)-3-oxopirido[2,3-b] pirazina-4(3H)- yl)etil) acetamida o CVT-11127 |
| 1-(4-fenoxipiperidin-1-il)-2-arilaminoetanona   |
| 4-(2-Clorofenoxi)-N-(3-(3-metilcarbamoil)fenil)piperidina-1-carboxamida   |
| Ácido 2-(5-(3-(4-(2-bromo-5-fluorofenoxi)piperidin-1-il)isoxazol-5-il)-2H-tetrazol-2-il)acético MK-8245                     |

**Tabla 2:** Inhibidores de SCD

En una forma preferida de realización, el inhibidor del gen LPL se selecciona del grupo formado por los inhibidores de la Tabla 3

|  |
|--|
| TNF- $\alpha$  |
| Poloxamer 407 (P-407 o Pluronic F-127)   |
| Tetrahidrolipstatina (THL)   |
| Tyloxapol  |
| Angiopietin-like protein 3 (ANGPTL3)   |
| Angiopietin-like protein 4 (ANGPTL4)   |
| Inhibidor de LPL derivado de melanoma (MLPLI)  |
| APOC1  |
| Orlistat o S)-((S)-1-((2S,3S)-3-hexil-4-oxooxetan-2-il)tridecan-2-il) 2-formamido-4-methylpentanoato |
| GSK 264220A o N-[2-Metil-5-(1-piperidinilsulfonil)-3-furanil]-N'-fenilurea                           |

**Tabla 3:** Inhibidores de LPL

5

En una forma preferida de realización, el agente inhibidor es un anticuerpo inhibidor específico para el producto codificado por dicho gen. En otra forma preferida de realización, el inhibidor se selecciona del grupo formado por un oligonucleotido antisentido específico

para dicho gen, un ARN de interferencia específico para dicho gen y una ribozima específica para dicho gen.

En una forma preferida de realización, el agente inhibidor para su uso en la presente invención es un anticuerpo inhibidor específico para el producto codificado por un gen seleccionado del grupo formado por LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

Los anticuerpos contra un epítipo de las proteínas codificadas por genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4 pueden bloquear la función de estas proteínas de forma eficaz y, por lo tanto, se pueden usar como inhibidores en las composiciones de la presente invención. “Anticuerpo inhibidor” como se usa aquí, se refiere a anticuerpos que son capaces de inhibir al menos parcialmente las actividades biológicas de los polipéptidos codificados por los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4.

La determinación de la capacidad inhibidora sobre la actividad biológica del producto codificado por LPL se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando el método descrito por Mayes y Felts (Biochem. J., 1968, 108,483-487) basado en la determinación de la capacidad del anticuerpo para inhibir la degradación de triglicéridos en presencia de LPL.

La determinación de la capacidad inhibidora sobre la actividad biológica del producto codificado por SCD se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando el método descrito por Strittmatter et al. (J. Biol. Chem. 1988, 263; 2532-2535) basado en la determinación de la capacidad del anticuerpo para inhibir la degradación de fosfatidilcolina en presencia de SCD.

La determinación de la capacidad inhibidora sobre la actividad biológica del producto codificado por ACSL1 o ACSL4 se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando el método descrito por Gassler et al. (Gastroenterology, 2007, 133: 587-98) basado en la determinación de la capacidad del anticuerpo para inhibir la síntesis de palmitoil-CoA a partir de ácido palmítico y CoA en presencia de ACSL1 o ACSL4.

Los anticuerpos o fragmentos inhibidores específicos para los polipéptidos codificados por los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4 se pueden adquirir de forma comercial o se pueden producir fácilmente usando técnicas convencionales de biología molecular. Anticuerpos inhibidores adecuados incluyen, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab' y scFv de los mismos, anticuerpos biespecíficos, heteroconjugados, diacuerpos, anticuerpos humanos y humanizados.

En otra forma preferida de realización, el agente inhibidor es un ARN de interferencia (ARNi) específico para el silenciamiento de un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4. ARNs de interferencia adecuados para el silenciamiento de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 incluyen, sin limitación,

ARN de interferencia pequeños (ARNip), micro ARN (miARN) y ARN horquillados cortos (ARNhc).

En otra forma de realización, la inhibición de la expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 se lleva a cabo mediante el uso de ribozimas diseñadas para cortar de forma catalítica transcritos de ARNm dianas generados por la transcripción de los distintos genes. Tipos de ribozimas adecuados para la inhibición de la expresión de los genes incluyen, sin limitación, ribozimas de cabeza de martillo y ARN endorribonucleasa (ribozimas de tipo Cech)

En otra forma preferida de realización, el agente inhibidor es un ácido nucleico antisentido específico para un gen seleccionado del grupo formado por LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y ACSL4. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir al gen que se desea inhibir mediante complementariedad de bases convencional, o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario, a través de interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren a la gama de técnicas generalmente empleadas en la técnica, e incluyen cualquier método que se basa en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos. Moléculas de ácidos nucleicos ejemplares para su uso como oligonucleótidos antisentido incluyen:

- Oligonucleótidos que comprenden bases modificadas tales como 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxietil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.
- Oligonucleótidos que comprenden azúcares modificados tales como arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.
- Oligonucleótidos que comprenden un esqueleto de fosfato modificado seleccionado del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforoditioato, un

fosforamidato, un fosforamidato, un fosfordiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster de alquilo, y un formacetal o un ácido nucleico peptídico (ANP)

- Oligonucléotidos modificados mediante la incorporación de agentes que facilitan su transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987; Publicación de PCT No. WO88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación de PCT No. WO89/10134), agentes de corte desencadenado por hibridación (ver, por ejemplo, Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988) agentes intercalantes (ver, por ejemplo, Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988).
- Oligonucleótidos alfa-anoméricos
- Oligonucleótidos morfolino

En otra forma preferida de realización, el inhibidor de la expresión de los genes LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 es una enzima de ADN.

Los términos "cáncer" y "tumor" se refieren a la condición fisiológica en mamíferos caracterizada por el crecimiento celular desregulado. Tipos de cáncer que pueden ser tratado de acuerdo a los métodos de la presente invención incluyen, sin limitación, cáncer de esófago, estómago, hígado, páncreas, vesícula biliar, intestino delgado, recto, colon, colorrectal, próstata, pulmón, ovario y mama. En una realización preferida de la invención el tumor/cáncer a ser tratado con dichas composiciones es cáncer de colon. En otra realización preferida de la invención el tumor/cáncer a ser tratado con dichas composiciones es cáncer de mama.

\*\*\*

La invención se detalla a continuación por medio de los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos y de ninguna manera limitar el alcance de la invención.

## EJEMPLOS

### *Materiales y métodos*

Muestras de tejido tumoral embebidas en parafina de pacientes con cáncer de colon en estadio B procedentes del Hospital Universitario La Paz de Madrid fueron utilizadas. El estudio realizado consiste en un análisis retrospectivo del valor pronóstico de la expresión de GCNT3, LPL, APOC1, SCD, ACSL1 y/o ACSL4 en estos pacientes. El tiempo hasta la progresión fue utilizado para el análisis de supervivencia libre de enfermedad. Curvas ROC

(receiver operating characteristic) se utilizaron para determinar los valores de corte de expresión de estos genes para supervivencia libre de enfermedad según la relación entre sensibilidad y ratio de falsos positivos (1- especificidad), estableciendo la mejor combinación marcada por las curvas ROC. El método Kaplan-Meier fue utilizado para estimar la supervivencia libre de enfermedad. Todos los valores de p referidos son de dos colas. La significancia estadística se definió como  $p < 0.05$ . El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS (versión 19.0).

