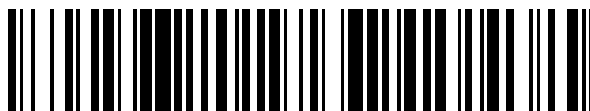


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 713**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10730815 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2444811**

54 Título: **Procedimientos para el diagnóstico o pronóstico de cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

**25.05.2009 ES 200930203**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**23.11.2015**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

**Serrano 117**

**28006 Madrid, ES y**

**FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE  
INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS CARLOS III  
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**CASAL ÁLVAREZ, JOSÉ IGNACIO;  
BARDERAS MANCHADO, RODRIGO y  
BABEL, INGRID HENRIETTE SUZANNE**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 551 713 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos para el diagnóstico o pronóstico de cáncer colorrectal

**Campo de la invención**

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere a obtener datos útiles para el diagnóstico, el pronóstico o la monitorización de la evolución de un cáncer colorrectal (CCR), así como a procedimientos para el diagnóstico o pronóstico de CCR basado en autoanticuerpos frente a proteínas o basado en productos de expresión de los genes que codifican dichas proteínas, así como a un procedimiento para diagnosticar metástasis en pacientes con CCR. La invención también se refiere a un kit adecuado para poner dichos procedimientos en práctica.

**10 Estado de la técnica anterior**

El cáncer colorrectal (CCR) es el segundo cáncer más prevalente en el mundo occidental. El desarrollo de la enfermedad se produce durante décadas e involucra múltiples eventos genéticos. A pesar de que el CCR es uno de los tumores sólidos mejor caracterizados desde un punto de vista genético sigue siendo una de las principales causas de mortalidad en países desarrollados por el diagnóstico tardío de los pacientes debido, entre otras razones, a que algunas pruebas diagnósticas, como la colonoscopia, se llevan a cabo demasiado tarde.

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

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

30 Sin embargo, la implementación de procedimientos diagnósticos no invasivos y más simples que permitan la detección temprana del CCR debería basarse en la identificación de proteínas o anticuerpos detectables en el suero o el plasma (Hanash et al. 2008. *Nature* 452 (7187), 571-579; Hudson et al. 2007. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (44), 17494-17499).

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

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

Por otro lado, el uso de Pim1 como un marcador, solo o en combinación con otros marcadores, de cáncer de próstata se describe por los documentos WO 2006/056766 y WO2008/061104.

**Sumario de la invención**

55 Varios ensayos llevados a cabo por los autores de la invención han permitido identificar que autoanticuerpos tales

como proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, así como los productos de expresión de los genes que codifican dichas proteínas, se pueden usar como biomarcadores de cáncer colorrectal (CCR). Además, han sido también capaces de identificar que autoanticuerpos para las proteínas mencionadas en las Tablas 2 y 3 (véase más adelante) se pueden usar como biomarcadores de pulmón o metástasis hepática en pacientes con CCR.

5 Por lo tanto, la presente descripción describe un procedimiento para la detección de autoanticuerpos frente a dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) potencialmente útiles como marcadores de CCR así como a procedimientos de obtener datos, procedimientos para el diagnóstico, pronóstico o monitorización de la evolución de CCR y a procedimientos para el diagnóstico o pronóstico de metástasis pulmonares o hepáticas en pacientes con CCR y a un kit adecuado para poner en práctica dichos procedimientos y sus aplicaciones.

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

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

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

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

30 La combinación formada por las proteínas purificadas Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B se puso a prueba mediante ELISA utilizando sueros de pacientes con CCR y sueros control. El ELISA permitió discernir entre sueros de pacientes con CCR y sueros control con una especificidad y sensibilidad del 73,9 y 83,3%, respectivamente (AUC=0,86).

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

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

45 Por lo tanto, se describe un procedimiento para la detección de un autoanticuerpo para una proteína que comprende: a) poner en contacto una muestra biológica con dicha proteína o con un fragmento de la misma susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo; y b) detectar la formación de una proteína de autoanticuerpo, o un fragmento de la misma, de un complejo susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo, en el que dicha proteína está seleccionada del grupo constituido por las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B y combinaciones de las mismas.

50 Se describe también un procedimiento de obtener datos en una muestra biológica de un sujeto que comprende detectar al menos un anticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que

consiste en un autoanticuerpo para la proteína Pim1, un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B y si se desea, determinar el nivel de dicho autoanticuerpo en dicha muestra.

5 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtener datos en una muestra biológica de un sujeto que comprende detectar el producto de expresión del gen la Pim1 y el producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B y si se desea, cuantificar el nivel de expresión de dicho(s) gen(es) en dicha(s) muestra(s) en las que dichas muestras comprenden células tumorales de cáncer colorrectal (CCR).

10 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR) que comprende comparar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4, un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica de dicho sujeto, con el nivel de referencia de dicho(s) autoanticuerpo(s), en los que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo y en los que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos autoanticuerpos, y/o si el nivel de autoanticuerpo para ACVR2B en dicha muestra es menos que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, entonces ese sujeto se diagnostica con CCR.

20 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de al menos un producto de expresión de un gen, en el que dicho gen está seleccionado del grupo que consiste en los genes de SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, en una muestra de dicho sujeto, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho(s) genes(s) en los que si el producto de expresión del gen Pim1 es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen, dicho sujeto se diagnostica con CCR.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4, un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica de dicho paciente de CCR, con el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1, es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dicho autoanticuerpo y en el que si el nivel de dicho anticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dichos autoanticuerpo, y/o si el nivel del autoanticuerpo para ACVR2B en dicha muestra es menos que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, entonces dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

40 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de al menos un producto de expresión de un gen, en el que dicho gen está seleccionado de un grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, en una muestra de dicho paciente que padece CCR, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho(s) gen(es) en el que si el nivel de dicho producto de expresión del gen Pim1 es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dicho producto de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el nivel de referencia para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si en nivel del producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen, dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

55 La descripción también describe un procedimiento para diagnosticar metástasis pulmonar en un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de al menos un anticuerpo para una proteína en una muestra biológica de dicho paciente, en el que dicha proteína es una proteína seleccionada del grupo de proteínas mencionadas en la tabla 2, con el nivel de referencia para dicho anticuerpo, en el que si el nivel de anticuerpo para dicha proteína en dicha muestra biológica de dicho paciente es mayor que el nivel de referencia para dicho anticuerpo, el paciente de CCR presenta metástasis pulmonar.

60 La descripción también describe un procedimiento para diagnosticar metástasis pulmonar en un paciente que padece

cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de al menos un anticuerpo para una proteína en una muestra biológica de dicho paciente, en el que dicha proteína es una proteína seleccionada del grupo de proteínas mencionadas en la tabla 3, con el nivel de referencia para dicho anticuerpo, en el que si el nivel de anticuerpo para dicha proteína en dicha muestra biológica de dicho paciente es mayor que el nivel de referencia para dicho anticuerpo, el paciente de CCR presenta metástasis hepática.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende:

-los elementos necesarios para detectar al menos un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y un autoanticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, o alternativamente

-los elementos necesarios para detectar un producto de expresión del gen Pim1 y al menos un producto de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de dicho kit para diagnosticar si un sujeto padece CCR; o para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece CCR.

### 15 Breve descripción de los dibujos

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidas para demostrar además ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por medio de referencia a una o más de estas figuras combinadas con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

20 Figura 1 muestra el análisis de la expresión de Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B, en líneas celulares y tejido tumoral. A, 50 µg de extracto de proteína de tejidos normales (N) y tumorales (T) emparejados de 6 pacientes con CCR (estadios de Duke A, B y C), se corrieron por separado en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa; las inmunodetecciones de membrana se llevaron a cabo con anticuerpos comerciales obtenidos para Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B, usando anti-tubulina como control del ensayo. La señal se desarrolló usando ECL (Amersham) o SuperSignal Femto (Pierce). B, las inmunodetecciones de membrana se llevaron a cabo con anticuerpos comerciales obtenidos para ACVR2B, Pim1 y MAPKAPK3 usando antitubulina como control del ensayo. 50 µg de extractos celulares de 6 líneas celulares de CCR (Rko, Hct116, SW48, SW480, Hct15, Colo205) y 5 líneas celulares de otras enfermedades o normales se utilizaron como referencia en el ensayo ((BxPc3 (adenocarcinoma de páncreas), Molt4 (Linfoblastoide), Neut (Neutrófilos), MEF (fibroblastos murinos embrionarios) y Linf (linfocitos)) se corrieron por separado en geles SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La señal se desarrolló utilizando ECL (Amersham) o SuperSignal Femto (Pierce). C, Los niveles relativos de la expresión de los genes FGFR4 (Notterman, Alon et al. 2001), MAPKAPK3 (Ki, Jeung et al. 2007), SRC (Ki, Jeung et al. 2007) y STK4 (Watanabe, Kobunai et al. 2006) se evaluaron utilizando la base de datos publica de DNA microarrays Oncomine (www.oncomine.org). D, Análisis de la expresión de Pim1 y ACVR2B en tejido utilizando TMA específicos de CCR. Las imágenes se tomaron a diferentes aumentos (100x y 400x). La expresión de Pim1 se observó en células epiteliales rodeando las criptas de tejido tumoral con tinción citoplasmática. La tinción de ACVR2B se localizó principalmente a nivel de membrana de las células epiteliales en el tejido normal con una clara disminución de su expresión en tejido tumoral.

40 Figura 2 muestra la verificación de los AAT seleccionados (Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B) mediante ELISA. Valores de ELISA de Pim1, MAP- KAPK3 y ACVR2B usando CEA y Anexina IV como controles. Las barras de error representan la desviación estándar del ensayo.

45 Figura 3 muestra las curvas ROC de los AATs seleccionados. Representación gráfica del comportamiento de los AAT A, Curvas ROC utilizando los valores de ELISA de ACVR2B, Pim1 y MAPKAPK3 individualmente. B, Curvas ROC utilizando diferentes combinaciones de las proteínas seleccionadas. C, Curvas ROC utilizando de los controles CEA y Anexina IV [AUC: área bajo la curva; Sens: sensibilidad; Spec: especificidad].

50 Figura 4 muestra el análisis inmunohistoquímico de Pim1 y ACVR2. A, resultado del análisis inmunohistoquímico de Pim1 y ACVR2B. A, resultado del análisis innunohistoquímico de Pim1 y ACVR2 en tejido de CCR y mucosa adyacente normal de 45 pacientes con CCR cuantificado por dos investigadores independientes en días diferentes, de acuerdo con los siguientes criterios: 0, sin marcar; 1, marcaje débil; 2, marcaje normal; 3, marcaje fuerte. Las barras de error representan la desviación estándar de cada ensayo. B, análisis estadístico de los resultados de los TMA. El tamaño de la muestra, el promedio, el IC al 95 % para el promedio, la desviación estándar y la prueba de T se indican.

55 Figura 5 muestra la correlación de autoanticuerpos para MAPKAPK3 y ACVR2B en suero de sujetos con CCR. A y B, muestran la distribución de la intensidad de señal de ambos marcadores en suero de pacientes con CCR [suero (tumoral) de CCR]. C, muestra la gráfica de la señal en cada suero (tumoral y normal) de MAPKAPK3 y ACVR2B, donde la ausencia de correlación entre la señal de ambos marcadores se puede ver. Cuanto más alta es la señal para ACVR2B mayor es la posibilidad de pertenecer al grupo normal; la situación opuesta se observa para MAPKAPK3.

Figura 6 muestra el análisis de ELISA de muestras de suero usando un ELISA con los ATT STK4 y FGFR4. Un total de 94 muestras de suero (52 de pacientes con CCR y 42 controles) se usaron para la implementación y el análisis en base a un ELISA de ATT recombinantes. CEA y anexina IV se usaron como controles. Los resultados muestran los valores de absorbancia promedio obtenidos para SRC, STK4, FGFR4, HSA y anexina 4 en suero para poblaciones de referencia (controles) y con CCR. Las barras de error representan la desviación estándar del ensayo. La concentración de CEA sérica se determinó usando un kit específico para inmunoensayos (MP Biomedicals).

Figura 7 muestra la validación de SRC, STK4 y FGFR4 como biomarcadores potenciales en CCR. A, gráfica de SRC, STK4 y FGFR4 discriminando entre suero de pacientes con CCR y suero de sujetos de referencia (controles) independientemente en un grupo de validación de un total de 94 muestras (52 de pacientes con CCR y 42 controles). B, especificidad (Spec) y sensibilidad (Sens) se obtuvieron usando los controles de HAS y de anexina IV para discriminar pacientes independientemente con CCR de diferentes sujetos. C, especificidad y sensibilidad obtenidas del análisis de curvas de ROC usando una combinación óptima de biomarcadores (MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4). D, especificidad y sensibilidad de una combinación óptima de biomarcadores para los estadios tempranos de CCR (MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4). [AUC: área bajo la curva; Sens: sensibilidad; Spec: especificidad].

Figura 8 muestra la validación de una combinación de marcadores para el diagnóstico de CCR. El papel de CEA solo y con una combinación óptima de marcadores de la diagnosis de CCR (MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4). Ello también muestra la combinación de los autoanticuerpos para MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4 y CEA discriminando independientemente suero de pacientes con CCR de suero de sujetos de referencia (controles) en un grupo de validación de un total de 94 muestras (52 de pacientes con CCR y 42 controles), indicando que los marcadores proporcionados con esta invención combinados con CEA mejoran significativamente la detección de CCR.

Figura 9 muestra la validación de una combinación de marcadores para el diagnóstico de CCR en estadios tempranos. El papel de CEA solo y con una combinación óptima de marcadores para el diagnóstico de CCR (MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4) para discriminar CCR en un estadio temprano usando 20 sujetos saludables control y 20 sueros de pacientes con CCR en estadios A y B. La combinación de los autoanticuerpos para MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4 y CEA no mejoró la capacidad de predicción para el diagnóstico de CCR, indicando que dicha combinación de marcadores proporcionada por esta invención es más adecuada para el diagnóstico de CCR en los estadios tempranos de CCR que CEA solo.

Figura 10 muestra una gráfica de los valores obtenidos por medio de un ELISA de la concentración de MAPKAPK3, Pim1, SRC, FGFR4 y STK4 y CEA en suero de pacientes con CCR. La concentración de CEA fue mayor en los últimos estadios de CCR que en los estadios tempranos de CCR (donde su concentración fue más baja). La presencia de autoanticuerpos en suero de pacientes con CCR con respecto a los biomarcadores seleccionados proporcionados por esta invención fue constante durante todas las etapas, permitiendo un mejor diagnóstico de CCR no solo en los estadios más tardíos sino también en los estadios tempranos de CCR.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Para facilitar su comprensión, el significado de algunos términos y expresiones según se usan en la presente descripción se indica a continuación.

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

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

El término "autoanticuerpo frente a la proteína Pim1", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína Pim1 o con una variante o con un fragmento de dicha proteína, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente es decir, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. En una realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 es una IgG; en otra realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 es una IgM.

El término "autoanticuerpo frente a la proteína SRC", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína SRC o con una variante o con un fragmento de dicha proteína, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente es decir, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. En una realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína SRC es una IgG; en otra realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína SRC es una IgM.

El término "autoanticuerpo frente a la proteína MAPKAPK3", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína MAPKAPK3 o con una variante o con un fragmento de dicha proteína, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente es decir, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. En una realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3 es una IgG; en otra realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3 es una IgM.

El término "autoanticuerpo frente a la proteína FGFR4", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína FGFR4 o con una variante o con un fragmento de dicha proteína, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente es decir, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. En una realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4 es una IgG; en otra realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4 es una IgM.

El término "autoanticuerpo frente a la proteína STK4", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína STK4 o con una variante o con un fragmento de dicha proteína, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente es decir, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. En una realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína STK4 es una IgG; en otra realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína STK4 es una IgM.

El término "autoanticuerpo frente a la proteína ACVR2B ", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un autoanticuerpo capaz de reaccionar con la proteína ACVR2B o con una variante o con un fragmento de dicha proteína, siempre y cuando dicha variante o dicho fragmento sea funcionalmente equivalente es decir, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. En una realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína ACVR2B es una IgG; en otra realización particular, dicho autoanticuerpo para la proteína ACVR2B es una IgM.

El término "cáncer colorrectal" o "CCR", también llamado cáncer de colon, tal como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier tipo de neoplasias del colon, recto y apéndice, así como subtipos histológicos que se dan típicamente en el cáncer de colon, por ejemplo, carcinoma celular transicional, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma, cualquier subtipo clínico, por ejemplo, de superficie, cáncer muscular invasivo o enfermedad metastásica, o cualquier estadio de TNM incluyendo tumores T0-T4, N0-N2 y M0-M1. Los pacientes se pueden clasificar en diferentes grupos con respecto al estadio del tumor. La clasificación de cáncer de colon es una estimación de la penetración de un cáncer particular. Se lleva a cabo por propósitos de investigación, propósitos diagnósticos y para determinar el mejor procedimiento de tratamiento. El sistema de clasificación de cánceres colorrectales depende del grado de invasión local, del grado de nódulos linfáticos implicados y de si existen metástasis distales. El sistema de clasificación más común es el sistema TNM (para tumores/nódulos/metástasis), del "American Joint Committee on Cancer" (AJCC). El sistema de TNM asigna un número basado en tres categorías. "T" indica el grado de invasión de la pared intestinal, "N" el grado de implicación de los nódulos linfáticos y "M" el grado de metástasis. El estadio más amplio de cáncer se menciona usualmente como un número I, II, III, IV derivado del valor de TNM formando un clúster por el pronóstico, un número más alto indica un cáncer más avanzado y un pronóstico peor. Los detalles del sistema se indican en la tabla 1.

Tabla 1

Sistema TNM para la clasificación de CCR

Estadio de AJCC	Estadio de TNM	Criterios de los estadios de TNM para CCR
Estadio 0	Tis N0 M0	Tis: el tumor confinado en la mucosa; cáncer in situ.
Estadio I	T1 N0 M0	T1: el tumor invade la mucosa.
Estadio I	T2 N0 M0	T2: el tumor invade los músculos actuales.
Estadio II-A	T3 N0 M0	T3: el tumor invade la capa subserosa o por debajo (otros órganos no implicados).
Estadio II-B	T4 N0 M0	T4: el tumor invade órganos adyacentes o perfora el peritoneo visceral.
Estadio III-A	T1-2 N1 M0	N1: metástasis de 1 a 3 nódulos linfáticos regionales. T1 o T2.
Estadio III-B	T3-4 N1 M0	N1: metástasis de 1 a 3 nódulos linfáticos regionales. T3 o T4.
Estadio III-C	Cualquier T, N2, M0	N2: metástasis de 4 o más nódulos linfáticos regionales. Cualquier T.
Estadio IV	Cualquier T, cualquier N, M1	M1: presencia de metástasis distales. Cualquier T, cualquier N.

El término “cuantificación”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la medida de una cantidad de concentración, preferentemente en una manera cuantitativa, semicuantitativa o relativa de un producto, por ejemplo, autoanticuerpos para una determinada proteína (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK43, ACVR2B, etc., o para las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3), productos de expresión (por ejemplo, ARN o proteína) de los genes que codifican una proteína determinada (por ejemplo, genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, etc.), etc. La cuantificación de un producto se puede llevar a cabo directa o indirectamente. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o concentración de dicho producto basándose en la señal que se obtiene directamente a partir de dicho producto y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto en cuestión presente en la muestra analizada. Dicha señal (a la que también se puede hacer referencia como señal de intensidad) se puede obtener, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química del producto en cuestión. La medida indirecta de la cantidad o concentración de un producto incluye la medida obtenida a partir de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto de autoanticuerpos) o un sistema de medida biológico (por ejemplo, la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas”, productos de reacción enzimáticos, etc.).

La cuantificación del nivel de expresión de un producto de expresión de un gen se puede llevar a cabo directa o indirectamente. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o concentración de un producto de expresión de un gen basándose en la señal que se obtiene directamente a partir del producto de expresión de dicho gen y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de expresión de dicho gen presente en la muestra analizada. Dicha señal, a la que también se puede hacer referencia como la señal de identidad, se puede obtener, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad física o química del producto de expresión del gen en cuestión (por ejemplo, *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4*, *ACVR2B*, etc.). La medida indirecta de la cantidad o concentración de un producto de expresión de un gen incluye la medida obtenida a partir de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto de productos de expresión del gen en cuestión) o un sistema de medida biológico (por ejemplo, la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas”, productos de reacción enzimáticos, etc.).

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente al proceso mediante el que se identifica una enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier afección de enfermedad-salud. En particular, el término “diagnóstico de cáncer colorrectal o CCR” se refiere a la capacidad para identificar o detectar la presencia de CCR: esta detección, como se entiende por un experto en la técnica, no reivindica ser correcta en el 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas esté clasificada correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa se puede establecer por un experto en la técnica por medio de usar diferentes herramientas estadísticas; de forma ilustrativa, ejemplos no limitantes de dichas herramientas estadísticas incluyen determinados intervalos de confianza, determinar el valor p, prueba de Student o funciones discriminantes de Fisher, etc. (véase, por ejemplo, Dowdy y Mearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1983). Los intervalos de confianza son preferentemente al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. El valor p es preferentemente menos del 0,1, menos del 0,05, menos del 0,01, menos del 0,005 o menos del 0,0001. Las enseñanzas de la presente invención permiten preferentemente detectar correctamente la enfermedad (CCR), en al menos el 60 %, en al menos el 70 %, en al menos el 80 %, o en al menos el 90 % de los sujetos de un grupo determinado o población analizado.

El término “fragmento”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una porción de una proteína, por ejemplo, una proteína seleccionada del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B o sus variantes.

La expresión “fragmento de una proteína susceptible de reconocerse por un anticuerpo que reconoce dicha proteína”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un fragmento de una proteína que se reconoce por un autoanticuerpo para dicha proteína, tal que se forma un complejo estable autoanticuerpo-fragmento de proteína. A modo de ilustración no limitante, dicha proteína puede ser una proteína seleccionada del grupo de proteínas que consisten en Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B.

La expresión “funcionalmente equivalente” aplicada a variantes de proteínas o fragmentos”, tal y como se utiliza en el presente documento, significa que la variante o el fragmento de la proteína en cuestión mantiene esencialmente las propiedades inmunológicas de dicha proteína en cuestión. Dichas propiedades inmunológicas se pueden determinar por medio de procedimientos convencionales tales como aquellos descritos en esta descripción (por ejemplo, por medio de ensayos de ELISA, etc.).

El término “gen Pim1”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen o a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína Pim1, como se define en el presente documento e incluye además, por extensión, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de dicha proteína Pim1 funcionalmente equivalente.

El término “gen SRC”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen o a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína SRC, como se define en el presente documento e incluye además, por extensión, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de dicha proteína SRC funcionalmente



equivalente.

El término "gen MAPKAPK3", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen o a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína MAPKAPK3, como se define en el presente documento e incluye además, por extensión, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de dicha proteína MAPKAPK3 funcionalmente equivalente. El término "gen FGFR4", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen o a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína FGFR4, como se define en el presente documento e incluye además, por extensión, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de dicha proteína FGFR4 funcionalmente equivalente.

El término "gen STK4", tal y como se utilizada en el presente documento, se refiere al gen o a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína STK4, como se define en el presente documento e incluye además, por extensión, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de dicha proteína STK4 funcionalmente equivalente.

El término "gen ACVR2B ", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen o a la secuencia de ácido nucleico que codifica para la proteína ACVR2B, como se define en el presente documento e incluye además, por extensión, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un fragmento de dicha proteína ACVR2B funcionalmente equivalente.

El término "identidad", aplicado a la comparación entre las secuencias aminoacídicas de dos proteínas, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a la proporción de aminoácidos idénticos entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan. El grado de identidad usualmente se expresa como un porcentaje ((%) de identidad) puede identificarse fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias; por medio de ilustración no limitada, el grado de identidad entre dos secuencias aminoacídicas puede determinarse por procedimientos convencionales, por ejemplo, por medio de procedimientos y algoritmos de computadoras conocidos por el experto en la técnica; por medio de ilustración, el grado de identidad entre dos secuencias aminoacídicas se puede determinar por medio de usar el algoritmo BLAST (BLAST Manual, Altschul et al., NCBI NIM Bethesda, Md. 20894, Altschul et al., J. Mol. Biol 1990; 215: 403-410).

El término "inmunoensayo", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier técnica analítica que basada en la reacción de conjugación entre un antígeno, por ejemplo, una proteína o un fragmento adecuado del mismo y un anticuerpo que reconoce dicho antígeno. A modo de ilustración, dicha proteína puede ser una proteína seleccionada del grupo de proteínas que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B o de las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3. Alternativamente se pueden usar fragmentos de dichas proteínas, es decir, fragmentos de proteínas susceptibles de reconocerse por anticuerpos que reconocen las proteínas en cuestión; a modo de ilustración, dichos fragmentos de proteínas pueden ser fragmentos de las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, o de las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3, susceptibles de reconocerse por los autoanticuerpos que reconocen dichas proteínas.

El término "marcador", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un reactivo indicador que permite detectar un complejo de tipo antígeno-anticuerpo, tal como una enzima que cataliza una reacción detectable, un compuesto que genera una señal cuando ello forma parte de dicho complejo, etc. A modo de ilustración no limitante, dicho marcador puede ser una enzima (por ejemplo, peroxidasa, glucosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, etc.), un compuesto fluorescente o fluoróforo (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, etc.), un compuesto (químico)luminiscente (por ejemplo, dioxetanos, acridinio, fenantridinio, rutenio, luminol, etc.), un elemento radiactivo (azufre, yodo, etc.), etc. En una realización particular, dicho marcador es una peroxidasa. La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con una o más sustancias adicionales.

El término "metástasis", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere pero no está limitado al procedimiento en el que un tumor, en este caso CCR, se extiende a los tejidos del organismo diferente del sitio primario de origen del tumor.

El término "muestra biológica", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere pero no está limitado a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia que sirva para llevar a cabo cualquiera de los procedimientos de la presente invención; es decir, dicha muestra biológica puede ser una muestra susceptible de contener anticuerpos, por ejemplo, autoanticuerpos para proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3, o susceptibles de contener los productos de expresión (ARN o proteínas) de los genes que codifican las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B. A modo de ilustración, dicha muestra biológica puede ser una muestra sanguínea, de orina, de saliva, de suero, de plasma, un frotis bucal o bucofaríngeo, un espécimen quirúrgico, un espécimen obtenido de una biopsia o autopsia, etc.

El término "nivel", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente a una cantidad cuantificable, semicuantificable o relativa de un producto, por ejemplo, autoanticuerpos, productos de expresión de los genes, etc., así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con dicho producto de expresión o que puede derivarse del

mismo. Dichos valores de parámetros comprenden valores de intensidad de señal obtenidos de cualquiera de las propiedades físicas o químicas del producto en cuestión. Los niveles de un producto pueden basarse generalmente en análisis cuantitativos y semicuantitativos; por medio de ilustración, procedimientos cuantitativos se pueden usar para determinar una cantidad relativa o absoluta de un producto específico en la muestra biológica sometida a ensayos y los procedimientos semicuantitativos pueden usarse para establecer el nivel de dicho producto específico por encima de un valor basal sin necesitar asignar un valor numérico relativo o absoluto.

Por medio de ilustración no numérica, el “nivel de un autoanticuerpo” para una proteína (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3), se refiere pero no se limita a la cantidad cuantificable, semicuantificable, o relativa de los autoanticuerpos para dichas proteínas (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3), así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con dichos autoanticuerpos o que puede derivarse de los mismos. Dichos valores de parámetros comprenden valores de intensidad de señal obtenidos de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los autoanticuerpos para dichas proteínas (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3) obtenidos bien por medio de medición directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopía de masas, resonancia magnética nuclear, etc., o por medio de medición indirecta, por ejemplo, por medio de cualquiera de los sistemas de medición descritos en el presente documento, por ejemplo, por medio de la medición obtenida a partir de un componente secundario (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3) se puede llevar a cabo usando un procedimiento disponible conocido por la persona experta en la técnica, por ejemplo, por medio de un inmunoensayo. El nivel del autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, o para las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3) determinado en una muestra biológica del sujeto en estudio se dice que es “mayor” que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, con respecto al nivel de referencia de dicho autoanticuerpo. De forma similar, el nivel de un autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B, o para las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3) determinado en una muestra biológica a partir del sujeto es estudio se dice que es “menos” que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo, cuando, de acuerdo con la invención, el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, más bajo que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo.

Asimismo, a modo de ilustración no limitante, el “nivel de expresión de un producto de expresión” de un gen o, en otras palabras, la cantidad de producto de expresión de un gen, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere pero no se limita a la cantidad cuantificable, semicuantificable, o relativa del producto de expresión de un gen determinado (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B), así como cualquier otro valor o parámetro relacionado con dicho producto de expresión o que puede derivarse del mismo. Dichos valores de parámetros comprenden valores de intensidad de señal obtenidos de cualquiera de las propiedades físicas o químicas del producto de expresión de dicho gen (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B) obtenido bien por medio de medida directa, o bien por medio de medida indirecta. La determinación del nivel de expresión de un producto de expresión de un gen (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B), determinado en una muestra biológica del sujeto en estudio se dice que es “mayor” que el nivel de referencia de dicho producto de expresión cuando, de acuerdo con la invención, el nivel de dicho producto de expresión de dicho gen en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, con respecto al nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen. De forma similar, el nivel de expresión del producto de expresión de un gen (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B), determinado en una muestra biológica del sujeto bajo estudio se dice que es “menos” que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen cuando, de acuerdo con la invención, el nivel de dicho producto de expresión en dicha muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, menor que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen.

El término “nivel de referencia”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere generalmente al nivel de un producto, por ejemplo, autoanticuerpos para proteínas (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3), productos de expresión de los genes (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, etc.), presentes en sujetos control. En una realización particular, dichos sujetos de control son sujetos quienes no padecen una enfermedad determinada (por ejemplo, CCR), mientras que en otra realización particular, dicho sujeto control es el sujeto real en estudio, que es particularmente útil para evaluar la monitorización de una enfermedad (por ejemplo, CCR) o para evaluar la efectividad de un tratamiento para dicha enfermedad (por ejemplo, CCR), etc., para lo que el nivel de referencia de un producto dado puede ser el nivel de dicho producto determinado en una muestra del mismo sujeto en estudio pero tomando días, semanas, meses o incluso años antes del propósito de evaluar la monitorización del sujeto, o tomar antes, por ejemplo, la aplicación en el sujeto de un tratamiento para dicha enfermedad para el propósito de evaluar su efectividad.