83 pacientes con cáncer de colon en estadio B han sido incluidos en este estudio, con una mediana de supervivencia por cáncer de 69 meses. La mediana de supervivencia libre de enfermedad en estos pacientes es de 60 meses, encontrándose 22 pacientes (26,5%) con recaída en el momento del análisis. Las características clínicas y patológicas de esta serie de pacientes se incluyen en la Tabla 4.

|                     |          |           |
|---------------------|----------|-----------|
| Estadio tumoral:    | B        | 83 (100%) |
| Sexo                | Mujer    | 34 (41%)  |
|                     | Hombre   | 49 (59%)  |
| Grado dif.:         | Pobre    | 5 (6%)    |
|                     | Moderado | 71 (8%)   |
|                     | Bien     | 6 (7%)    |
| Desmoplasia:        | No       | 37 (44%)  |
|                     | Si       | 29 (35%)  |
| Invasión vascular   | No       | 57 (69%)  |
|                     | Si       | 25 (30%)  |
| Quimioterapia       | No       | 34 (41%)  |
| (UFT-LV, xeloda)    | Si       | 49 (59%)  |
| Edad en diagnóstico | Mediana: | 69        |
|                     | Mínimo:  | 32        |
|                     | Máximo:  | 86        |

**Tabla 4.** Características de los pacientes

*Ejemplo 1. Valor pronóstico del gen LPL en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.*

Como se puede observar en la Figura 1, los pacientes con niveles más altos de LPL presentan de forma significativa menor supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.006$ ) y menor supervivencia global (muerte por cáncer) ( $p=0.04$ ) que aquéllos con niveles de más bajos. El incremento de riesgo de recaída y muerte por cáncer en estos pacientes es de tres veces superior a los pacientes con niveles bajos de LPL ( $HR=3.3$  y  $3.2$  respectivamente). La estratificación de los pacientes según hayan recibido o no quimioterapia no tiene influencia

en los datos manteniéndose los HR en ambos casos. Estos resultados señalan que la sobre-expresión LPL tiene tanto un valor pronóstico como predictivo de la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

5 *Ejemplo 2: Valor pronóstico del gen APOC1 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.*

Como se puede observar en la Figura 2, los pacientes con niveles más altos de APOC1 presentan de forma significativa menor supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.02$ ), y menor supervivencia global ( $p=0.009$ ) que aquéllos con niveles de más bajos. El incremento de riesgo de recaída y muerte por cáncer es de más de dos veces superior para pacientes con niveles altos de APOC1 (HR=2.6 y 4.7 respectivamente). La estratificación de los pacientes según hayan recibido o no quimioterapia no tiene influencia en los datos manteniéndose los HR en ambos casos. Estos resultados señalan que la sobre-expresión de APOC1 tiene tanto un valor pronóstico como predictivo de la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

15 *Ejemplo 3: Valor pronóstico del gen SCD en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.*

Como se puede observar en la Figura 3, los pacientes con niveles más altos de SCD presentan de forma significativa menor supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.02$ ), y menor supervivencia global ( $p=0.03$ ) que aquéllos con niveles de más bajos. El incremento de riesgo de recaída y muerte por cáncer es de más de dos veces superior para pacientes con niveles altos de SCD (HR=2.6 y 3.3 respectivamente). La estratificación de los pacientes según hayan recibido o no quimioterapia no tiene influencia en los datos manteniéndose los HR en ambos casos. Estos resultados señalan que la sobre-expresión de SCD tiene tanto un valor pronóstico como predictivo de la respuesta al tratamiento en estos pacientes.

25 *Ejemplo 4: Valor pronóstico de los genes ACSL1 y ACSL4 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.*

Como se puede observar en la Figura 4A, los pacientes con niveles más altos de ACSL1 presentan de forma significativa menor supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.02$ ), y menor supervivencia global ( $p=0.03$ ) que aquéllos con niveles de más bajos. El incremento de riesgo de recaída y muerte por cáncer es de más de dos veces superior para pacientes con niveles altos de ACSL1 (HR=2.6 y 3.1 respectivamente). La estratificación de los pacientes según hayan recibido o no quimioterapia seguida del correspondiente análisis multivariante muestra una interacción significativa ( $p=0.032$ ), indicando que mientras que la sobre-

expresión de ACSL1 no tiene influencia en la recaída o supervivencia de los pacientes que no han recibido quimioterapia, se produce un incremento de casi 10 veces del factor de riesgo de recaída en aquellos pacientes que si han recibido quimioterapia y tienen sobre-expresado ACSL1, con un HR=9.8 ( $p=0.009$ ) (Figura 4B). Estos resultados indican que la sobre-expresión de ACSL1 tiene un marcado valor predictivo de un fallo en la respuesta al tratamiento con fluoropirimidinas orales (UFT, xeloda) de pacientes con cáncer de colon.

Con el fin de validar estos datos, se utilizaron muestras de tumores de una segunda serie de 58 pacientes con cáncer de colon en estadio B (serie de validación) procedentes del Hospital Universitario La Paz, todos ellos tratados con tratamientos comprendiendo también fluoropirimidinas orales (FOLFOX o XELOX). Las características clínicas y patológicas de esta serie de pacientes se incluyen en la Tabla 5.

|                                |          |           |
|--------------------------------|----------|-----------|
| Estadio tumoral:               | B        | 58 (100%) |
| Sexo:                          | Mujer    | 22 (38%)  |
|                                | Hombre   | 36 (62%)  |
| Grado dif.:                    | Pobre    | 5 (8%)    |
|                                | Moderado | 43(74%)   |
|                                | Bien     | 10 (17%)  |
| Invasión vascular              | No       | 46 (79%)  |
|                                | Si       | 12 (21%)  |
| Quimioterapia: (Xelox, Folfox) | Si       | 58 (100%) |
| Edad en diagnóstico            | Mediana  | 60        |
|                                | Mínimo   | 23        |
|                                | Máximo   | 77        |

**Tabla 5.** Características de los pacientes de la serie de validación.

Como se puede observar en la Figura 4C, los pacientes con sobre-expresión de ACSL1, a pesar de haber recibido el mismo tratamiento, recaen significativamente antes ( $p=0.025$ ), y, consecuentemente tienen una supervivencia menor ( $p=0.04$ ), que aquéllos pacientes con bajos niveles de ACSL1. Estos resultados confirman que ACSL1 es un factor predictivo de respuesta a los tratamientos convencionales aplicados en pacientes con cáncer de colon en estadios no avanzados.

ACSL4 es una isozima de la familia de ACSL1. Dentro de estos dos miembros de la familia, hemos observado una correlación significativa entre ACSL1 y ACSL4 (correlacion de Spearman 0.5,  $p=0.002$ ), indicando que ambos genes tienen tendencia a “coexpresar” en los mismos pacientes. Sin embargo, al ser un valor de correlación no cercano a 1, estos resultados indican el interés en analizar ambos genes para tener una visión global del valor

marcador de esta ruta. Al hacer la determinación del valor pronóstico de ACSL4, observamos que los pacientes con niveles más altos de ACSL4 presentan de forma significativa menor supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.0001$ ), y menor supervivencia global ( $p=0.001$ ) que aquéllos con niveles de más bajos. El incremento de riesgo de recaída y muerte por cáncer es de más de cuatro veces superior para pacientes con niveles altos de ACSL4 (HR=4.39 y 5.7 respectivamente) (Figura 5A). La estratificación de los pacientes según hayan recibido o no quimioterapia no presenta una interacción significativa, pero si es de mayor magnitud en aquéllos pacientes que no han recibido quimioterapia (Figura 5B) (manteniéndose también un comportamiento cualitativamente semejante en los pacientes tratados). Estos resultados señalan que la sobre-expresión de ACSL4 tiene tanto un valor pronóstico (con mayor magnitud), como predictivo de la respuesta al tratamiento en estos pacientes. Por tanto, estos resultados indican que la determinación de ACSL1 y ACSL4 (simultánea, o no) en pacientes con cáncer de colon en estadios no avanzados provee una importante información tanto aditiva como complementaria sobre el pronóstico de los pacientes (más marcada por ACSL4) y su respuesta a la terapia convencional (más marcada por ACSL1).

*Ejemplo 5. Valor pronóstico del gen GCNT3 en muestras clínicas de pacientes con cáncer de colon.*

Como se puede observar en la Figura 6, los pacientes con niveles más bajos de GCNT3 presentan de forma significativa menor supervivencia libre de enfermedad que aquéllos con niveles de más altos. La mediana de supervivencia libre de enfermedad de los pacientes con bajos niveles del gen GCNT3 es de 25 meses, mientras que no se alcanza en los pacientes con niveles de GCNT3 por encima del punto de corte establecido por la curva ROC ( $p=0.001$ ). Estos resultados señalan que la baja expresión de GCNT3 tiene valor marcador de mal pronóstico en pacientes con cáncer de colon no avanzado.