Debido a la variabilidad que puede ocurrir entre diferentes sujetos en términos de la producción de autoanticuerpos para proteínas (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3), o en términos de la producción de productos de expresión de genes (por ejemplo,

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, etc.), el nivel de referencia podría obtenerse de un grupo de muestras a partir de una población de sujetos sanos (por ejemplo, sujetos que no padecen CCR) y calculando el nivel medio del producto en cuestión (autoanticuerpo o producto de expresión de un gen) en dicha población de sujetos sanos.

5 El nivel de referencia de un producto determinado, por ejemplo, autoanticuerpos para proteínas (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, así como las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3), productos de expresión de los genes (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, etc.), etc., se pueden determinar a partir de una muestra de referencia que se puede analizar, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, conjuntamente con la muestra biológica del sujeto en estudio (muestra de prueba). El nivel de referencia se puede  
10 derivar generalmente a partir de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica hallada en una población de sujetos control. Dicha cantidad fisiológica se puede determinar por varias técnicas bien conocidas, dependiendo de la naturaleza del producto en cuestión (autoanticuerpo, producto de expresión de un gen, etc.), tal y como se utiliza en esta descripción.

15 De acuerdo con la presente descripción, dicho nivel de referencia permite discriminar la presencia de CCR y por lo tanto, puede usarse en el diagnóstico, pronóstico o monitorizarse en el progreso de un CCR.

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

20 El término "producto de la expresión" de un gen (o de una secuencia de ácidos nucleicos), tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia al producto resultante de la transcripción (ARN) o de la expresión (proteína) de un gen o de una secuencia de ácidos nucleicos, así como a cualquier forma resultante del procesamiento del producto resultante de la transcripción o de la expresión de un gen o de una secuencia de ADN.

25 El término "pronóstico", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere generalmente al conjunto de datos dentro de la ciencia médica con respecto a la probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso de la historia natural de una enfermedad es decir, es la predicción de los eventos que ocurrirán en el desarrollo de una enfermedad en términos estadísticos. En particular, el término "pronóstico de CCR", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere al conjunto de datos que permiten asignar una probabilidad de que determinadas situaciones tengan lugar en el transcurso del CCR. Así, de acuerdo con la presente invención ello incluye la capacidad  
30 de asignar una probabilidad de que determinadas situaciones tengan lugar en el transcurso del CCR, cuando se aplica un procedimiento para la clasificación de muestras bien en comparación del nivel de anticuerpos para al menos una de las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, o a todas o a algunas de las proteínas mencionadas en las tablas 2 y 3, con el nivel de referencia para dichos autoanticuerpos, o en la comparación del nivel de al menos un producto de expresión de un gen seleccionado del  
35 grupo que consiste en los genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión del gen. Esta asignación, tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en el 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes  
40 herramientas estadísticas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, prueba de Student, funciones discriminantes de Fisher, etc. Los intervalos de confianza son preferiblemente al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. El valor de p es preferiblemente menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001.

45 A modo de ilustración no limitante, el término pronóstico, tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a la probabilidad de muerte debida a CCR o debida a la progresión de CCR, incluyendo recurrencia o capacidad de diseminación metastásica, así como a la predicción de respuesta a un determinado tratamiento de CCR. El progreso de una enfermedad se puede monitorizar usando cualquier criterio de valoración usado en el campo del cáncer y conocido por la persona experta en la técnica. Los parámetros de valoración útiles para describir el progreso de una enfermedad incluyen pero no se limitan a:

50 -progreso libre de enfermedad que, tal y como se emplea en el presente documento, describe la proporción de pacientes en remisión completa que no han tenido una recaída de la enfermedad durante el periodo de tiempo en estudio;

-respuesta objetiva que, tal y como se emplea en el presente documento, describe la proporción de sujetos de una población tratada en la que se observa una respuesta completa o parcial;

55 -tiempo para progresión (TTP), que es una medida del tiempo después de que la enfermedad se diagnostica o trata hasta que la enfermedad se deteriora; se considera que la enfermedad ha progresado si los síntomas del cáncer, incluyendo masa del tumor incrementada, metástasis, metástasis incrementada, etc., se han deteriorado en relación con las medidas iniciales;

-supervivencia libre de enfermedad (DFS) que, tal y como se emplea en el presente documento, se define como el tiempo después del tratamiento en el que un paciente sobrevive sin signos de deterioro;

5 -supervivencia libre de progresión de 6 meses o tasa "PFS6" que, tal y como se emplea en el presente documento, se refiere al porcentaje de gente en la que la enfermedad no progresa en los primeros 6 meses después de comenzar la terapia;

- supervivencia media (MS) que, tal y como se emplea en el presente documento, se refiere al tiempo en el que la mitad de los pacientes enrolados en el estudio aún están vivos;

-supervivencia libre de recaídas distante (DPS) que, tal y como se emplea en el presente documento, se refiere al tiempo que transcurre desde la fecha de la cirugía hasta la metástasis o hasta la última visita; y

10 -supervivencia general (OS) que, tal y como se emplea en el presente documento, se refiere al tiempo que transcurre desde la fecha de la cirugía hasta la última visita o hasta la muerte del sujeto.

El término "proteína Pim1", tal y como se emplea en el presente documento, incluye la proteína Pim1 de un sujeto, preferiblemente un ser humano y variantes de la misma; en una realización particular, dicha proteína Pim1 es la proteína cuyo número de acceso es NP\_002639 y su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 1.

15 El término "proteína SRC", tal y como se emplea en el presente documento, incluye la proteína SRC de un sujeto, preferiblemente un ser humano y variantes de la misma; en una realización particular, dicha proteína SRC es la proteína cuyo número de acceso es NP\_005408 y su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 2.

20 El término "proteína MAPKAPK3", tal y como se emplea en el presente documento, incluye la proteína MAPKAPK3 de un sujeto, preferiblemente un ser humano y variantes de la misma; en una realización particular, dicha proteína MAPKAPK3 es la proteína cuyo número de acceso es NP\_004626 y su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 3.

El término "proteína FGFR4", tal y como se emplea en el presente documento, incluye la proteína FGFR4 de un sujeto, preferiblemente un ser humano y variantes de la misma; en una realización particular, dicha proteína FGFR4 es la proteína cuyo número de acceso es NP\_002002 y su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 4.

25 El término "proteína STK4", tal y como se emplea en el presente documento, incluye la proteína STK4 de un sujeto, preferiblemente un ser humano y variantes de la misma; en una realización particular, dicha proteína STK4 es la proteína cuyo número de acceso es NP\_006273 y su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 5.

30 El término "proteína ACVR2B", tal y como se emplea en el presente documento, incluye la proteína ACVR2B de un sujeto, preferiblemente un ser humano y variantes de la misma; en una realización particular, dicha proteína ACVR2B es la proteína cuyo número de acceso es NP\_001097 y su secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 6.

El término "monitorización del progreso", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a la supervisión del desarrollo de una enfermedad, tal como, por ejemplo, pero sin estar limitado a, la evaluación de la respuesta a un tratamiento determinado para dicha enfermedad (por ejemplo, CCR), o a la detección de la recurrencia de la diseminación de CCR.

35 El término "sujeto", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un ser humano. A efectos de claridad, los sujetos que padecen CCR se refieren ocasionalmente en esta descripción como "pacientes con CCR" o por medio de una expresión similar.

40 Una proteína es "sustancialmente homóloga" a una proteína determinada cuando su secuencia de aminoácidos tiene alineamiento adecuado con la secuencia de aminoácidos de dicha proteína determinada, por ejemplo, cuando su grado de identidad con respecto a dicha proteína determinada es de al menos el 50%, típicamente al menos el 70%, ventajosamente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95% y hasta más preferiblemente al menos el 99%. A modo de ilustración no limitante, en una realización particular, una proteína es sustancialmente homóloga a la proteína Pim1 cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, de al menos el 50%, típicamente al menos el 70%, ventajosamente al menos el 80%, preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90%, incluso más preferiblemente al menos el 95% y hasta más preferiblemente al menos el 99%. Las proteínas sustancialmente homólogas a las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B se pueden definir de la misma manera, pero reemplazando la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 con las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

El término "variante", tal y como se emplea en el presente documento, se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término variante incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postraduccionales tales como, por ejemplo, pero sin limitarse a, glucosilación, fosforilación o

metilación. De acuerdo con la presente invención, dichas variantes se reconocen por anticuerpos para la proteína en cuestión.

**Procedimiento de detección de autoanticuerpos**

5 La descripción describe un procedimiento para la detección de un autoanticuerpo para una proteína, de ahora en adelante “procedimiento de detección de autoanticuerpos”, que comprende

a) poner en contacto una muestra biológica con dicha proteína o con un fragmento de la misma susceptible de ser reconocida por dicho autoanticuerpo; y

b) detectar la formación de un complejo de autoanticuerpo-proteína, o un fragmento de la misma, susceptible de ser reconocido por dicho autoanticuerpo;

10 en el que dicha proteína está seleccionada del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B y combinaciones de las mismas.

15 La muestra biológica será generalmente una muestra susceptible de contener anticuerpos de un sujeto, y se puede obtener por procedimientos convencionales conocidos por las personas expertas en la técnica, dependiendo de la naturaleza de la muestra. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero, que se puede obtener por cualquier procedimiento convencional, por ejemplo, por medio de una extracción de sangre, etc. La sangre es opcionalmente el fluido biológico óptimo a usarse en procedimientos no invasivos para rastreo masivo para propósitos diagnósticos en poblaciones de sujetos grandes y por otro lado, la circulación de la sangre facilita el contacto de la sangre con todos los tejidos del cuerpo humano, incluyendo el contacto con tejido tumoral y sus antígenos representativos en el caso de pacientes con cáncer.

20 El procedimiento de detección de autoanticuerpos se puede llevar a cabo generalmente por medio de un inmunoensayo; ejemplos no limitantes ilustrativos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica incluyen realización de inmunoblot, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia (IF), inmunohistoquímica (IHQ) o microarrays de proteína, etc.

25 En la etapa a) del procedimiento de detección de autoanticuerpos una muestra biológica en la que la presencia de autoanticuerpos para las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B se va a analizar se pone en contacto con dichas proteínas o con fragmentos de las mismas susceptibles de reconocerse por dichos autoanticuerpos, en condiciones que permiten la formación de un complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. Si la muestra biológica contiene autoanticuerpos para dichas proteínas, entonces dicho complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo se formará, de otro modo, dicho complejo no se formará. Las condiciones adecuadas para la formación de un complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo que se dan se conocen por los expertos en la técnica.

30 Aunque dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B) podrían estar conjuntamente en un mismo medio, en la práctica es ventajoso para dichas proteínas estar separadas entre sí. Dichas proteínas pueden estar en solución o en suspensión en un medio adecuado, o pueden alternativamente depositarse o estar soportadas en un soporte (por ejemplo, una placa de microvaloración, perlas (magnéticas o no magnéticas), columnas, matrices, membranas, etc. Estos materiales se pueden usar en las formas adecuadas, tales como películas, láminas, placas, etc., o pueden usarse para revestir vehículos inertes (por ejemplo, papel, vidrio, películas de plástico, etc.). En una realización particular, dicha muestra biológica se pone en contacto con dichas proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B o con fragmentos de las mismas susceptibles de reconocerse por dichos autoanticuerpos, separados unos de otros y depositados en un soporte adecuado.

En una realización particular, los anticuerpos para dichas proteínas se identifican independientemente, mientras que en otra realización particular los autoanticuerpos para dichas proteínas se identifican simultáneamente.

45 En una realización particular, la muestra biológica a estudiarse se pone en contacto con una proteína individual seleccionada de entre las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, o con un fragmento de las mismas susceptible de reconocerse por dichos autoanticuerpos, separados unos de otros, opcionalmente depositados en un soporte adecuado, para el propósito de identificar autoanticuerpos para dichas proteínas.

50 La etapa b) del procedimiento de detección de autoanticuerpos comprende determinar la formación de un complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo. Esta etapa puede llevarse a cabo por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica, en la detección de la formación de complejos anticuerpo-antígeno (en este caso, autoanticuerpo-proteína o fragmento de la misma susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo).

55 En una realización particular, a modo de ilustración no limitante para la detección de dicho complejo, se pueden añadir un conjugado que comprende un anticuerpo que reconoce el autoanticuerpo y un marcador (anticuerpo secundario marcado) en condiciones que permiten la formación de un complejo (complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento

de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo)-anticuerpo/marcador y detectar la formación de dicho complejo. Si la muestra biológica contiene autoanticuerpos para una o más de dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B) entonces el complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo se habrá formado previamente, con lo que, cuando dicho complejo se pone en contacto con dicho conjugado que comprende el anticuerpo y el marcador en las condiciones adecuadas el complejo (autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo)-anticuerpo/marcador se forma, lo que se visualizará por medio de la técnica adecuada dependiendo del marcador usado, como se menciona más adelante, mientras que, de otro modo, es decir, cuando la muestra biológica no contiene autoanticuerpos para dicha(s) proteína(s), entonces dicho complejo (autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo)-anticuerpo/marcador no se formará. Las condiciones adecuadas para que tenga lugar la formación de este último complejo se conocen por las personas expertas en la técnica.

Virtualmente cualquier reactivo indicador que permita detectar dicho complejo (autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo)-anticuerpo/marcador se puede usar al poner en práctica la presente invención; a modo de ilustración no limitante dicho marcador puede ser una enzima que cataliza cualquier reacción detectable (por ejemplo, peroxidasa, glucosidasa, fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa,  $\beta$ -galactosidasa,  $\beta$ -glucosidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, etc.), un compuesto que genera una señal cuando ello forma parte de dicho complejo (por ejemplo, un compuesto fluorescente o fluoróforo tal como fluoresceína, rodamina, etc.; un compuesto (químico)luminiscente, tal como un dioxetano, un acridinio, un fenantridinio, rutenio, luminol, etc.), etc., un elemento radiactivo (azufre, yodo, etc.), etc. En una realización particular, dicho marcador es una peroxidasa. La selección de un marcador particular no es crítica, siempre y cuando sea capaz de producir una señal por sí mismo o conjuntamente con una o más sustancias adicionales. El complejo (autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo)-anticuerpo/marcador formado se puede detectar o visualizar por cualquier técnica adecuada, dependiendo del marcador elegido, conocida por los expertos en la técnica, usando los dispositivos adecuados, por ejemplo, por medio de técnicas basadas en los procedimientos colorimétrico, fluorométrico, (químico)luminiscente, radiactivo, etc., todos ellos conocidos por los expertos en la técnica.

El conjugado que comprende dicho anticuerpo que reconoce dicho autoanticuerpo y dicho marcador se puede obtener por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

A modo de ilustración, cuando el marcador es una enzima, la detección del complejo en cuestión se puede llevar a cabo poniendo en contacto dicho complejo con un sustrato adecuado y opcionalmente, con agentes de amplificación enzimática adecuada y/o activadores. Ejemplos ilustrativos no limitantes de dichos sustratos incluyen:

- para la fosfatasa alcalina:

cromogénicos: sustratos basados en p-nitrofenilfosfato (p-NPP), 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolio (BCIP/NTP), etc.

fluorogénicos: 4-metilumbelifenilfosfato (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-clorop-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), 3,6-fluoresceína-disfosfato (3,6-FDP), etc.

- para peroxidasas:

cromogénicos: sustratos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinhidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetracloruro de 3,3'-diaminobencidina (DAB), etc.

fluorogénicos: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxacinas reducidas y benzotiazinas reducidas, incluyendo el reactivo Amplex<sup>®</sup> rojo, Amplex ultrarrojo, dihidroxantenos reducidos, etc.

- para glucosidasas:

cromogénicos: sustratos basados en o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (o-NPG), p-nitrofenil-  $\beta$ -D-galactósido y 4-metilumbelifenil-  $\beta$ -D-galactósido (MUG) para  $\beta$ -D-galactósido, etc.

fluorogénicos: resufurina,  $\beta$ -D-galactopiranósido, digalactósido de fluoresceína (FGD), diglucurónido de fluoresceína, 4 metilumbeliferilo, beta-D-galactopiranósido, carboxiumbeliferilo, beta-D-galactopiranósido, cumarina fluorada beta-D-galactopiranósido, etc.

En una realización particular, dicho marcador es una peroxidasa y el sustrato cromogénico es TMB.

Por lo tanto, por medio de poner en práctica el procedimiento de detección de autoanticuerpos, es posible detectar y obtener un autoanticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína Pim1, un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4, un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B y

combinaciones de dichos autoanticuerpos. En una realización particular, los autoanticuerpos identificados por medio del procedimiento de detección de autoanticuerpos son específicos, es decir, reconocen la proteína en cuestión (o fragmento de la misma susceptible de reconocerse por dicho anticuerpo) con una preferencia sobre otras proteínas o fragmentos de 2 a más veces, más de 3 veces, más de 10 veces, más de 20 veces, más de 100 veces, o incluso un número mayor de veces.

Opcionalmente, si se desea, el complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo formado, por ejemplo, por medio de usar técnicas de inmunoprecipitación, etc., se pueden aislar y la secuencia del autoanticuerpo responsable de unión a la proteína o fragmento de la misma susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo puede secuenciarse posteriormente por medio del uso de los procedimientos proteómicos estándar descritos en la técnica tales como la determinación de la huella dactilar peptídica del análisis MS/MS (Vikas Dhingraa, et al. 2005. International Journal of Pharmaceutics (1-2), páginas 1-18; Hanash S.M. et al. Nature. 3 de abril de 2008; 452 (7187): 571-9).

El procedimiento para la detección de autoanticuerpos puede también usarse para determinar el nivel o cantidad (cuantificación) de anticuerpos para dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B) presentes en la muestra biológica en estudio debido a que, con muchos marcadores, por ejemplo, enzimas, la cantidad de autoanticuerpo presente en la muestra biológica es proporcional a la señal generada.

La detección del complejo autoanticuerpo-proteína, o fragmento de la misma, susceptible de reconocerse por dicho autoanticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos específicos para dicha(s) proteína(s) en la muestra biológica y además, si se desea, la cantidad de anticuerpos para dichas proteínas presentes en dicha muestra biológica se puede cuantificar. Dentro del contexto de la presente invención, dicha información se puede usar en el diagnóstico, pronóstico o monitorización del progreso de las enfermedades, particularmente el cáncer colorrectal (CCR), en un sujeto.

#### **Procedimientos de obtener datos**

La descripción también describe un procedimiento de obtener datos en una muestra biológica de un sujeto, de ahora en adelante "procedimiento de obtener datos 1", que comprende detectar al menos un anticuerpo para una proteína, en el que dicho anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína Pim1, un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B y si se desea, determinar el nivel de dicho autoanticuerpo en dicha muestra biológica.

Por medio del procedimiento de obtención de datos 1 el nivel de uno o más de los autoanticuerpos ya mencionados pueden detectarse e identificarse y si se desea, cuantificarse.

La detección de tales autoanticuerpos se puede llevar a cabo por procedimientos convencionales conocidos por personas expertas en la técnica; en una realización particular, la detección de dichos autoanticuerpos se lleva a cabo por medio de un inmunoensayo (por ejemplo, inmunoblot, ELISA, LIA, RIA, IF, IHQ, microarrays de proteínas, etc.), tales como un inmunoensayo adecuado para detectar e identificar dichos autoanticuerpos para las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, por ejemplo, como se ha descrito en relación con el procedimiento de detección, de autoanticuerpos de la invención. En una realización particular dicho inmunoensayo es un microarray de proteínas o un ELISA.

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

En una realización particular, la detección de autoanticuerpos para proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, por medio de microarrays de proteínas comprende las siguientes etapas: (a) recubrir un soporte sólido con una o más proteínas, preferentemente separadas unas de otras, seleccionadas del grupo que consiste en proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, o con fragmentos de las mismas susceptibles de ser reconocidos por los autoanticuerpos para las correspondientes proteínas; (b) incubar el soporte recubierto de la etapa (a) con una muestra biológica de un sujeto en condiciones que permiten la formación de un inmunocomplejo del autoanticuerpo para la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B presente en dicha muestra con los determinantes antigénicos presentes en dichas proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, o en sus fragmentos susceptibles de reconocerse por dichos autoanticuerpos; y (c) añadir un anticuerpo secundario, que reconoce el autoanticuerpo para la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, conjugada o unida a un compuesto marcador.

El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede inmovilizarse sobre un soporte sólido, más tarde se pone en contacto este sistema con una fase fluida que contiene un compuesto complementario que se puede unir a un compuesto marcador. Hay diferentes tipos de ELISA: ELISA

directo, ELISA indirecto o ELISA en sándwich.

En otra realización particular, la detección de autoanticuerpos para Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, se lleva a cabo por medio de un ELISA, preferentemente, por medio de un ELISA indirecto, que comprende las siguientes etapas: (a) recubrir un soporte sólido con una o más proteínas, preferentemente separadas unas de otras, seleccionadas del grupo que consiste en proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, o con fragmentos de las mismas susceptibles de ser reconocidos por los autoanticuerpos para las correspondientes proteínas; (b) incubar el soporte recubierto de la etapa (a) con una muestra biológica de un sujeto en condiciones que permiten la formación de un inmunocomplejo del autoanticuerpo para la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B presente en dicha muestra con los determinantes antigénicos presentes en dichas proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, o en sus fragmentos susceptibles de reconocerse por dichos autoanticuerpos; y (c) añadir un anticuerpo secundario, que reconoce el autoanticuerpo para la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, conjugada o unida a un compuesto marcador.

Como se menciona previamente, dicho marcador es un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radioactiva y/o quimioluminiscente que permite la detección, identificación y opcionalmente, cuantificación de la cantidad del autoanticuerpo para la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B en la muestra analizada. En una realización particular, dicho compuesto marcador está seleccionado del grupo que consiste en radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de conjugarse con otra molécula o de detectarse y/o cuantificarse directamente. Este compuesto marcador puede unirse al autoanticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Ejemplos no limitantes ilustrativos, de dichos compuestos marcadores que se unen directamente al autoanticuerpo incluyen enzimas, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos, tales como <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>S, etc., fluorocromos, tales como fluoresceína, etc., o partículas metálicas, para su detección directa por medio de colorimetría, autorradiografía, fluorometría, o metalografía, respectivamente.

En una realización particular, el procedimiento de obtener datos 1 comprende, además de detectar al menos un autoanticuerpo seleccionado del grupo de autoanticuerpos formado por autoanticuerpos para la proteína Pim1, un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, la etapa de determinar el nivel o cantidad (cuantificación) de dicho autoanticuerpo en dicha muestra biológica en estudio dado que, con muchos marcadores, por ejemplo, enzimas, la cantidad de autoanticuerpo presente en la muestra biológica es proporcional a la señal generada. En este caso, la señal obtenida usando los diferentes procedimientos descritos anteriormente para detectar los autoanticuerpos se pueden analizar y cuantificar por procedimientos convencionales que permiten la cuantificación de dicha señal.

El procedimiento para obtener datos 1 se puede usar también para determinar la cantidad (cuantificación) de autoanticuerpos para dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B) presentes en la muestra biológica en estudio, con muchos marcadores, por ejemplo, enzimas, la cantidad de autoanticuerpo presente en la muestra biológica es proporcional a la señal generada.

La detección del complejo de autoanticuerpo-proteína, o un fragmento de la misma, susceptible de ser reconocido por dicho autoanticuerpo es indicativa de la presencia de autoanticuerpos específicos para dicha(s) proteína(s) en la muestra biológica y además, si desea, la cantidad de autoanticuerpos para dichas proteínas presentes en dicha muestra biológica se pueden cuantificar. Dentro del contexto de la presente invención, dicha información se puede usar en el diagnóstico, pronóstico o monitorización del progreso de enfermedades, particularmente cáncer colorrectal (CCR), en un sujeto.

En una realización particular, solo el nivel de autoanticuerpos para una única proteína, por ejemplo para proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, se detecta y opcionalmente se cuantifica. En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para dos o más proteínas del grupo que consiste en proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B se detecta y opcionalmente se cuantifica. Por medio de ilustración, las combinaciones de 2, 3, 4, 5 o 6 autoanticuerpos para las proteínas seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B se pueden detectar y si se desea, cuantificar. Así, a modo de ilustración, el nivel de autoanticuerpos para las combinaciones de dichas proteínas mencionadas en la siguiente lista de combinaciones se puede detectar y opcionalmente cuantificar:

#### Lista de combinaciones

Pim1, SRC

Pim1, MAPKAPK3

Pim1, FGFR4

Pim1, STK

Pim1, ACVR2B



SRC, MAPKAPK3  
SRC, FGFR4  
SRC, STK4  
SRC, ACVR2B  
5 MAPKAPK3, FGFR4  
MAPKAPK3, STK4  
MAPKAPK3, ACVR2B  
FGFR4, STK4  
FGFR4, ACVR2B  
10 STK4, ACVR2B  
Pim1, SRC, MAPKAPK3  
Pim1, SRC, FGFR4  
Pim1, SRC, STK4  
Pim1, SRC, ACVR2B  
15 Pim1, MAPKAPK3, FGFR4  
Pim1, MAPKAPK3, STK4  
Pim1, MAPKAPK3, ACVR2B  
Pim1, FGFR4, STK4  
Pim1, FGFR4, ACVR2B  
20 Pim1, STK4, ACVR2B  
SRC, MAPKAPK3, FGFR4  
SRC, MAPKAPK3, STK4  
SRC, MAPKAPK3, ACVR2B  
SRC, FGFR4, STK4  
25 SRC, FGFR4, ACVR2B  
SRC, STK4, ACVR2B  
20 MAPKAPK3, FGFR4, STK4  
MAPKAPK3, FGFR4, ACVR2B  
MAPKAPK3, STK4, ACVR2B  
30 FGFR4, STK4, ACVR2B  
Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4  
Pim1, SRC, MAPKAPK3, STK4  
Pim1, SRC, MAPKAPK3, ACVR2B  
Pim1, SRC, FGFR4, STK4  
35 Pim1, SRC, FGFR4, ACVR2B

Pim1, SRC, STK4, ACVR2B

Pim1, MAPKAPK3, FGFR4, STK4

Pim1, MAPKAPK3, FGFR4, ACVR2B

Pim1, MAPKAPK3, STK4, ACVR2B

5 Pim1, FGFR4, STK4, ACVR2B

SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4

SRC, MAPKAPK3, FGFR4, ACVR2B

SRC, MAPKAPK3, STK4, ACVR2B

SRC, FGFR4, STK4, ACVR2B

10 MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, FGFR4, STK4, ACVR2B

15 Pim1, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B

SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B

20 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1 se detecta y opcionalmente se cuantifica; en otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1 se detecta y opcionalmente se cuantifica y además el nivel de autoanticuerpos para una o más de las siguientes proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, de acuerdo con las combinaciones previamente mencionadas. Adicionalmente, si se desea, el nivel de autoanticuerpos para otras proteínas, por ejemplo, para proteínas potencialmente útiles en el diagnóstico de CCR, tales como CEA, etc., se pueden detectar y opcionalmente determinar.

25 En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína SRC se detecta y opcionalmente se cuantifica; en otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína SRC se detecta y opcionalmente se cuantifica y además el nivel de autoanticuerpos para una o más de las siguientes proteínas Pim1, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, de acuerdo con las combinaciones previamente mencionadas. Adicionalmente, si se desea, el nivel de autoanticuerpos para otras proteínas, por ejemplo, para proteínas potencialmente útiles en el diagnóstico de CCR, tales como CEA, etc., se pueden detectar y opcionalmente determinar.

30 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 se detecta y opcionalmente se cuantifica; en otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 se detecta y opcionalmente se cuantifica y además el nivel de autoanticuerpos para una o más de las siguientes proteínas Pim1, SRC, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, de acuerdo con las combinaciones previamente mencionadas. Adicionalmente, si se desea, el nivel de autoanticuerpos para otras proteínas, por ejemplo, para proteínas potencialmente útiles en el diagnóstico de CCR, tales como CEA, etc., se pueden detectar y opcionalmente determinar.

35 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína FGFR4 se detecta y opcionalmente se cuantifica; en otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína FGFR4 se detecta y opcionalmente se cuantifica y además el nivel de autoanticuerpos para una o más de las siguientes proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, STK4 y/o ACVR2B, de acuerdo con las combinaciones previamente mencionadas. Adicionalmente, si se desea, el nivel de autoanticuerpos para otras proteínas, por ejemplo, para proteínas potencialmente útiles en el diagnóstico de CCR, tales como CEA, etc., se pueden detectar y opcionalmente determinar.

40 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína STK4 se detecta y opcionalmente se cuantifica; en otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína STK4 se detecta y opcionalmente se cuantifica y además el nivel de autoanticuerpos para una o más de las siguientes proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 y/o ACVR2B, de acuerdo con las combinaciones previamente mencionadas. Adicionalmente, si se desea, el nivel de autoanticuerpos para otras proteínas, por ejemplo, para proteínas potencialmente útiles en el diagnóstico de CCR, tales como CEA, etc., se pueden detectar y opcionalmente determinar.

5 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B se detecta y opcionalmente se cuantifica; en otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B se detecta y opcionalmente se cuantifica y además el nivel de autoanticuerpos para una o más de las siguientes proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 y/o STK4, de acuerdo con las combinaciones previamente mencionadas. Adicionalmente, si se desea, el nivel de autoanticuerpos para otras proteínas, por ejemplo, para proteínas potencialmente útiles en el diagnóstico de CCR, tales como CEA, etc., se pueden detectar y opcionalmente determinar.

10 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B, preferiblemente, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B se detecta y opcionalmente se cuantifica.

En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 y el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B y opcionalmente, el nivel de autoanticuerpos para la proteína FGFR4 se detecta y opcionalmente se cuantifica.

15 En una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B y opcionalmente, el nivel de autoanticuerpos para la proteína FGFR4 se detecta y opcionalmente se cuantifica.

20 Dentro del procedimiento de la presente invención, los datos obtenidos por el procedimiento de obtención de datos 1 relativos a la detección y opcionalmente, cuantificación de anticuerpos para una o más de las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, se pueden usar en el diagnóstico, pronóstico o monitorización del progreso de la enfermedad, particularmente cáncer colorrectal (CCR) en un sujeto.

25 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de obtener datos en una muestra biológica de un sujeto, de ahora en adelante "procedimiento de obtener datos 2 de la invención", que comprende detectar el producto de expresión del gen Pim1 y el producto de expresión de al menos otro gen, en el que dicho gen está seleccionado del grupo constituido por los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B y si se desea, cuantificar el nivel de expresión de dicho producto de expresión de dicho gen en dicha muestra biológica en el que dicha muestra biológica comprende células tumorales de cáncer colorrectal.