*Ejemplo 6. Valor pronóstico de las combinaciones de distintos genes*

Un análisis utilizando el paquete "survival" del software R en el que se ha analizado la supervivencia mediante un análisis multivariante de COX tras discretizar las variables y hacer comparaciones de K-means de parejas de genes, indica que la combinación de algunos de estos genes aumenta la potencia predictiva del test (tabla 6).

| Gene1               | Gene2            | pValue.ger | pValue.ger | pValue   |
|---------------------|------------------|------------|------------|----------|
| APOC1.Hs00155790 m  | SCD.Hs01682761 m | 0.033053   | 0.001048   | 0.000019 |
| ACSL1.Hs00253457 m1 | SCD.Hs01682761 m | 0.006501   | 0.001048   | 0.000123 |
| ACSL4.Hs01547083 m1 | SCD.Hs01682761 m | 0.080951   | 0.001048   | 0.000831 |
| ACSL1.Hs00253457 m1 | APOC1.Hs00155790 | 0.006501   | 0.033053   | 0.001247 |

**Tabla 6.** Análisis multivariante de COX del valor como marcador pronóstico de la combinación de parejas de genes.

*Ejemplo 7. Valor pronóstico de las combinaciones de estos genes con cuatro genes adicionales implicados en rutas metabólicas cercanas.*

Posteriormente se realizó un análisis multivariante incluyendo a otros 31 genes de rutas metabólicas relacionadas, que individualmente, aunque marcaban cierta tendencia a tener un valor predictivo, no presentaban un valor marcador significativo y validado. Con este análisis se buscaba encontrar una “huella metabólica” marcadora de pronóstico en pacientes con cáncer de colon según un índice pronóstico derivado de un modelo de regresión de Cox. Para ello, se realizó un análisis de Validación Cruzada (CV, Cross-Validation), utilizando 5-fold CV, en el que se observa como combinaciones de ACSL1, ACSL4, SCD, LPL y/o APOC1 con APOE, FADS2, ABCA1 y/o CD36, incrementan significativamente el valor predictivo el test. Mientras que el análisis individual de uno de los genes marcadores señala un riesgo de recaída máximo de 7 veces en un paciente positivo frente a otro que no lo es, el hecho de determinar también la expresión de estos genes adicionales que por sí solos no marcan respuesta, incrementa la el valor pronóstico identificando pacientes que tienen 19 veces más riesgo de recaer que los que no presentan esta huella (Tabla 7).

| Gene1        | Gene4      | Gene3        | Gene4        | Gene5        | C.INDEX      | HR<br>signature | p(test) validation | p(val)      |               |
|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|--------------------|-------------|---------------|
| <b>ACSL4</b> | <b>SCD</b> | <b>ABCA1</b> | <b>FADS2</b> |              | <b>0.79</b>  | <b>12.96</b>    | <b>0</b>           | <b>4.91</b> | <b>0.001</b>  |
| ACSL4        | SCD        | APOE         | FADS2        |              | 0.796        | 12.79           | 0                  | 3.96        | 0.0093        |
| ACSL4        | SCD        | ABCA1        | APOC1        |              | 0.77         | 7.71            | 0                  | 5.05        | 0.0009        |
| ACSL4        | SCD        | ABCA1        | ACSL1        |              | 0.775        | 9.54            | 0                  | 2.83        | 0.05          |
| <b>ACSL4</b> | <b>SCD</b> | <b>ABCA1</b> | <b>FADS2</b> | <b>ACSL1</b> | <b>0.795</b> | <b>10.29</b>    | <b>0</b>           | <b>6.16</b> | <b>0.0002</b> |
| ACSL4        | SCD        | ABCA1        | APOE         | FADS2        | 0.8          | 12.96           | 0                  | 6.16        | 0.0002        |
| ACSL4        | SCD        | FADS2        | APOE         | CD36         | 0.811        | 19.22           | 0                  | 3.53        | 0.02          |
| ACSL4        | SCD        | ABCA1        | CD36         | FADS2        | 0.791        | 13.36           | 0                  | 4.25        | 0.0033        |

**Tabla 7.** Huella genómica basada en genes implicados en el metabolismo. Valor predictivo en Hazard Ratio (HR) de los genes en combinación formando una huella metabólica constituida por la determinación conjunta de los siguientes genes. Estos modelos, identificados en la serie inicial, han sido validados en la serie de validación, y ratificados en un meta-análisis con el global de pacientes.

Así, los pacientes con mayores valores de esta huella metabólica tienen significativamente mayor riesgo de recaída que pacientes con niveles intermedios y bajos (Figura 7).

*Ejemplo 8. Actividad antitumoral de agentes que potencian la expresión de GCNT3.*

El hecho de que una baja expresión de GNCT3 sea indicativa de un mal pronóstico de la enfermedad sugiere que es un factor de agresividad tumoral. Por tanto, agentes que potencien la expresión de este gen podrían tener una buena actividad antitumoral. Se ha estudiado la actividad potenciadora de GCNT3 de una serie de compuestos bioactivos, encontrando que el extracto de romero potencia de forma significativa la expresión de este gen en distintas células humanas de cáncer de colon y mama tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos resultados sugieren que agentes capaces de incrementar los niveles de GCNT3 pueden resultar prometedores agentes antitumorales. Igualmente, agentes capaces de inhibir la expresión o actividad de LPL, APOC1, SCD, ACSL1 o ACSL4 pueden resultar también en eficientes agentes con actividad antitumoral, especialmente para pacientes en los que estos marcadores se encuentren alterados.

## REIVINDICACIONES

1. Método para determinar el pronóstico de un paciente afectado de cáncer colorrectal que comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes ACSL1 y/o ACSL4 en una muestra de dicho paciente, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes ACSL1 y/o ACSL4 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene un mal pronóstico.
2. Método según la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1 y SCD, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1 y/o SCD y/o una disminución en los niveles de expresión del gen GCNT3 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene un mal pronóstico.
3. Método según las reivindicaciones 1 o 2 que comprende adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por ABCA1, APOE, FADS2 y CD36, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes ABCA1, APOE, FADS2 y/o CD36 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene un mal pronóstico.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el paciente ha sido tratado con una terapia basada en una fluoropiridina.
5. Método para seleccionar un tratamiento adecuado para un paciente afectado de cáncer colorrectal que comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes ACSL1 y/o ACSL4 en una muestra de dicho paciente, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes ACSL1 y/o ACSL4 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene que ser tratado con quimioterapia adyuvante.
6. Método según la reivindicación 5 que comprende adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1 y SCD, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes LPL, APOC1 y/o SCD y/o una disminución en los niveles de expresión del gen

GCNT3 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene que ser tratado con quimioterapia adyuvante.

- 5
7. Método según las reivindicaciones 5 o 6 que comprende adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por ABCA1, APOE, FADS2 y CD36, en donde un aumento en los niveles de expresión de los genes ABCA1, APOE, FADS2 y/o AGPAT2 con respecto a un valor de referencia para cada gen es indicativo de que el paciente tiene que ser tratado con quimioterapia adyuvante.
- 10
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 en donde dicha quimioterapia adyuvante es una terapia distinta a la terapia basada en una fluoropiridina.
- 15
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde se determinan los niveles de expresión de los genes SCD y ACSL1; SCD y ACSL4; APOC1 y ACSL1; ACSL4, SCD, APOE y FADS2; ACSL4, SCD, ABCA1 y FADS2; ACSL4, SCD, ABCA1 y APOC1; ACSL4, ACSL1, SCD y ABCA1 o LPL, ACSL4, FADS2 y AGPAT2.
- 20
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en donde el paciente sufre de cáncer colorrectal en estadio B.
- 25
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la muestra se selecciona del grupo consistente en una biopsia de tumor o un biofluido.
- 30
12. Método según la reivindicación 11 en donde el biofluido se selecciona del grupo consistente en sangre, plasma y suero.
13. Un kit que comprende los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de los genes ACSL1 y/o ACSL4 y, opcionalmente, los reactivos para la determinación de los niveles de expresión de uno o más genes de expresión constitutiva, en donde dichos reactivos se seleccionan del grupo formado por sondas que hibridan específicamente con dichos genes y anticuerpos capaces de unirse de forma específica a los polipéptidos codificados por dichos genes.

14. Kit según la reivindicación 13 que comprende adicionalmente reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por GCNT3, LPL, APOC1 y SCD.
- 5 15. Kit según las reivindicaciones 13 o 14 que comprende adicionalmente reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por ABCA1, APOE, FADS2 y CD36.
- 10 16. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 que comprende reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de los genes SCD y ACSL1; SCD y ACSL4; APOC1 y ACSL1; ACSL4, SCD, APOE y FADS2; ACSL4, SCD, ABCA1 y FADS2; ACSL4, SCD, ABCA1 y APOC1; ACSL4, ACSL1, SCD y ABCA1; ACSL4, ACSL1, SCD, FADS2 y ABCA1; ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y ABCA1; ACSL4, APOE, SCD, FADS2 y CD36; o ACSL4, SCD, FADS2, ABCA1 y CD36.
- 15
17. Uso de un agente inhibidor de los genes CSL1 y/o ACSL4 para la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en donde el agente inhibidor de ACSL1 y/o ACSL4 se selecciona del grupo formado por un anticuerpo inhibidor específico para el producto codificado por dichos genes, un oligonucleótido antisentido específico para dichos genes, un ARN de interferencia específico para dichos genes, una ribozima específica para dichos genes, una enzima de ADN específica para dichos genes y un compuesto según se indica en la Tabla 1.
- 20