30 Por medio del procedimiento de obtener datos 2 de la invención el nivel de un producto de expresión de el gen Pim1 y el nivel del producto de expresión de uno o más de los genes mencionados anteriormente puede detectarse e identificarse y si se desea, cuantificarse, permitiendo así la posibilidad de establecer la presencia o ausencia de un producto de expresión del gen Pim1 y la presencia o ausencia de un producto de expresión uno o más de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B y donde sea apropiado si se desea, cuantificar el nivel de expresión de dicho producto de expresión.

35 La muestra biológica usada para poner en práctica el procedimiento de obtener datos 2 de la invención es una muestra biológica que comprende células tumorales CCR. A modo de ilustración no limitante, dicha muestra biológica que contiene células tumorales puede ser una muestra de un fluido biológico o, preferiblemente, una muestra de un tejido, por ejemplo, una biopsia tumoral, una biopsia de aspiración de aguja fina, etc. La muestra biológica puede ser, por ejemplo pero no limitada a, recién preparada, congelada, fijada o embebida en parafina.

40 En una realización particular, dicha muestra biológica es una biopsia tumoral que comprende células tumorales CCR a partir de un paciente que padece CCR o de una biopsia de tejido de colon o rectal de un sujeto en estudio para el propósito, por ejemplo, de evaluar si o si no él/ella padece CCR.

45 Los procedimientos para la detección y cuantificación de un producto de expresión de un gen son ampliamente conocidos por una persona experta en la técnica e incluyen un número de alternativas. Virtualmente cualquier procedimiento que permite la detección y, si se desea, la cuantificación de un producto de expresión de un gen seleccionado del grupo de genes que consiste en el Pim1, y uno o más de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, se pueden usar en poner en práctica el procedimiento de obtener datos 2 de la invención,

50 Así, en una realización particular, la detección del producto de expresión de un gen determinado (por ejemplo, Pim1 y uno o más de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) se lleva a cabo analizando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, en este caso, el análisis del nivel de ARNm se puede llevar a cabo, a modo de ilustración no limitante, por medio de un procedimiento de amplificación enzimática, por ejemplo, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la transcripción reversa combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), la transcripción reversa combinada con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro procedimiento de amplificación de ácidos nucleicos; microarrays de ADN preparados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de ADN preparados con oligonucleótidos sintetizados in situ por medio de fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación in situ usando sondas específicas marcadas con cualquier procedimiento de marcaje; por medio de genes electroforesis, por medio de transferencia e hibridación de membranas con una sonda específica; por medio de resonancia magnética nuclear o cualquier otra técnica de formación de imágenes diagnósticas usando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. Adicionalmente, este procedimiento de obtener datos 2 de

la invención puede incluir llevar a cabo una etapa de extracción para el propósito de obtener el ARN total, que se puede hacer por medio de técnicas convencionales (Chomczynski P., *Biotechniques*, 1993, 15: 532). Se puede encontrar información adicional sobre procedimientos para detectar y cuantificar los niveles de expresión de un producto de expresión un gen, por ejemplo, en Sambrook et al., 2001 "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., vol. 1-3. En una realización particular del procedimiento de obtener datos 2 de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados anteriormente (Pim1, y uno o más de SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B) se lleva a cabo por medio de PCR cuantitativa múltiple por medio de un array de ADN o de ARN.

En otra realización particular, la detección y opcionalmente, la cuantificación del nivel de expresión de dicho producto de expresión del gen Pim1 y de uno o más de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B en la muestra a analizarse se lleva a cabo analizando el nivel de la proteína Pim1 y de una o más de las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, o fragmentos de las mismas; en este caso el análisis del nivel de dichas proteínas se puede llevar a cabo, por medio de ilustración no limitante, por medio de un inmunoensayo, por medio de resonancia magnética nuclear o por medio de cualquier otra técnica adecuada conocida en el estado de la técnica. En una realización preferida, la determinación de la cantidad de la proteínas proteína Pim1 y de una o más de las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, o de sus fragmentos, se lleva a cabo por medio de un inmunoensayo.

En una realización preferida particular, dicho inmunoensayo es un inmunoblot (Western blot o inmunodetección en membrana). Para este fin, brevemente, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas mediante electroforesis en un medio de soporte capaz de retenerlas. Una vez separadas, las proteínas se transfieren a un soporte diferente o membrana donde pueden detectarse mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a las proteínas en cuestión (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B) o a los fragmentos funcionalmente equivalentes de las mismas. Dicha membrana se hibrida con un primer anticuerpo específico (o anticuerpo primario) que reconoce a la proteína en cuestión (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B) o a un fragmento funcionalmente equivalente de la misma. La membrana se hibrida entonces con un segundo anticuerpo (o anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica al anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, o al fragmento funcionalmente equivalente de la misma, el que está conjugado o unido a un compuesto marcador y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Se conocen en el estado de la técnica diferentes formatos, soportes y técnicas que se pueden emplear para llevar a cabo este aspecto preferido del procedimiento de obtener datos 2 de la invención.

En otra realización preferida particular, el inmunoensayo comprende un ensayo inmunohistoquímico. Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la identificación, en muestras de tejidos, de determinantes antigénicos característicos. El análisis por medio de inmunohistoquímica (IHQ) se lleva a cabo en selección de tejidos, bien congelados o bien incluidos en parafina, a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estas secciones están hibridadas con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a anticuerpos específicos que reconocen a las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, o a los fragmentos funcionalmente equivalentes de las mismas. A continuación las secciones se hibridan con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, o al fragmento funcionalmente equivalente de las mismas el que está conjugado o unido a un compuesto marcador y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

En una realización particular, el nivel de un producto de expresión de dos o más genes seleccionados del grupo que consiste en los genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B en los que uno de dichos productos de expresión es el producto de expresión del gen Pim1 se detecta y opcionalmente se cuantifica. A modo de ilustración, los productos de expresión de 2, 3, 4, 5 o 6 de dichos genes se pueden detectar y si se desea, se pueden cuantificar, en los que uno de dichos productos de expresión es un producto de expresión del gen Pim1.

En una realización particular, el nivel de un producto de expresión del gen Pim1, el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B, preferiblemente, el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B ese detecta y opcionalmente se cuantifica.

En otra realización particular, el nivel de un producto de expresión del gen Pim1, el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B y opcionalmente el nivel del producto de expresión del gen FGFR4 se detectan y opcionalmente se cuantifican.

Dentro del contexto de la presente invención, los datos obtenidos de acuerdo con el procedimiento de obtener datos 2 de la invención, relativos a la detección y opcionalmente, cuantificación de productos de expresión de los genes Pim1 y uno o más de, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, se pueden usar en el diagnóstico, pronóstico o monitorización el progreso de las enfermedades, particularmente el cáncer colorrectal (CCR), en un sujeto.

#### **Procedimientos de diagnóstico**

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR), de ahora en adelante “procedimiento de diagnóstico 1 de la invención”, que comprende comparar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica de dicho sujeto, con el nivel de referencia de dicho(s) anticuerpo(s) en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo y en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo, entonces el sujeto se diagnostica con CCR.

El procedimiento de diagnóstico 1 de la invención comprende previamente determinar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica del sujeto en cuestión. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma y suero de dicho sujeto. El nivel de dichos autoanticuerpos se puede determinar cómo se ha indicado anteriormente en relación con el procedimiento de detección de autoanticuerpos de la invención o con el procedimiento de obtener datos 1 de la invención.

Una vez el nivel de los autoanticuerpos para la proteína Pim1 y el nivel de uno o más de los autoanticuerpos para las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B se determina en dicha muestra biológica, el procedimiento de diagnóstico 1 de la invención comprende comparar el nivel de dicho autoanticuerpo (o de dichos autoanticuerpos) con el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo (o con los niveles de referencia para los autoanticuerpos en cuestión) en los que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo y en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos autoanticuerpos y/o si el nivel del autoanticuerpo para ACVR2B en dicha muestra es menor que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, entonces dicho sujeto se diagnostica con CCR.

En una realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de autoanticuerpos para dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en una muestra de control, tal como, por ejemplo, una muestra de sangre, suero o plasma, a partir de una población de sujetos control (es decir, quienes no padecen CCR). Generalmente se considerará que el nivel de un autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 o STK4) en la muestra biológica del sujeto en estudio es “mayor” que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo cuando el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo. De forma similar, se considerará generalmente que el nivel de un autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, ACVR2B) en la muestra biológica del sujeto en estudio es “menor” que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo cuando el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, menor que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo.

En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para dos o más proteínas del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, en las que el menos una de las proteínas es Pim1, en la muestra del sujeto a analizarse se cuantifica y los niveles obtenidos se comparan con los niveles de referencia de los autoanticuerpos para las proteínas correspondientes. A modo de ilustración, los anticuerpos para las proteínas 2, 3, 4, 5 y 6 seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, tal como se mencionan en la mencionada lista de combinaciones, se pueden cuantificar.

Así, en una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1 y el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B, preferentemente, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B se cuantifica y compara con su nivel de referencia.

En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 y el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B y opcionalmente el nivel de autoanticuerpos para la proteína FGFR4 se cuantifican y comparan con su nivel de referencia.

El procedimiento de diagnóstico 1 de la invención permite diagnosticar si un sujeto padece CCR con un alto grado de fiabilidad dado que ello permite detectar correctamente dicha enfermedad (CCR) en al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% de los sujetos de un grupo determinado de población analizados. Dicho procedimiento se puede usar en cualquier estadio de CCR. En una realización particular, el sujeto es un paciente que padece CCR en los estadios, tales como los estadios 0, I y II.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR), de ahora en adelante "procedimiento de diagnóstico 2 de la invención", que comprende comparar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de al menos un producto de expresión de un gen, en el que dicho gen está seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, en una muestra de dicho sujeto, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho(s) gen(es) en la que el nivel de dicho producto de expresión del gen Pim1 es mayor que nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si el nivel de producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen, dicho sujeto se diagnostica con CCR.

El procedimiento de diagnóstico 2 de la invención comprende previamente determinar el nivel de expresión de un producto de expresión (por ejemplo, ARN o proteína) del gen Pim1 y al menos un producto de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, en una muestra biológica del sujeto en cuestión. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de tejido de colon o rectal, o de tejido tumoral (donde sea apropiado), sangre, plasma o suero de dicho sujeto. El nivel de dicho producto de expresión se puede determinar, dependiendo de su naturaleza (ARN o proteína), como se ha indicado anteriormente en relación con el procedimiento de obtener datos 2 de la invención.

Una vez el nivel de expresión del producto de expresión del gen Pim1 y de uno o más de los productos de expresión de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B se determina en dicha muestra biológica, el procedimiento de diagnóstico 2 de la invención comprende comparar el nivel de dicho producto de expresión (o de dichos productos de expresión) con el nivel de referencia para dicho producto de expresión (o con los niveles de referencia para dichos productos de expresión en cuestión), en el que si el nivel de dicho producto de expresión del gen Pim1 es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el nivel de referencia para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si el nivel de producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen, entonces dicho sujeto se diagnostica con CCR.

En una realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de producto de expresión de dicho gen (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en una muestra biológica, preferiblemente del colon, de una población de sujetos control (es decir, sujetos que no padecen CCR). Se considerará generalmente que el nivel de un producto de expresión de un gen (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 y STK4) en la muestra del sujeto en estudio es "mayor" que el nivel de referencia de dicho producto de expresión cuando la relación entre el nivel del producto de expresión del gen en cuestión determinado en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, el nivel de referencia de dicho de dicho producto de expresión de dicho gen. De forma similar, se considerará generalmente que el nivel de un producto de expresión de un gen (por ejemplo, ACVR2B) en la muestra biológica del sujeto en estudio es "menos" que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen cuando el nivel de dicho producto de expresión de dicho gen en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, menor que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen.

En otra realización particular, los niveles de expresión de productos de expresión de dos o más genes del grupo que consiste en los genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B en los que uno de los genes es el gen Pim1, en la muestra del sujeto a analizarse se cuantifican y los niveles obtenidos se comparan con los niveles de referencia de dichos productos de expresión de los genes en cuestión. A modo de ilustración, los productos de expresión de 2, 3, 4, 5 y 6 genes seleccionados del grupo que consiste en los genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, tales como, por ejemplo, los siguientes productos de expresión se pueden cuantificar:

**Lista de combinaciones de genes**

- Pim1, SRC
- Pim1, MAPKAPK3
- Pim1, FGFR4
- Pim1, STK4
- Pim1, ACVR2B
- Pim1, SRC, MAPKAPK3
- Pim1, SRC, FGFR4

Pim1, SRC, STK4

Pim1, SRC, ACVR2B

Pim1, MAPKAPK3, FGFR4

Pim1, MAPKAPK3, STK4

5 Pim1, MAPKAPK3, ACVR2B

Pim1, FGFR4, STK4

Pim1, FGFR4, ACVR2B

Pim1, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4

10 Pim1, SRC, MAPKAPK3, STK4

Pim1, SRC, MAPKAPK3, ACVR2B

Pim1, SRC, FGFR4, STK4

Pim1, SRC, FGFR4, ACVR2B

Pim1, SRC, STK4, ACVR2B

15 Pim1, FGFR4, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, FGFR4, STK4, ACVR2B

20 Pim1, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B

Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4, ACVR2B

25 En una realización particular, el nivel de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B, preferentemente el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B se cuantifica y compara con sus niveles de referencia.

En otra realización particular, el nivel de un producto de expresión del gen Pim1, el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 y el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen FGFR4 se cuantifican y comparan con sus niveles de referencia.

30 El procedimiento de diagnóstico 2 de la invención permite diagnosticar si un sujeto padece CCR con un alto grado de fiabilidad dado que ello permite detectar correctamente dicha enfermedad (CCR) en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, o al menos el 90 % de los sujetos de un grupo determinado o población analizado. Dicho procedimiento se puede usar en cualquier estadio del CCR. En una realización particular, el sujeto es un paciente que padece CCR en estadios iniciales, tales como estadios 0, I y II.

**Procedimiento de pronóstico/monitorización**

35 Las enseñanzas de la presente invención son también útiles para predecir o evaluar la respuesta a un tratamiento determinado. El tratamiento principal de CCR es típicamente tratamiento quirúrgico (cirugía), por ejemplo pero no limitado a, por medio de escisión o resección local. Algunos pacientes con CCR antes de cirugía reciben terapia “neoadyuvante” para el propósito de reducir el tamaño del CCR, con el fin de permitir o facilitar la cirugía. Después de la cirugía, muchos pacientes reciben terapia coadyuvante para el propósito de evitar la recaída del cáncer en el  
40 colon, en el recto o en otro sitio. En el tratamiento de CCR, la terapia coadyuvante o neoadyuvante puede consistir, por ejemplo pero no limitada a, en radioterapia, quimioterapia o terapia biológica. Algunos ejemplos de compuestos usados en quimioterapia o terapia biológica incluyen pero no se limitan a ácido fólico, fluorouracilo, irinotecán, oxaliplatina, leucovorina, levamisol, cetuximab o bevacirumab.

45 Por lo tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), de ahora en adelante “procedimiento de pronóstico 1

de la invención”, que comprende comparar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica de dicho paciente que padece CCR, con el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo, en el que si el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1, es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dicho autoanticuerpo y en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en la muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos autoanticuerpos, y/o si el nivel del autoanticuerpo para ACVR2B en dicha muestra es menor que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, entonces dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

El procedimiento de pronóstico 1 de la invención comprende determinar previamente el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica del paciente que padece CCR en cuestión. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero de dicho paciente que padece CCR para el propósito de evaluar la monitorización del progreso de la enfermedad (CCR). El nivel de dichos autoanticuerpos se puede determinar cómo se ha indicado anteriormente en relación con el procedimiento de detección de autoanticuerpos de la invención con el procedimiento de obtener datos 1 de la invención.

Una vez el nivel de los autoanticuerpos para la proteína Pim1 y el nivel de uno o más de los autoanticuerpos para las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y/o ACVR2B, en dicha muestra biológica se determina, el procedimiento de pronóstico 1 de la invención comprende comparar el nivel de dicho autoanticuerpo (o de dichos autoanticuerpos) con el nivel de referencia para dicho(s) autoanticuerpo(s) (o con los niveles de referencia para los autoanticuerpos en cuestión), en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo y en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo, después dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

En una realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de autoanticuerpos para dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en una muestra, preferiblemente de suero, a partir de sujetos que no presentan CCR. En otra realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de autoanticuerpos para dichas proteínas (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en una muestra, preferentemente de suero, del mismo paciente que padece CCR previamente obtenido, por ejemplo antes de la administración de un tratamiento para CCR, para el propósito de evaluar la efectividad de dicho tratamiento. Generalmente se considera que el nivel de un autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4 o STK4) en la muestra biológica del sujeto en estudio es “mayor” que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo cuando el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo. De forma similar, se considerará generalmente que el nivel de un autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, ACVR2B) en la muestra biológica del sujeto en estudio es “menor” que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen cuando el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, menor que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo.

En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para dos o más proteínas del grupo que consiste en proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B en el que una de las proteínas es la proteína Pim1 en la muestra del sujeto a analizarse se cuantifica y los niveles obtenidos se comparan con los niveles de referencia de los autoanticuerpos para las correspondientes proteínas. A modo de ilustración, los autoanticuerpos para las proteínas seleccionadas 2, 3, 4, 5 y 6 del grupo que consiste en las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, como se mencionan en la lista mencionada anteriormente de combinaciones de proteínas se pueden cuantificar.

Así, en una realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1 y el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B, preferiblemente, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B se cuantifica y compara con sus niveles de referencia.

En otra realización particular, el nivel de autoanticuerpos para la proteína Pim1, el nivel de autoanticuerpos para la proteína MAPKAPK3 y el nivel de autoanticuerpos para la proteína ACVR2B, y opcionalmente el nivel de autoanticuerpos para la proteína FGFR4 se cuantifican y comparan con su nivel de referencia.



El procedimiento de pronóstico 1 de la invención permite evaluar el pronóstico de un paciente que padece CCR y/o monitorizar el progreso de un paciente que padece CCR, es decir, si el paciente tiene un buen pronóstico y progresará favorablemente o si él tiene un mal pronóstico y progresará desfavorablemente. Dicho procedimiento se puede usar en cualquier fase de CCR. En una realización particular, el sujeto es un paciente que padece CCR en estadios iniciales, tal como en estadios 0, I y II.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), de ahora en adelante "procedimiento de pronóstico 1 de la invención", que comprende comparar el nivel de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de al menos un producto de expresión de un gen, en el que dicho gen está seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, en una muestra de dicho paciente que padece CCR, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen, en el que si el nivel de dicho producto de expresión del gen Pim1 es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si el nivel del producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen, dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

El procedimiento de pronóstico 2 de la invención comprende previamente determinar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de al menos un producto de expresión (por ejemplo, ARN o proteína) de un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, en una muestra biológica del paciente que padece CCR en cuestión. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de tejido de colon o rectal adyacente al tumor, tejido tumoral, sangre, plasma o suero de dicho paciente que padece CCR. El nivel de dicho producto de expresión se puede determinar, dependiendo de su naturaleza (ARN o proteína), como se ha indicado anteriormente en relación con el procedimiento de obtener datos 2 de la invención.

Una vez el nivel de expresión del producto de expresión del producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de uno o más de los productos de expresión de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B se determina en dicha muestra biológica, el procedimiento de diagnóstico 2 de la invención comprende comparar el nivel de dicho producto de expresión (o de dichos productos de expresión) en la muestra del paciente que padece CCR con el nivel de referencia para dicho producto de expresión (o con los niveles de referencia para dichos productos de expresión en cuestión), en el que si el nivel de dicho producto de expresión del gen Pim1 es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si el nivel de producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen, entonces dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

En una realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad del producto de expresión de dicho gen (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en una muestra biológica, preferiblemente del colon, de una población de sujetos control (es decir, quienes no padecen CCR). En otra realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de producto de expresión de dicho gen (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en una muestra biológica, preferentemente de tejido tumoral o de tejido de colon o rectal obtenida, por ejemplo, a partir de un área no cancerosa continua o adyacente al tumor del mismo paciente que padece CCR obtenida anteriormente, por ejemplo, antes de la administración de un tratamiento para CCR, para el propósito de ser capaz de evaluar la efectividad de dicho tratamiento.

Se considerará generalmente que el nivel de un producto de expresión de un gen (por ejemplo, Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B) en la muestra de un sujeto en estudio es "mayor" que el nivel de referencia de dicho producto de expresión cuando la relación entre el nivel del producto de expresión del gen en cuestión determinado en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen. De forma similar, se considerará generalmente que el nivel de un producto de expresión de un gen (por ejemplo, ACVR2B) en la muestra biológica del sujeto en estudio es "menos" que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen cuando el nivel de dicho producto de expresión de dicho gen en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, menor que el nivel de referencia de dicho producto de expresión de dicho gen.

En otra realización particular, los niveles de expresión de productos de expresión de dos o más genes del grupo que consiste en los genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B en los que uno de los genes es el gen Pim1, en la muestra del sujeto a analizarse se cuantifican y los niveles obtenidos se comparan con los niveles de referencia de dichos productos de expresión de los genes en cuestión. A modo de ilustración, los productos de expresión de 2, 3, 4, 5 y 6 genes seleccionados del grupo que consiste en los genes Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B,

tales como, por ejemplo, los siguientes productos de expresión se pueden cuantificar.

En una realización particular, el nivel de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B, preferentemente el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 o el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B se cuantifica y compara con sus niveles de referencia.

En otra realización particular, el nivel de un producto de expresión del gen Pim1, el nivel de un producto de expresión del gen MAPKAPK3 y el nivel de un producto de expresión del gen ACVR2B y opcionalmente el nivel de un producto de expresión del gen FGFR4 se cuantifican y comparan con sus niveles de referencia.

El procedimiento de pronóstico 2 de la invención permite evaluar el pronóstico de un paciente que padece CCR, y/o monitorizar el progreso de dicho paciente que padece CCR, es decir, si él tiene un buen pronóstico y progresará favorablemente o si él tiene un mal pronóstico y progresará desfavorablemente. Dicho procedimiento se puede usar en cualquier fase de CCR. En una realización particular, el sujeto es un paciente que padece CCR en estadios iniciales, tal como en estadios 0, I y II.

#### Procedimientos de diagnóstico de metástasis

Las técnicas de la presente invención son también útiles para analizar la probabilidad de que un paciente que padece CCR desarrolle una metástasis pulmonar o hepática.

Por lo tanto, la descripción describe a un "procedimiento para diagnosticar metástasis pulmonar en un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR)" que comprende comparar el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína en una muestra de dicho paciente, en el que dicho paciente es una proteína seleccionada del grupo de proteínas mencionadas en la tabla 2, con el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, en el que si el nivel de autoanticuerpo para dicha proteína en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, el paciente de CCR presenta metástasis pulmonar.

Tabla 2

Proteínas relacionadas con metástasis pulmonar

PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO
PAK1	Q13153
HOMER2	Q9NSB8
IRAK4	QNWZ3
PRKD2	A0JLT6
AK075484	Q8N2G5
C2ORF13	Q8IWI9
PSCD3	Q75ML1
SH3BGL2	Q9UJC5
CDK2	P24941
DAPK2	Q1RMF4
TRPT1	Q86TN4
PDGFRB	P09619, B5A957, Q5UBV6
NEK1	Q96PY6
SOCS3	O14543
EPHA4	Q53TA0, C9JEM6, C9JIX8, Q584H6, C9JFX5

Bases de datos: UniProtKB/TrEMBL-UniProtKB/Swiss-Prot

El procedimiento de diagnóstico de metástasis pulmonar en un paciente que padece CCR descrito en el presente

- 5 documento comprende determinar previamente el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína seleccionada de entre las proteínas mencionadas en la tabla 2, en una muestra biológica del paciente que padece CCR en cuestión. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero de dicho paciente que padece CCR. El nivel de dichos autoanticuerpos puede determinarse como si se hubiera indicado previamente en relación con el procedimiento de detección de autoanticuerpos de la invención o en relación al procedimiento de obtener datos 1 de la invención pero aplicado sobre las proteínas de la tabla 2 en lugar de sobre las proteínas mencionadas en ello (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B).
- 10 Una vez el nivel de uno o más de los autoanticuerpos para dichas proteínas se determina en dicha muestra biológica, el procedimiento de diagnóstico de metástasis pulmonar en un paciente que padece CCR descrito en el presente documento comprende comparar el nivel de dicho autoanticuerpo (o autoanticuerpos) con el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo (o con los niveles de referencia para los autoanticuerpos en cuestión), en los que si el nivel de autoanticuerpo(s) para dicha(s) proteína(s) en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia para dicho(s) autoanticuerpo(s), el paciente de CCR presenta metástasis pulmonar.
- 15 En una realización particular, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de autoanticuerpos para dichas proteínas mencionadas en la tabla 2 en una muestra, preferiblemente de suero, de sujetos que no presentan CCR. En otra realización particular, dicha muestra es de pacientes que padecen CCR pero que no tienen metástasis. Ello generalmente considerará que el nivel de autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, las proteínas mencionadas en la tabla 2) en la muestra de los pacientes que padecen CCR a analizarse es "mayor" que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo cuando el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo.
- 20 En una realización particular, solo el nivel de anticuerpos para una proteína individual de la tabla 2 en la muestra del paciente que padece CCR a analizarse se cuantifica y se compara con el nivel de referencia de autoanticuerpos para dicha proteína.
- 25 En otra realización particular, el nivel de anticuerpos para dos o más proteínas del grupo que consiste en, las proteínas mencionadas en la tabla 2 en la muestra del paciente que padece CCR a analizarse se cuantifica y los niveles obtenidos se comparan con los niveles de referencia de los autoanticuerpos para las proteínas correspondientes. A modo de ilustración los autoanticuerpos para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 proteínas seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas mostradas en la tabla 2 se pueden cuantificar.
- 30 El procedimiento de diagnóstico de metástasis pulmonar en un paciente que padece CCR descrito en el presente documento permite evaluar si el paciente de CCR presenta metástasis pulmonares.
- 35 La descripción también describe un "procedimiento para diagnosticar metástasis hepáticas en un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR)" que comprende comparar el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína en una muestra de dicho paciente, en la que dicha proteína es una proteína seleccionada del grupo de proteínas mencionadas en la tabla 3, con el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, en el que si el nivel de autoanticuerpo para dicha proteína en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, el paciente de CCR presenta metástasis hepáticas.

Tabla 3

Proteínas relacionadas con metástasis pulmonar

PROTEÍNA	NÚMERO DE ACCESO
PHLDB1	Q96D60, Q96C94, Q86UU1
AKT3	Q56A86
PRKCH	P24723
MAPKAPK3	Q16644
C9ORF43	QBTAL5
EGFR	Q504U8, P00533, A2VCQ7, Q147T7
CAMKV	Q8NCB2 C9JSB2 C9J9B2 C9JNE8
THAP3	Q8WTV1
C15ORF3B	Q7Z6K5

EPB41L5	Q4ZG32 Q9HCM4 Q53RT1 Q53734
PGAM1	P18669
PADI4	Q9UM07 Q6EVJ4 Q6EVJ1 Q6EVJ5 Q6EVJ7 Q6EVJ2 Q6EVJ6
UBE2T	Q9NPD8
C9ORF78	Q9NZ63 Q6GVN4
WDR61	Q9GES3
PRKCB1	P05771 D3DWF5
PRKCD	C9J9P1 C9JZU8
ZAP70	P4303
ABL2	P42684 B5MEB6 DIMPS6
WEE1	P30291
DCAMKL2	Q8N568
TRIM21	P19474 Q5KPV5

5 El procedimiento de diagnóstico de metástasis hepática en un paciente que padece CCR comprende determinar previamente el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína seleccionada de entre las proteínas mencionadas en la tabla 3, en una muestra biológica del paciente que padece CCR en cuestión. En una realización particular, dicha muestra biológica es una muestra de sangre, plasma o suero de dicho paciente que padece CCR. El nivel de dichos autoanticuerpos puede determinarse como si se hubiera indicado previamente en relación con el procedimiento de detección de autoanticuerpos de la invención o en relación al procedimiento de obtener datos 1 de la invención pero aplicado sobre las proteínas de la tabla 2 en lugar de sobre las proteínas mencionadas en ello (Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B).

10 Una vez el nivel de uno o más de los autoanticuerpos para dichas proteínas se determina en dicha muestra biológica, el procedimiento de diagnóstico de metástasis hepática en un paciente que padece CCR descrito en el presente documento comprende comparar el nivel de dicho autoanticuerpo (o autoanticuerpos) con el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo (o con los niveles de referencia para los autoanticuerpos en cuestión), en los que si el nivel de autoanticuerpo(s) para dicha(s) proteína(s) en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia para dicho(s) autoanticuerpo(s), el paciente de CCR presenta metástasis hepática.

15 En una realización particular de la invención, dicho nivel de referencia es el nivel o cantidad de autoanticuerpos para dichas proteínas mencionadas en la tabla 3 en una muestra, preferiblemente de suero, de sujetos que no presentan CCR. En otra realización particular, dicha muestra es de pacientes que padecen CCR pero que no tienen metástasis. Ello generalmente considerará que el nivel de autoanticuerpo para una proteína (por ejemplo, las proteínas mencionadas en la tabla 3) en la muestra de los pacientes que padecen CCR a analizarse es "mayor" que el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo cuando el nivel de dicho autoanticuerpo en la muestra biológica del sujeto es al menos 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más, el nivel de referencia de dicho autoanticuerpo. En una realización particular, solo el nivel de anticuerpos para una proteína individual de las mencionadas en la tabla 3 en la muestra del paciente que padece CCR a analizarse se cuantifica y se compara con el nivel de referencia de autoanticuerpos para dicha proteína.

20 En otra realización particular, el nivel de anticuerpos para dos o más proteínas del grupo que consiste en, las proteínas mencionadas en la tabla 3 en la muestra del paciente que padece CCR a analizarse se cuantifica y los niveles obtenidos se comparan con los niveles de referencia de los autoanticuerpos para las proteínas correspondientes. A modo de ilustración los autoanticuerpos para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22 proteínas seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas mostradas en la tabla 3 se pueden cuantificar.

25 El procedimiento de diagnóstico de metástasis pulmonar en un paciente que padece CCR descrito en el presente documento permite evaluar si el paciente de CCR presenta metástasis pulmonares.

#### Kits y aplicaciones

35 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit, de ahora en adelante "kit de la invención" que comprende

-los elementos necesarios para detectar al menos un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y un autoanticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, o alternativamente

- 5 -los elementos necesarios para detectar un producto de expresión del gen Pim1 y al menos un producto de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B.