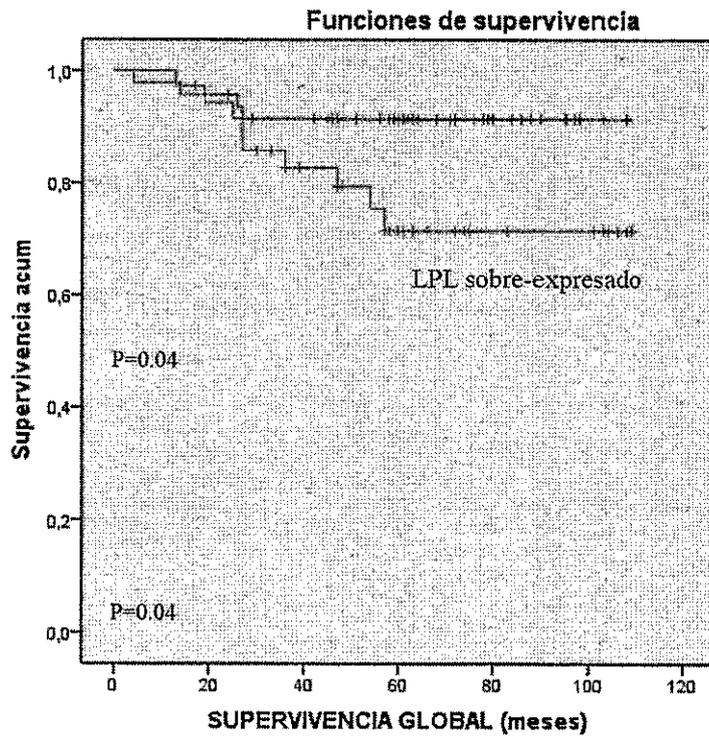
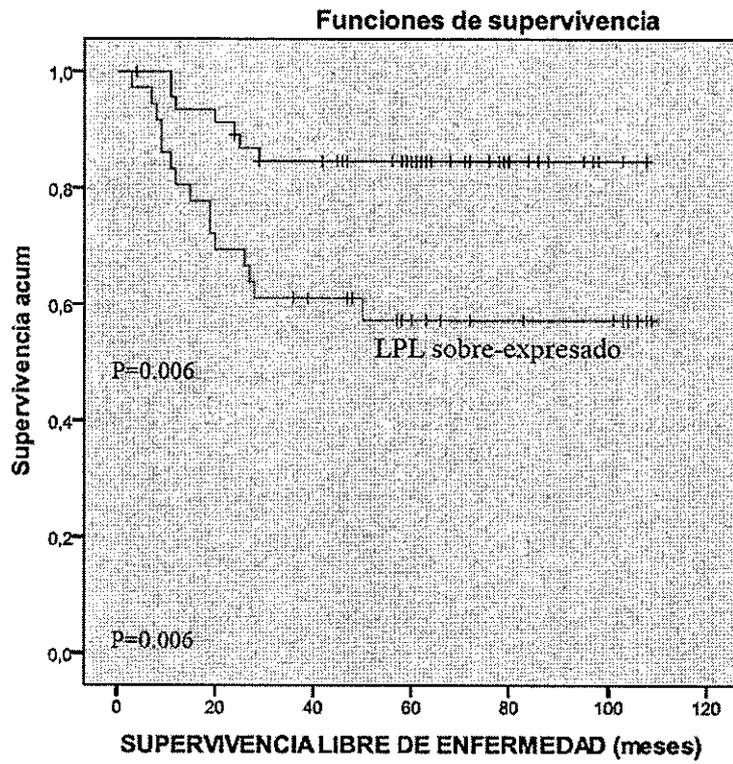


FIG. 1

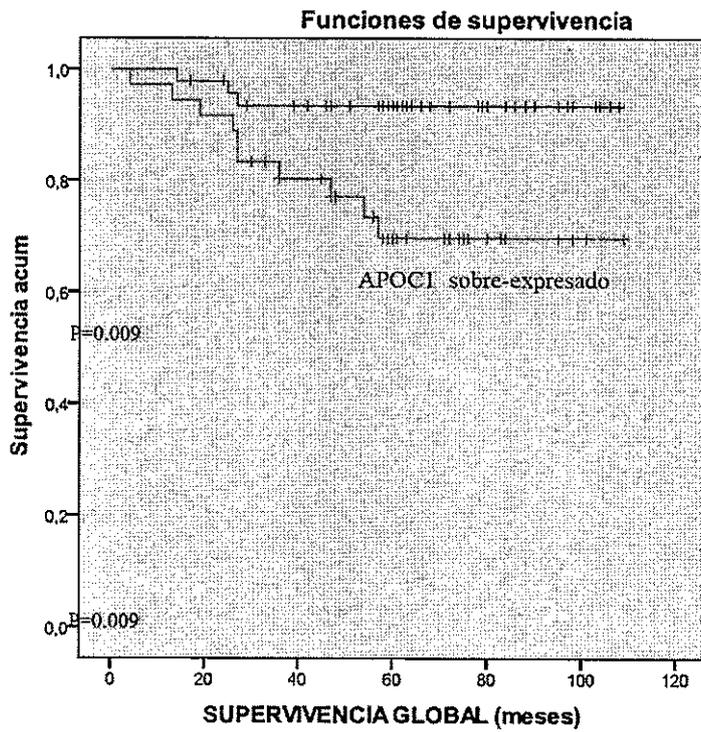
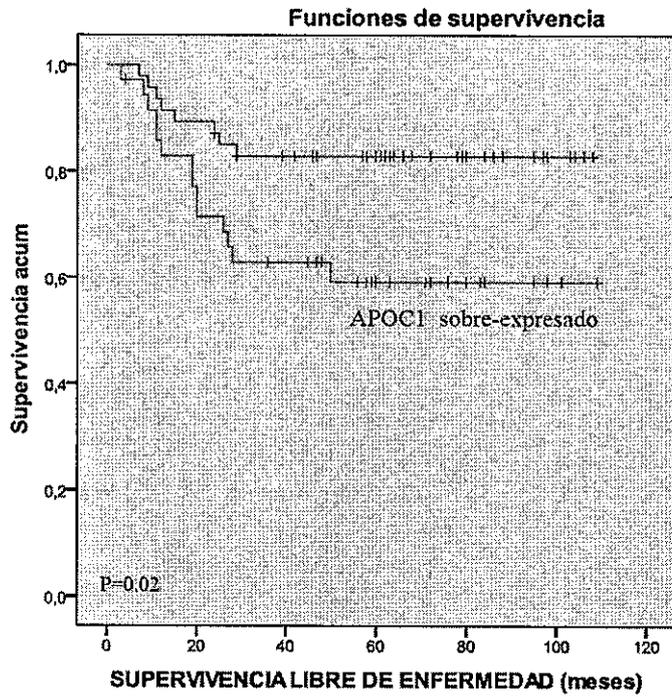


Fig. 2

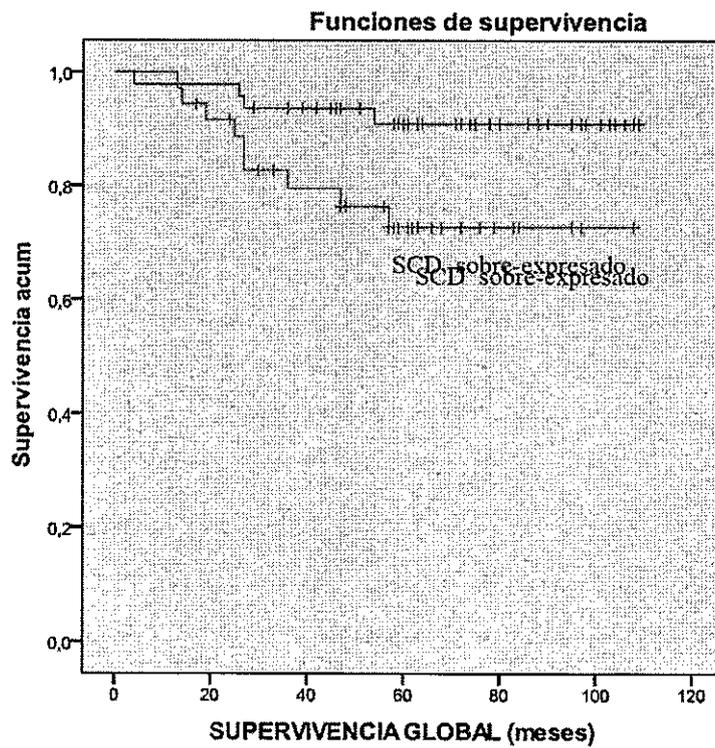
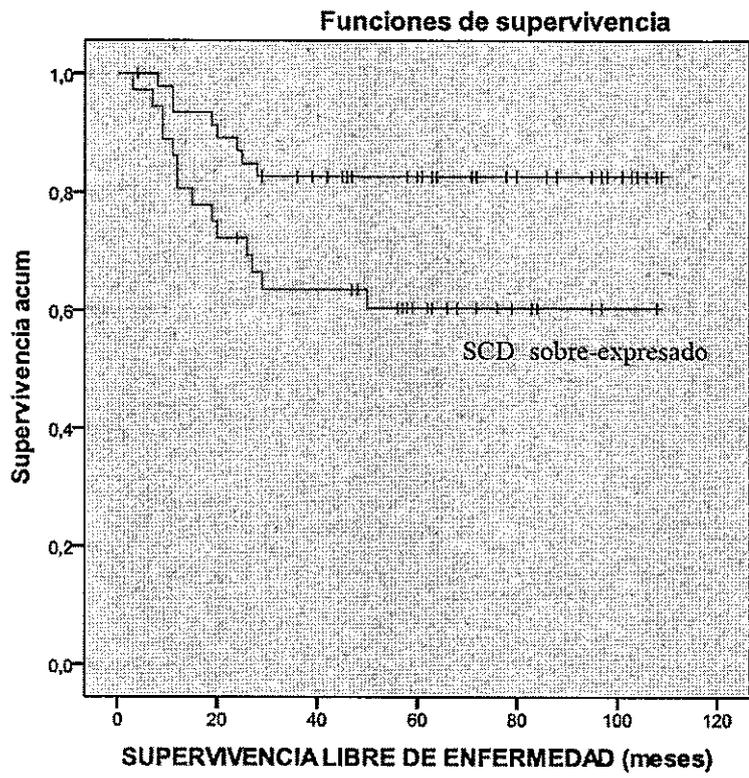


Fig. 3

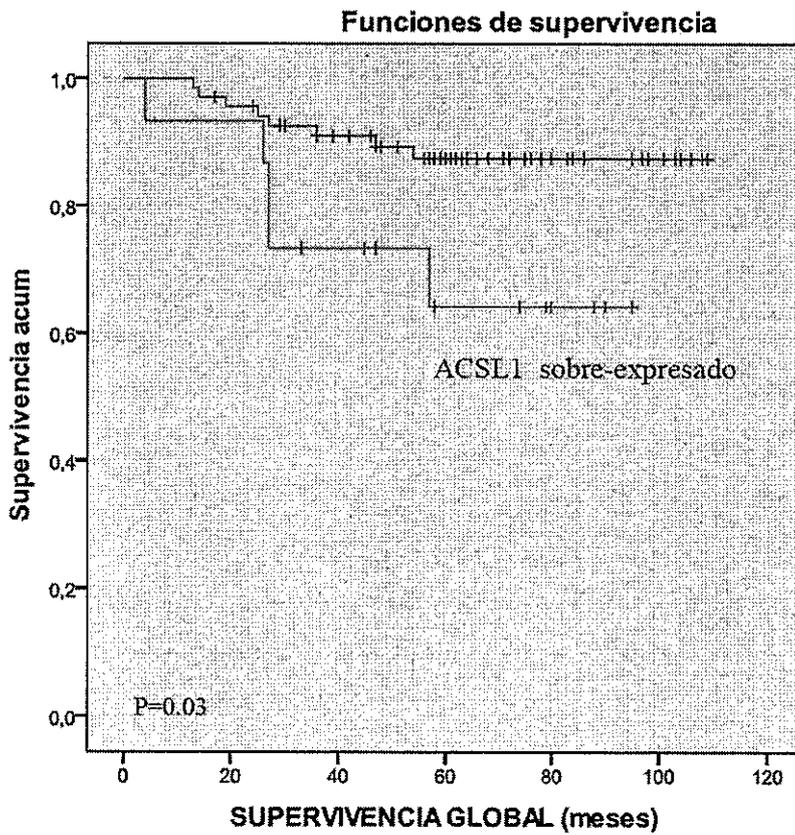
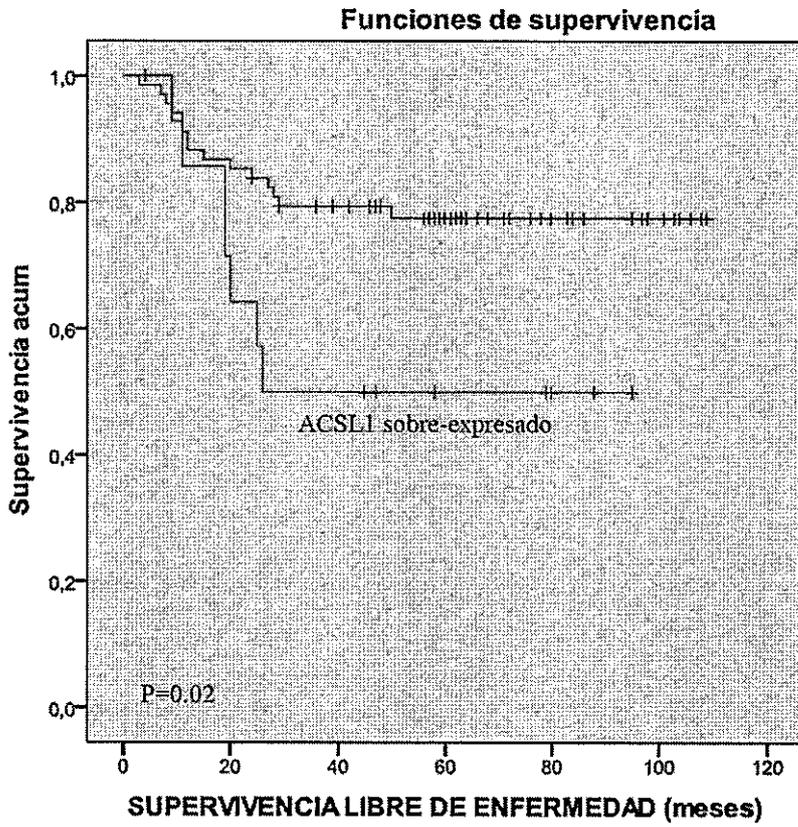


Fig. 4A

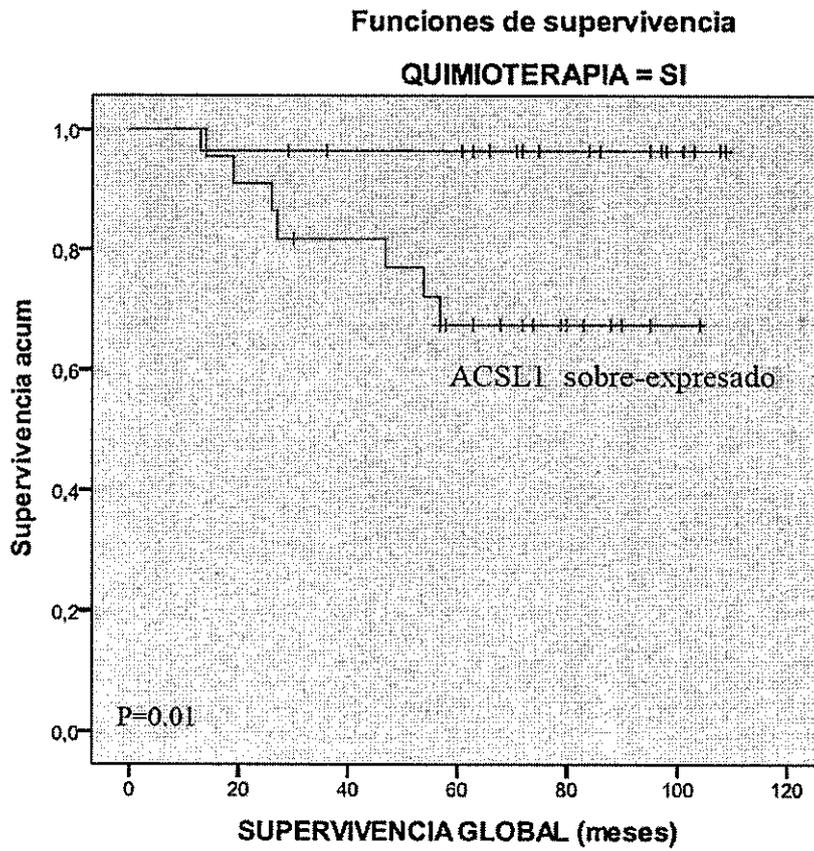
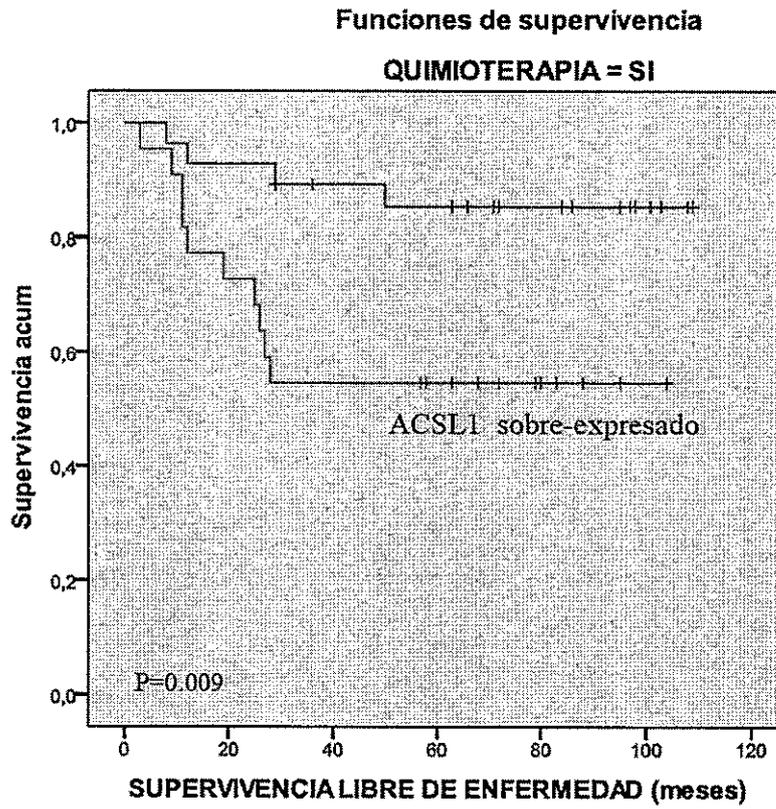