En una realización particular, el kit de la invención comprende además los elementos necesarios para comparar la cantidad de autoanticuerpos para al menos una de las proteínas Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B con una cantidad de referencia.

- 10 En otra realización particular, el kit de la invención comprende además los elementos necesarios para detectar y/o comparar la cantidad de autoanticuerpos para una proteína mencionada en la tabla 2 con una cantidad de referencia.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende además los elementos necesarios para detectar y/o comparar la cantidad de autoanticuerpos para una proteína mencionada en la tabla 3 con una cantidad de referencia.

- 15 En otra realización particular, el kit de la invención comprende los elementos necesarios para detectar la cantidad del producto de expresión del gen Pim1 y para detectar la cantidad del producto de expresión de al menos uno de los genes seleccionados de la lista que comprende SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B en una muestra biológica aislada a partir de un sujeto. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit de la invención comprende además los elementos necesarios para comparar la cantidad detectada del producto de expresión del gen Pim1 y para comparar la cantidad detectada del producto de expresión de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B con una cantidad de referencia.

- 20 El kit de la invención comprende además contener todos aquellos reactivos necesarios para detectar la cantidad de autoanticuerpos para la proteína Pim1 y para detectar la cantidad de autoanticuerpos para las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, o para las proteínas mencionadas en las tablas 2 o 3, o del producto de expresión del gen Pim1 y de los genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, por medio de cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos en el presente documento tales como, por ejemplo, pero no limitados a

- 25 a) la proteína Pim1 y las proteínas SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, y/o sus fragmentos o variantes funcionalmente equivalentes;
- b) los anticuerpos capaces de reconocer específicamente las proteínas mencionadas en el párrafo a);
- c) cebadores;
- 30 d) polimerasas;
- e) sondas; o
- f) controles positivos y/o negativos.

- 35 El kit de la invención puede incluir adicionalmente sin ningún tipo de limitación, tampones, agentes para evitar la contaminación, inhibidores de degradación de proteínas, etc. Además, el kit de la invención puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para comenzarla y optimizarla. Preferentemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso del kit de la invención para:

- diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR); o para
- evaluar el pronóstico o rastrear el progreso de un paciente que padece CCR.

#### 40 Ejemplos

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

#### 45 Ejemplo 1

##### **Identificación de autoanticuerpos específicos de cáncer colorrectal (CCR)**

Doce sueros de pacientes con CCR en estadios avanzados y que desarrollaron diferentes tipos de metástasis hepáticas (7 pacientes), de hígado y pulmón (4 pacientes) y de hígado y huesos (1 paciente) y 8 sueros de individuos sanos (es decir, de individuos sin CCR) (sueros control) se sometieron a prueba usando microarrays de proteínas de

alta densidad con el fin de identificar autoanticuerpos específicos de CCR y sus antígenos reactivos respectivos (Tabla 4). Los sueros control se seleccionaron para tener exactamente la misma proporción de mujeres y hombres y la misma edad media de los pacientes con CCR (64,5 años). Los controles sanos y los pacientes con CCR mostraron un patrón de inmunorreactividad diferente.

5

Tabla 4

Información clínica de los pacientes con CCR sometidos a prueba en los microarrays de proteínas

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

<sup>1</sup>Edad en años. <sup>2</sup>H, hombre; M, mujer. <sup>3</sup>Progresión de los pacientes con CCR después de la obtención del suero.

<sup>4</sup>Tiempo en meses de supervivencia después de la obtención del suero. <sup>5</sup>Metástasis asociada al paciente.

5 Después de cuantificar la intensidad de los diferentes puntos (proteínas) con el programa GenePix, los datos se normalizaron usando el procedimiento de los cuantiles y se procesaron utilizando el ProtoArray Prospector Analyser. Los arrays usados como control mostraron un excelente comportamiento, con un bajo nivel de ruido de fondo y reactividad específica.

10 Con el fin de estudiar la habilidad de la firma de autoanticuerpos para discriminar entre los diferentes tipos de metástasis se realizó un clúster no supervisado con los datos procesados utilizando el programa MeV (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, EE.UU.). Las muestras metastásicas se separaron en dos ramificaciones principales que correspondían a los pacientes con metástasis en el hígado y en el hígado y el pulmón y únicamente dos muestras no se clasificaron correctamente. Además, el análisis supervisado con los datos procesados de los pacientes con CCR mostró que los dos tipos de pacientes se podían separar satisfactoriamente.

15 Así, una muestra de AAT con una prevalencia superior al 60% se asoció a los pacientes de CCR con metástasis pulmonar (15 proteínas) (tabla 5) o con metástasis hepática (15 proteínas) (tabla 6).

TABLA 5

Proteínas reactivas a autoanticuerpos asociados a metástasis

Reactividad aumentada en metástasis pulmonares

Nombre	Prevalencia pulmonar	Prevalencia hepática	Valor <i>p</i>	Función
PAK1	86%	13%	0,00216	Movilidad y morfología celular
HOMER2	86%	25%	0,01299	Crecimiento celular
IRAK4	86%	25%	0,01299	Transducción de señal
PRKD2	86%	25%	0,01299	Transducción de señal
AK075484	86%	13%	0,01299	Proteína hipotética
C2orf13	71%	13%	0,01515	Proteína hipotética

PSCD3	71%	13%	0,01515	Transducción de señal
SH3BGRL2	71%	13%	0,01515	No conocida
CDK2	71%	13%	0,01515	Ciclo celular
DAPK2	71%	13%	0,01515	Apoptosis
TRPT1	86%	38%	0,04545	Proteína de unión a ARN
PDGFRB	86%	38%	0,04545	Transducción de señal
NEK1	86%	38%	0,04545	Reparación de ADN
SOCS3	86%	25%	0,04545	Señalización de citocinas
EPHA4	86%	25%	0,04545	Transducción de la señal, angiogénesis

TABLA 6

Proteínas reactivas a autoanticuerpos asociados a metástasis  
Reactividad aumentada en metástasis hacia hígado

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



**Ejemplo 2****Caracterización de los AAT más prevalentes en cáncer colorrectal**

Las proteínas que mostraron capacidad discriminadora entre pacientes normales y tumorales se muestran en la Tabla 7. El análisis se realizó utilizando el programa ProtoArray Prospector Analyser clasificando los datos en función del valor p calculado para cada proteína y la prevalencia de los autoanticuerpos en ambos grupos. El valor p se fijó para ser como máximo 0,04 y la prevalencia mayor de un 50% en la población de pacientes con cáncer colorrectal. En total, 432 proteínas mostraron inmunorreactividad a los autoanticuerpos presentes en el suero. En total, 43 proteínas poseían un valor p significativo menor de 0,04. En cuanto a su clasificación, 25 de ellas presentaban una mayor prevalencia en el suero de pacientes con CCR y 18 una prevalencia menor en pacientes respecto a individuos control. Seis proteínas -MAPKAPK3, Pim1, SRC, STK4, FGFR4 y ACVR2B- se seleccionaron según los datos de intensidad de señal de los *microarrays*.

Dichas proteínas estaban entre las más prevalentes en el suero de pacientes con CCR según el análisis usando el Prospector Analyser y mostraban una prevalencia en CCR entre el 50-70% y menor de un 20% de prevalencia en los sujetos control.

Aunque había variaciones significativas en cuanto a la respuesta individual, MAPKAPK3, Pim1, SRC, STK4 y FGFR4 se reconocieron significativamente por pacientes con CCR. Además, ACVR2B mostró un reconocimiento diferente dado que la reconocían principalmente los sujetos control.

TABLA 7

Proteínas reactivas a autoanticuerpos asociados a CCR\*. Reactividad disminuida en cáncer colorrectal

Reactividad incrementada en cáncer colorrectal

Nombre	Prevalencia Cáncer	Prevalencia Control	Valor p	Función
MAPKAPK3	71,4%	10%	0,0099	Transducción de señal de la proteína Ras
PIM-1	71,4%	20%	0,0099	Proliferación celular
STK4	71,4%	20%	0,0099	Morfogénesis celular
FGFR4	71,4%	20%	0,0099	Ruta de señalización del factor de crecimiento del fibroblasto
TRIM21	71,4%	20%	0,0099	Regulación de la transcripción
SRC	57,1%	10%	0,0102	Transducción de señales de la proteína Ras
AKT1	57,1%	10%	0,0102	Receptores acoplados a proteínas G
KDR	57,1%	10%	0,0102	Angiogénesis
PKN1	57,1%	10%	0,0102	Activación de la actividad JNK
CSNK1G2	92,9%	50%	0,0144	Ruta de señalización del receptor Wnt
DAPK1	92,9%	50%	0,0144	Anti-apoptosis
PBK	78,6%	30%	0,0154	Mitosis
NEK3	85,7%	30%	0,0181	Ciclo celular
PRKCD	85,7%	40%	0,0181	Cascada de señalización intracelular
SALL2	50,0%	10%	0,0238	Regulación de la transcripción, ADN dependiente
GRK7	50,0%	10%	0,0238	Actividad cinasa de receptores acoplados a proteínas G

IRAK4	50,0%	10%	0,0238	Cascada I-kappaB cinasa/NF-kappaB
MAPKAPK5	50,0%	10%	0,0238	Transducción de señales de la proteína Ras
PKN2	50,0%	10%	0,0238	Transducción de señales
ABL2	50,0%	10%	0,0238	Adhesión celular
RPS6KA1	64,3%	10%	0,0249	Transducción de señales
BMX	64,3%	20%	0,0249	Cascada de señalización intracelular
PDGFRB	64,3%	20%	0,0249	Ruta de señalización del receptor del factor de crecimiento de las plaquetas
CDK5/p35	64,3%	20%	0,0249	Ruta muscarínica del receptor de la acetilcolina
RPS6KA2	71,4%	30%	0,0399	Transducción de señales

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

TABLA 7 (continuación). Proteínas reactivas a autoanticuerpos asociados a CCR\*

5

Reactividad incrementada en cáncer colorrectal

RBPJ	60%	7,1%	0,0036	Recombinación de ADN
(continuación)				
ITGA6	80%	28,6%	0,0099	Adhesión celular
ACVR2B*	70%	21,4%	0,0144	Ruta de señalización de BMP
NFYA	50%	7,1%	0,0144	Regulación transcripcional
TLL7	50%	7,1%	0,0144	Diferenciación celular
C9orf43	50%	7,1%	0,0144	No conocida
ZNF706	50%	7,1%	0,0144	No conocida
HDAC1	50%	7,1%	0,0144	Anti-apoptosis
TPM4	50%	7,1%	0,0144	Movilidad celular
TSLP	70%	21,4%	0,0154	Citocina, señalización celular
WBP2	70%	21,4%	0,0154	No conocida
STAU1	60%	14,3%	0,0181	Proteína de unión a ARN
PFDN5	60%	14,3%	0,0181	Plegamiento de proteína
COASY	60%	14,3%	0,0181	Biosíntesis de coenzima A
IGLC1	80%	35,7%	0,0249	Aminoacilación del ARNt para la traducción de proteínas
MFAP2	70%	21,4%	0,0399	Citoesqueleto
BHMT2	70%	21,4%	0,0399	Metiltransferasa
EFNA3	70%	28,6%	0,0399	Señalización celular

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

**Ejemplo 3****Análisis de la expresión diferencial de las proteínas seleccionadas AAT en líneas celulares y tejido tumoral de cáncer colorrectal**

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

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

20 Con el fin de estudiar la correlación entre la respuesta humoral y la abundancia en tejido, se verificó la expresión diferencial de las 6 proteínas a nivel de ARNm y a nivel proteico. Para determinar los niveles de ARNm recurrimos a la base de datos Oncomine (Rhodes et al. 2004. Neoplasia Nueva York, N.Y. 6 (1), 1-6), una página web que incluye una base de datos con los resultados de datos de expresión génica en cáncer utilizando microarrays. Los datos para FGFR4, MAPKAPK3, SRC y STK4 en CCR se muestran en la Figura 1C. Todos ellos mostraron unos niveles de expresión mayores en CCR. No se encontraron datos para Pim1 y ACVR2B en CCR. Para corroborar la expresión diferencial de las proteínas, utilizamos un microarray de tejidos de CCR con anticuerpos específicos de ACVR2B y Pim1, que eran los únicos disponibles comercialmente para esta técnica entre las 6 proteínas estudiadas (Figura 1D).

25 Pim1 mostró una expresión aumentada en las células epiteliales que rodean las criptas de tejido tumoral, siendo la tinción principalmente citoplasmática. Además, tanto los linfocitos como los macrófagos se tiñeron de una forma muy significativa.

30 En cuanto a ACVR2B, la expresión estaba disminuida en pacientes con CCR, mientras que en tejido normal se observaba su expresión normal. En este caso, la tinción de ACVR2B se localizó principalmente en la membrana de las células epiteliales dado que actúa como un receptor de membrana.

La figura 1D muestra el resultado de los análisis inmunohistoquímicos de Pim1 y ACVR2B en tejido de CCR y en mucosas adyacentes normales de 45 pacientes con CCR. Como se puede ver, el nivel de la proteína Pim1 está incrementado en las muestras de CCR mientras que el de ACVR2B está disminuido.

**Ejemplo 4****Confirmación del uso de Pim1, ACVR2B y MAPKAPK3 como biomarcadores en CCR**

40 La técnica de ELISA es ampliamente utilizada en clínica por su simplicidad y sensibilidad. Con el fin de corroborar nuestros resultados anteriores, se realizó un ensayo de ELISA con las proteínas recombinantes Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B expresadas en *E. coli*, ya que podría permitir discriminar fácilmente entre sueros de individuos sanos e individuos con CCR. Como controles se utilizaron CEA comercial y Anexina IV recombinante expresada en células de mamífero. CEA por ser el marcador más usado en el diagnóstico de CCR (Duffy, M. J. 2001 Clinical chemistry 47 (4), 624-630) y Anexina IV por su sobreexpresión en tejido de CCR (Alfonso et al. 2005. Proteomics 5 (10), 2602-2611). Así, en este ensayo directo de ELISA se testaron 94 muestras de suero, 52 sueros de pacientes con CCR y 42 sueros de individuos sanos. Los resultados del ELISA fueron consistentes con los obtenidos en el array de proteínas y en la inmunodetección en membrana; los autoanticuerpos frente a Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B permitían discriminar entre pacientes con CCR y sueros control.

Pim1 mostró una inmunorreactividad significativamente mayor en el suero de pacientes con CCR (media= 0,606, I.C. del 95% = 0,505 a 0,708,  $p < 0,008$ ) que en sujetos control (media = 0,439, I.C. del 95%= 0,369 a 0,510).

50 Para MAPKAPK3 se obtuvieron resultados similares en sueros de pacientes con cáncer (media= 0,929, I.C. del 95%= 0,828 a 1,030,  $p < 0,0001$ ) y controles (media= 0,648, I.C. del 95%= 0,574 a 0,722) (Figura 2).

En el caso de ACVR2B la inmunorreactividad fue superior en el suero de pacientes control (media= 0,863, I.C. del 95%= 0,744 a 0,981,  $p < 0,026$ ) que en el suero de individuos con cáncer de colon (media= 0,668, I.C. del 95%= 0,549 a 0,790), lo que confirmó los resultados anteriores obtenidos con los protoarrays.