Fig. 4B

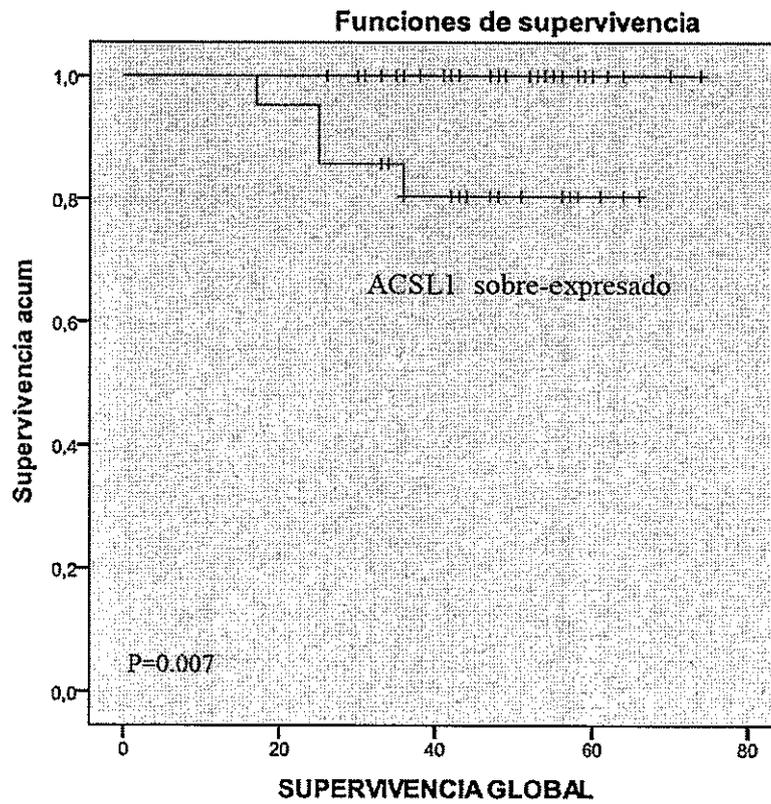
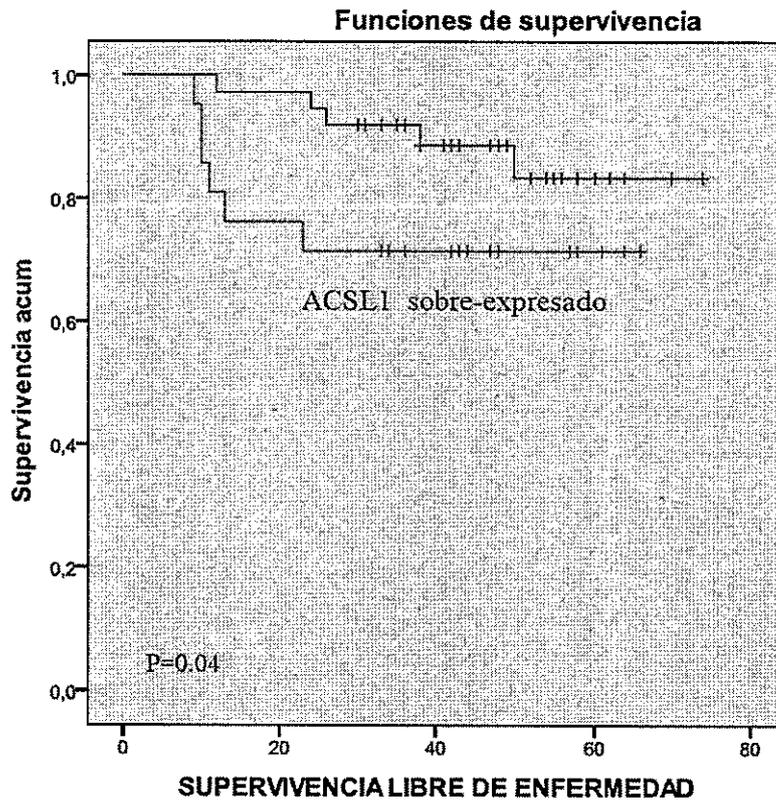


Fig. 4C

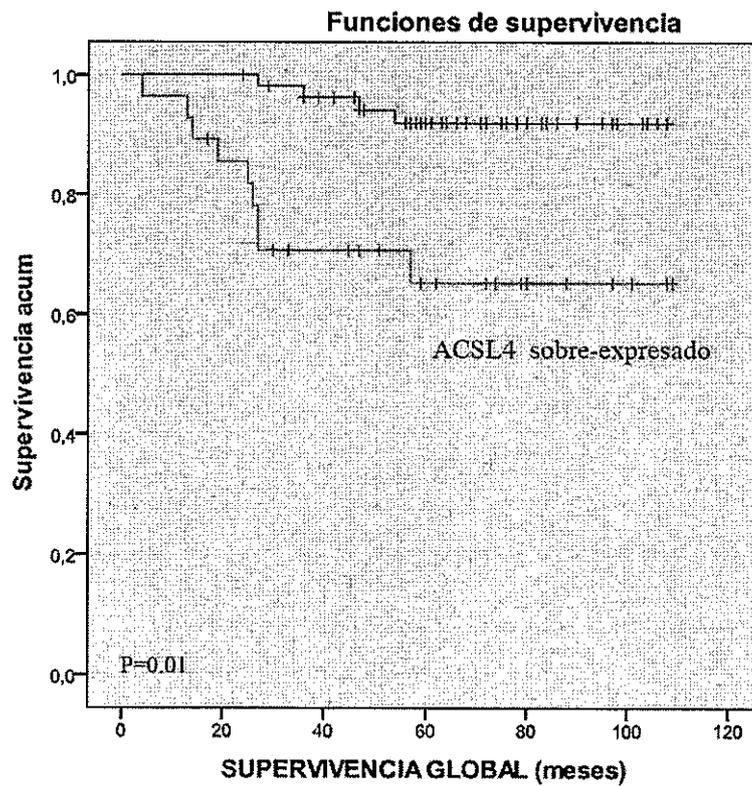
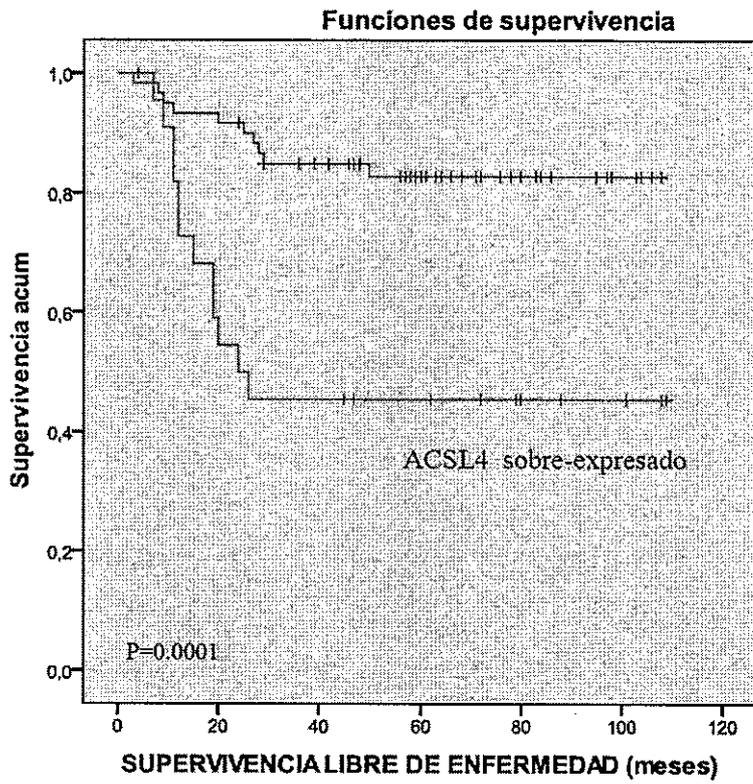


Fig. 5A

**Funciones de supervivencia**

**QUIMIOTERAPIA = NO**

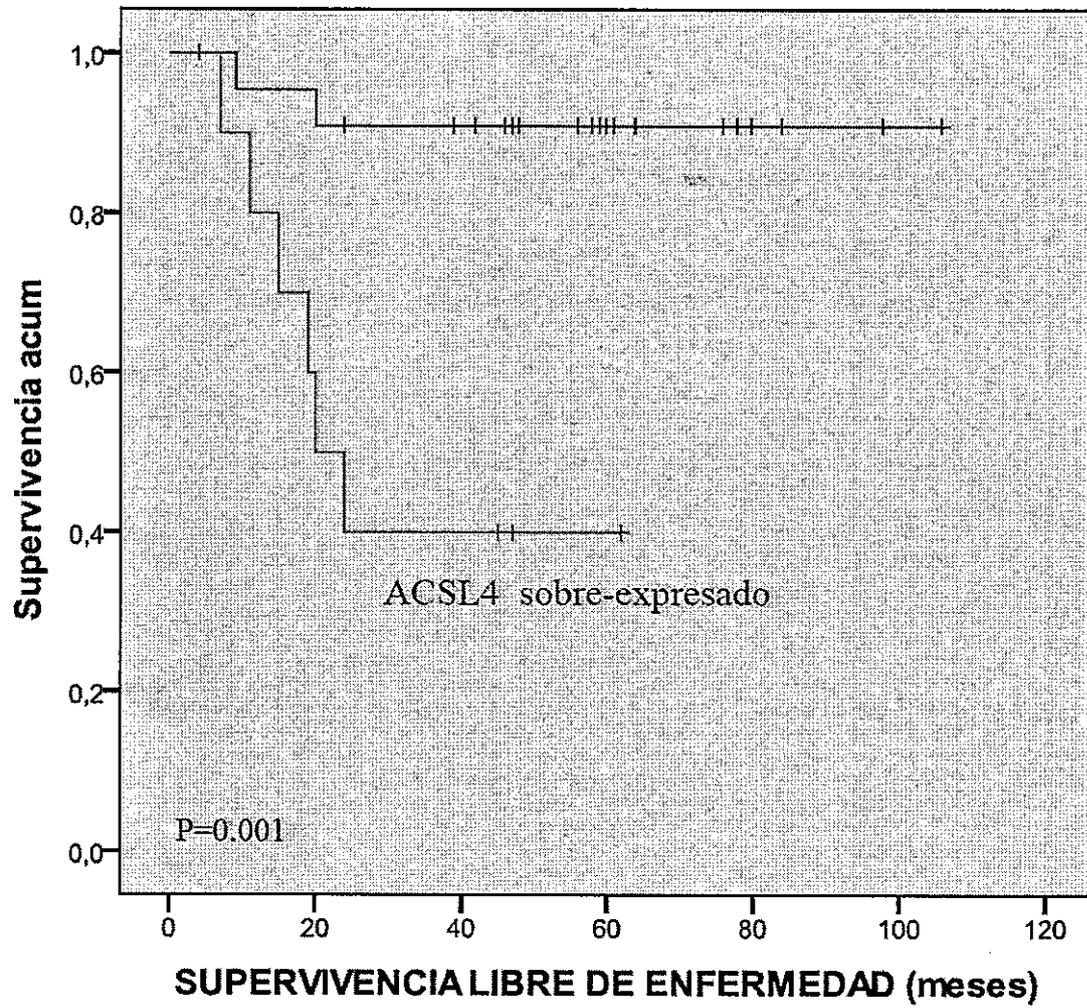


Fig. 5B

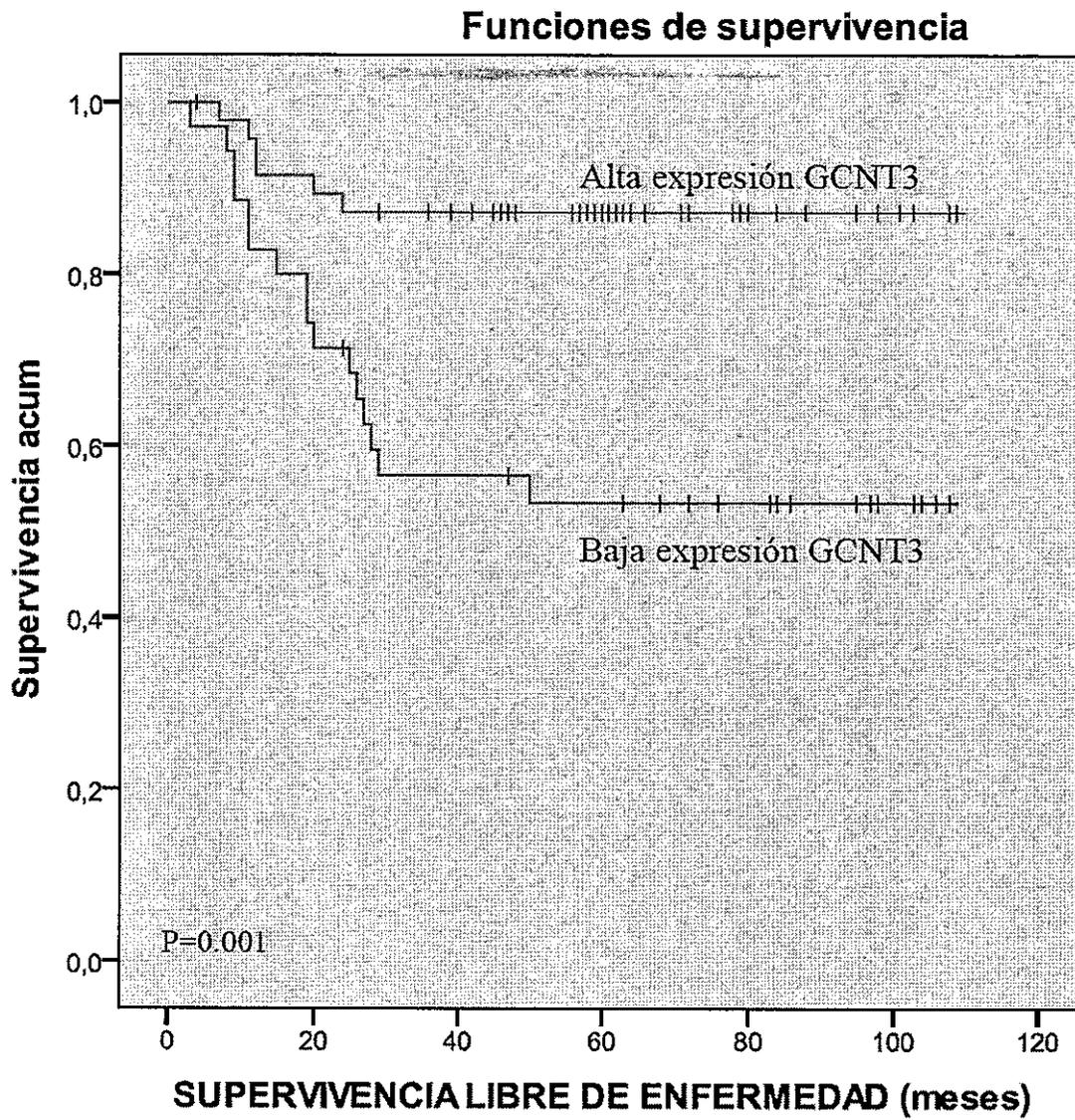


Fig. 6

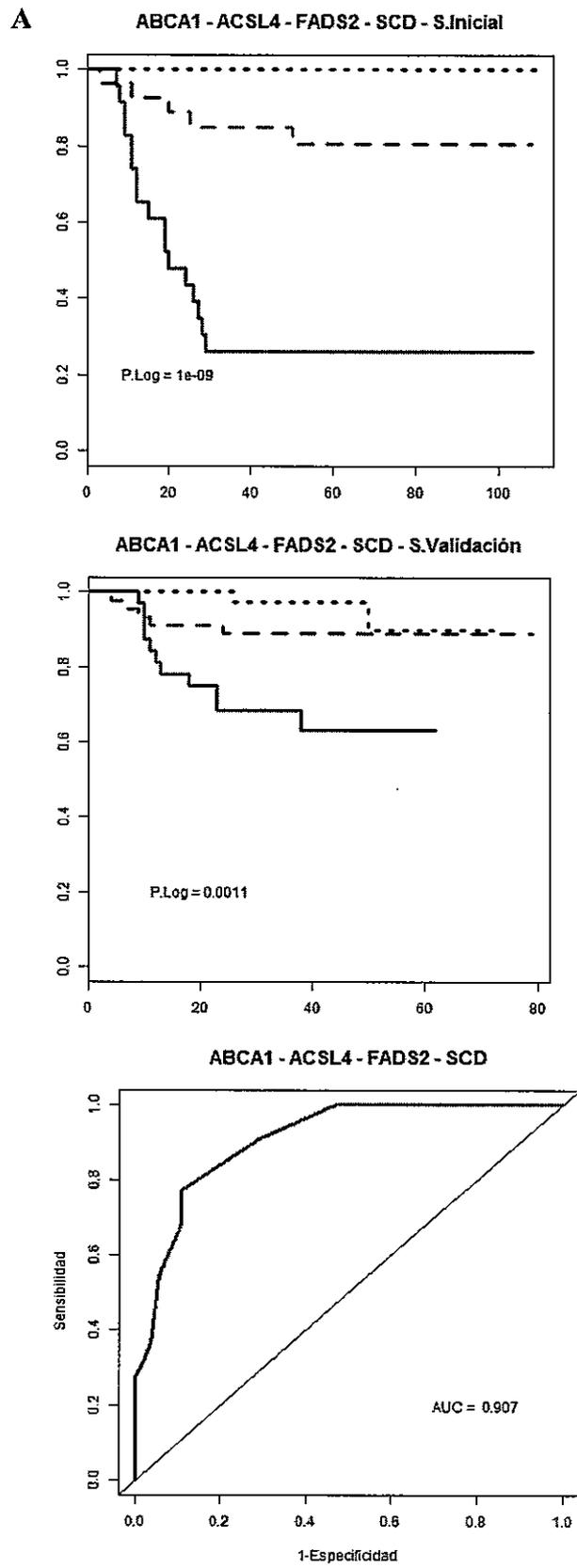
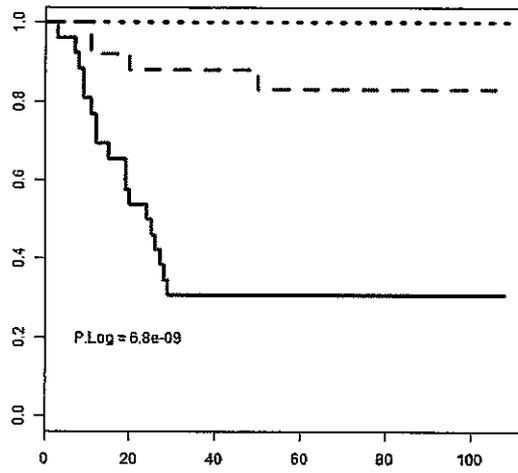


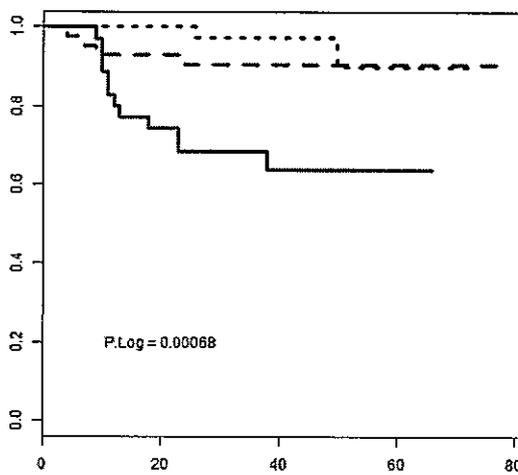
FIG. 7

**B**

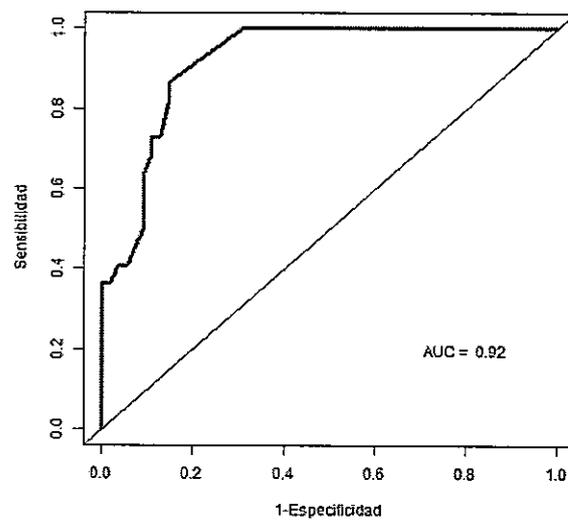
**ABCA1 - ACSL1 - ACSL4 - FADS2 - SCD - S.Inicial**



**ABCA1 - ACSL1 - ACSL4 - FADS2 - SCD - S.Validación**



**ABCA1 - ACSL1 - ACSL4 - FADS2 - SCD**



**FIG. 7 (cont.)**



- ②① N.º solicitud: 201231918  
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.12.2012  
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**G01N33/50** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados   | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X         | US 2012252748 A1 (MONACO MARIE) 04.10.2012, página 2, párrafo 1.            | 1,17                       |
| X         | WO 2010127322 A1 (GENOMIC HEALTH INC et al.) 04.11.2010, todo el documento. | 1-16                       |
| X         | WO 2009114836 A1 (GENOMIC HEALTH INC et al.) 17.09.2009, todo el documento. | 1-17                       |
| X         | WO 2009037572 A2 (DIAGNOPLEX et al.) 26.03.2009, reivindicaciones.          | 1-17                       |

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  
26.09.2013

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

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

C12Q, G01N.

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.09.2013

**Declaración**

|   |                       |           |
|---|-----------------------|-----------|
| <b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>            | Reivindicaciones 2-16 | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1,17 | <b>NO</b> |
| <b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b> | Reivindicaciones      | <b>SI</b> |
|   | Reivindicaciones 1-17 | <b>NO</b> |

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       | US 2012252748 A1 (MONACO MARIE)              | 04.10.2012        |
| D02       | WO 2010127322 A1 (GENOMIC HEALTH INC et al.) | 04.11.2010        |
| D03       | WO 2009114836 A1 (GENOMIC HEALTH INC et al.) | 17.09.2009        |
| D04       | WO 2009037572 A2 (DIAGNOPLEX et al.)         | 26.03.2009        |

**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**

La presente solicitud divulga un método para determinar el pronóstico de un paciente afectado de cáncer colorrectal frente al tratamiento quimioterápico que comprende la determinación de los niveles de expresión de los genes ACSL1 y/o ACSL4, y adicionalmente la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo formado por el resto de marcadores de las reivindicaciones 2-16.

Las reivindicaciones 1-12 reivindican el método, 13-16 un Kit que comprenda los reactivos necesarios para determinar los niveles de expresión de los genes correspondientes a tales biomarcadores, y la reivindicación 17 caracteriza el uso de un agente inhibidor de los genes ACSL1 y/o ACSL4.

Todos los documentos del estado de la técnica citados divulgan el uso de diferentes genes para la elaboración de métodos pronóstico, o de respuesta a tratamiento del cáncer colorrectal. En concreto, D01 divulga que la expresión de ACSL4 está altamente elevada en el adenocarcinoma de colon y carcinoma hepatocelular (HCC) en comparación con el tejido normal adyacente. En consecuencia, la detección de ACSL4 podría ser un marcador biológico potencialmente importante para la aparición temprana de adenocarcinoma de colon y carcinoma hepatocelular. Además divulga un método de tratamiento de un paciente con cáncer que comprende la administración de un inhibidor de la ACSL4: ARNsi, dsRNA, los genes miARN, ARN antisentido, aptámero, ribozima, o un ácido nucleico enzimático.

Así pues las reivindicaciones 1, 17 carecerían de novedad tal y como se menciona en el art. 6 de la ley 11/1986.

Dado que diversos documentos del estado de la técnica divulgan métodos con los cuales evaluar la respuesta de los pacientes a distintas modalidades de quimioterapia en casos de cáncer colorrectal, el problema técnico que plantearía la presente solicitud sería la provisión de métodos alternativos para identificar aquellos casos de carcinoma de colon que tuvieran mejor predisposición a responder positivamente a los tratamientos mediante la identificación de perfiles de expresión de marcadores alternativos a los ya divulgados por el estado de la técnica. Sin embargo, dado que no se muestran datos comparativos que hagan pensar al experto en la materia de la superioridad de las diversas combinaciones de marcadores divulgadas en esta solicitud, frente a los marcadores divulgados en el estado de la técnica, la selección de marcadores llevada a cabo en la presente solicitud equivaldría a una alternativa de realización obvia para el experto en la materia, carente de actividad inventiva tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.