En cuanto a la inmunorreactividad de CEA y Anexina IV, no se observaron diferencias significativas entre las muestras

tumorales (CEA: media= 0,787, I.C. del 95%= 0,674 a 0,900,  $p < 0,1$ ); (Anexina IV: media= 0,421, I.C. del 95%= 0,360 a 0,481,  $p < 0,16$ ) y muestras control (CEA: media= 0,665, I.C. del 95%= 0,588 a 0,742; Anexina IV: media= 0,366, I.C. del 95%= 0,318 a 0,414).

5 Posteriormente se investigó la capacidad de esta respuesta humoral como un predictor para detectar CCR. Así se obtuvieron las curvas ROC a partir de la respuesta de los autoanticuerpos frente a las proteínas Pim1, MAPKAPK3 y ACVR2B (Figura 3A). La especificidad y sensibilidad del ensayo para Pim1 fue del 83,3 y 48,1% (usando un cut-off de 0,534), respectivamente y el área debajo de la curva fue  $AUC = 0,651$  (I.C. del 95%= 0,546 a 0,746). En el caso de MAPKAPK3, la especificidad fue 74% y la sensibilidad 72,7% (con un cut-off de 0,762), siendo  $AUC = 0,733$  (I.C. del 95%= 0,632 a 0,819). Para ACVR2B encontramos una especificidad y sensibilidad del 76,2% y 60%, respectivamente, (cut-off = 0,548) y  $AUC = 0,666$  (I.C. del 95% = 0,562 a 0,760). Las proteínas control CEA y Anexina IV dieron menores valores de especificidad y sensibilidad; especificidad de 59,5% y sensibilidad de 63,5% para CEA con un cut-off = 0,61 y  $AUC = 0,61$  (I.C. del 95% = 0,513 a 0,717). La Anexina IV dio un valor de  $AUC = 0,556$  (I.C. del 95%= 0,450 a 0,658) indicando la ausencia de autoanticuerpos específicos para esta proteína (Figura 3C).

15 Finalmente se testó si diferentes combinaciones de estas proteínas mejorarían su capacidad diagnóstica. Los datos se ajustaron a una curva logística, se calcularon las regresiones logísticas y se obtuvieron diferentes modelos incorporando combinaciones de las proteínas (Figura 3B). El modelo inicial incluyó cuatro proteínas: Pim1, MAP-KAPK3, ACVR2B y CEA; sin embargo los test del procedimiento discriminante lineal mostraron que CEA y Pim-1 no tenían relevancia en el modelo. Esto se confirmó comparando el modelo completo con las cuatro proteínas ( $AUC = 0,85$ ) con un modelo que incluía solamente MAPKAPK3 y ACVR2B ( $AUC = 0,86$ ). Mientras que CEA no mejoraba el modelo, Pim1 incluso lo empeoraba ligeramente.

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

25 Adicionalmente, como se puede ver en la figura 5C, no hay correlación entre MAPKAPK3 y la señal de ACVR2B. Asimismo, las figuras 5A y 5B muestran que cuanto más alta se a la señal para ACVRB, más grande es la posibilidad de pertenecer al grupo normal; la situación opuesta se observa para MAPKAPK3.

La figura 6 muestra un análisis de ELISA de muestras de suero usando un ELISA con STK4 y FGFR4 como TAA.

La figura 7C muestra como la combinación de la medida de los autoanticuerpos para MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4 también da como resultado especificidad y sensibilidad óptimas.

30 La figura 8 muestra como la combinación de CEA con una combinación óptima de autoanticuerpos (autoanticuerpos para las proteínas MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4) no mejora la capacidad de predicción para el diagnóstico del CCR, lo que indica que la combinación de los marcadores de la invención es más adecuada para el diagnóstico de CCR en las etapas tempranas que CEA solo.

35 Los autoanticuerpos de las proteínas MAPKAPK3, ACVR2B, Pim1 y FGFR4 dan como resultado mejor diagnóstico de CCR en estadios tempranos (Figura 9). Como se puede ver en los resultados de la Figura 10, la presencia de autoanticuerpos en suero de pacientes con CCR para algunos de los biomarcadores seleccionados en la presente invención (MAPKAPK3, Pim1, SRC, FGFR4 y STK4) fue constante durante todos los estadios, mientras que la concentración de CEA fue mayor en los estadios más tardíos de CCR. Por tanto, el uso de autoanticuerpos para los biomarcadores mencionados anteriormente (MAPKAPK3, Pim1, SRC, FGFR4 y STK4) permite un mejor diagnóstico de CCR no solo en los últimos estadios sino también en los estadios tempranos de CCR.

## 40 **Materiales y procedimientos**

### **Información clínica y obtener los sueros (ejemplos 1,2 y 4)**

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

50 Todos los sueros se procesaron utilizando el mismo protocolo. Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la formación del coágulo y tras su centrifugación a 3.000 g durante 10 minutos a 4°C, los sueros se congelaron y almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **Arrays de Proteínas (ejemplos 1 y 2)**

20 sueros (12 de pacientes con CCR y 8 de individuos sanos) (Tabla I) se incubaron con el ProtoArray™ Human Protein Microarrays v.4.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Este microarray contiene 8000 proteínas humanas fusionadas a GST (glutación-S-transferasa), expresadas en células de insecto Sf9 de *Spodoptera frugiperda* e impresas por duplicado. Brevemente, los arrays se equilibraron a 4°C durante 15 min y se bloquearon con el tampón de bloqueo (seroalbúmina bovina (BSA) al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS)-Tween 20 al 0,1%) durante 1 h a 4°C con agitación suave. Un total de 150 µl de suero diluido 1:50 en tampón de bloqueo se aplicaron sobre la superficie del array. El array se selló con un CoverGlass (Corning) y se incubó durante 90 min a 4°C. Los arrays se lavaron con tampón de incubación (BSA al 1 % en PBS con ditiotreitól (DTT) 0,5 mM, glicerol al 5% y Tritón X-100 al 0,05%) y los autoanticuerpos del suero unidos a las proteínas del array se detectaron utilizando un anticuerpo anti-IgG humana secundario (H+L) marcado con Alexa Fluor 647 (Invitrogen) diluido 1:2.000 en tampón de incubación a 4°C durante 90 min. Los arrays se lavaron con PBS-Tween 20 al 0,1% y se secaron por centrifugación a 1000 rpm durante 1 min. Finalmente, los portaobjetos se escanearon en un ScanArray™ 5000 (Packard BioChip Technologies) usando los láseres de 635 nm y 532 nm. El software de análisis de imagen GenePix Pro 5.1 se utilizó para la cuantificación.

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

#### Anticuerpos, proteínas y líneas celulares (ejemplos 3 y 4)

Los anticuerpos y las proteínas se obtuvieron de diferentes fuentes. CEA se obtuvo de Calbiochem y la seroalbumina humana (HSA) se obtuvo de la compañía Sigma.

El ADNc que codifica Pim1 humana se introdujo en el vector pET28a, lo que permite la fusión 6xHis-Pim1 y se expresó en *Escherichia coli* usando la cepa BL21 (DE3). El ADNc de la ACVR2B humana se introdujo en el vector pDEST 527 que permite la fusión 6xHis-ACVR2B, usando el sistema Gateway y se expresó en bacterias, mientras que la proteína MAPKAPK3 humana se introdujo en el vector de expresión pDEST565, que permite la fusión 6xHis-GST-MAPKAPK3 y se expresó en las mismas condiciones que ACVR2B y Pim1. Las proteínas así expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando una columna quelante HiTrap (GE Healthcare) seguida de un paso de purificación extra mediante una columna de penetrabilidad Superdex 200 (GE Healthcare). El ADNc codificante de la Anexina IV humana se clonó en el vector de expresión pTT3 y se expresó en las células HEK293-EBNA. La proteína recombinante se expresó tras transfectar las células con lipofectamina (Sigma) y se purificó mediante una columna de afinidad de resina quelante de Ni (GE Healthcare). Los anticuerpos frente a MAPKAPK3 y Pim1 utilizados en los ensayos de ELISA se adquirieron de Abnova. Los anticuerpos frente a MAPKAPK3, Pim1 y ACVR2B usados en inmunodetección en membrana y array de tejidos se adquirieron de Abcam. Las líneas celulares de CCR (Rko, Hct116, Hct15, Sw45, Sw480, Colo 205), línea celular de adenocarcinoma pancreático BxPc3 y la línea linfoblastoide Molt4 se cultivaron utilizando protocolos preestablecidos para dichas células. Los neutrófilos y linfocitos usados como controles se aislaron a partir de sangre periférica de un individuo sano. Los fibroblastos murinos embrionarios (MEF) se inmortalizaron infectando un cultivo primario con el virus Epstein-Barr y se cultivaron utilizando protocolos preestablecidos para esta línea celular.

#### ELISA (ejemplo 4)

Un ensayo de ELISA se desarrolló con el fin de testar la habilidad de los autoantígenos purificados para discriminar CCR usando suero de pacientes. Brevemente, se tapizaron 0,3 µg de las proteínas purificadas o HSA como control negativo en placas Microtiter (Maxisorp, Nunc) en PBS durante toda la noche. El día después, las placas se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon con leche desnatada al 3% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente. Tras un lavado adicional, las 94 muestras de suero (dilución 1:50 en leche desnatada al 3% en PBS) se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar, se utilizó un anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (HRP) diluido 1:3, 000 (v:v) para la detección y 3,3',5',5'-tetrametilbencidina (TMB) para el desarrollo de la señal. La reacción se detuvo con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M y la absorción se midió a 450 nm.

#### Inmunodetección en membrana (ejemplo 3)

Los extractos proteicos de tejidos emparejados de 6 pacientes con CCR (12 en total) se prepararon como se ha descrito previamente en (Alfonso P. et al. (2005) Proteomic expression analysis of colorrectal cáncer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomic* 5, 2602-2611). Brevemente, los extractos proteicos se obtuvieron tras lizarlos con dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,1%, Tritón X-100 al 1%, desoxicolato sódico (SDS) al 1%, NaCl 150 mM, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA) 5 mM, Tris-HCl 10 mM (pH 7,2) suplementado con inhibidores de proteasas (Roche). La concentración de proteína se determinó utilizando el kit 2-D Quant (GE Healthcare) tras clarificarlo por centrifugación a 12000g durante 15 min.

Para la inmunodetección en membrana, 50 µg de los extractos proteicos de las 6 líneas celulares de cáncer de colon, las 5 líneas celulares de referencia y los tejidos emparejados se corrieron en paralelo en un gel SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra) según protocolos estándar. Después del bloqueo, las membranas se incubaron con las diluciones óptimas de anticuerpos mono o policlonales frente a los antígenos

seleccionados: Pim1 (dilución 1:100), MAPKAPK3 (dilución 1:500) y ACVR2B (dilución 1:200). Como anticuerpos secundarios se utilizó un anti-IgG de cabra (DakoCytomation) a una dilución 1:5.000 para ACVR2B y 1:20.000 para Pim1 y MAPKAPK3 o bien un anti-IgG de pollo (Jackson ImmunoResearch Laboratory) conjugado a HRP. La señal se detectó mediante ECL (GE Healthcare).

**5 Inmunohistoquímica (ejemplo 3)**

Los microarrays de tejido (TMA) específicos de CCR con 45 muestras tumorales diferentes se prepararon como se ha descrito previamente (Madoz-Gurpide et al. 2007. Mol Cell Proteomics 6 (12), 2150-2164). Las secciones se cortaron a una anchura máxima de 3 µm y se secaron a 56°C durante 16 h antes de desparafinar en xileno y rehidratar en agua tras pasos anteriores en diferentes porcentajes de etanol. La exposición y recuperación de epítomos se realizó en tampón citrato sódico 0,01 M calentado durante 2 min en una olla a presión. Después del paso de calentamiento, los portaobjetos se lavaron con agua durante 5 min y nuevamente en tampón Tris salino (TBS) a pH 7,4. Los TMA se incubaron con un anticuerpo monoclonal frente a Pim1 (Abcam) y un anticuerpo policlonal frente a ACVR2B (Abcam). La unión específica se detectó mediante anti-IgG de cabra conjugado a biotina. La visualización de interacciones específicas se realizó con el sistema EnVisionHRP (DakoCytomation).

**15 Análisis estadístico (ejemplo 1, 2 y 4)**

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

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

**Lista de secuencias**

- <110> CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLOGICAS
- CONSEJO SUPERIOR DE INVESTÁGACIONES CIENTIFICAS (CSIC)
- <120> Procedimientos para el diagnóstico o pronóstico de cáncer colorrectal
- <130> P5754PC00
- <150> ESP200930203
- <151> 25-05-2009
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 313
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 551 713 T3

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

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

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

Phe Gly Ser Val Tyr Ser Gly Ile Arg Val Ser Asp Asn Leu Pro Val  
 50 55 60

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

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

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

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

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

ES 2 551 713 T3

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

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

Leu Asn Arg Gly Glu Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Ser Gly Ala Leu  
180 185 190

Leu Lys Asp Thr Val Tyr Thr Asp Phe Asp Gly Thr Arg Val Tyr Ser  
195 200 205

Pro Pro Glu Trp Ile Arg Tyr His Arg Tyr His Gly Arg Ser Ala Ala  
210 215 220

Val Trp Ser Leu Gly Ile Leu Leu Tyr Asp Met Val Cys Gly Asp Ile  
225 230 235 240

Pro Phe Glu His Asp Glu Glu Ile Ile Arg Gly Gln Val Phe Phe Arg  
245 250 255

Gln Arg Val Ser Ser Glu Cys Gln His Leu Ile Arg Trp Cys Leu Ala  
260 265 270

Leu Arg Pro Ser Asp Arg Pro Thr Phe Glu Glu Ile Gln Asn His Pro  
275 280 285

Trp Met Gln Asp Val Leu Leu Pro Gln Glu Thr Ala Glu Ile His Leu  
290 295 300

His Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ser Lys  
305 310

<210>2

<211> 536

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2



ES 2 551 713 T3

Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg  
1 5 10 15

Ser Leu Glu Pro Ala Glu Asn Val His Gly Ala Gly Gly Gly Ala Phe  
20 25 30

ES 2 551 713 T3

Pro Ala Ser Gln Thr Pro Ser Lys Pro Ala Ser Ala Asp Gly His Arg  
35 40 45

Gly Pro Ser Ala Ala Phe Ala Pro Ala Ala Ala Glu Pro Lys Leu Phe  
50 55 60

Gly Gly Phe Asn Ser Ser Asp Thr Val Thr Ser Pro Gln Arg Ala Gly  
65 70 75 80

Pro Leu Ala Gly Gly Val Thr Thr Phe Val Ala Leu Tyr Asp Tyr Glu  
85 90 95

Ser Arg Thr Glu Thr Asp Leu Ser Phe Lys Lys Gly Glu Arg Leu Gln  
100 105 110

Ile Val Asn Asn Thr Glu Gly Asp Trp Trp Leu Ala His Ser Leu Ser  
115 120 125

Thr Gly Gln Thr Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Ala Pro Ser Asp  
130 135 140

Ser Ile Gln Ala Glu Glu Trp Tyr Phe Gly Lys Ile Thr Arg Arg Glu  
145 150 155 160

Ser Glu Arg Leu Leu Leu Asn Ala Glu Asn Pro Arg Gly Thr Phe Leu  
165 170 175

Val Arg Glu Ser Glu Thr Thr Lys Gly Ala Tyr Cys Leu Ser Val Ser  
180 185 190

Asp Phe Asp Asn Ala Lys Gly Leu Asn Val Lys His Tyr Lys Ile Arg  
195 200 205

Lys Leu Asp Ser Gly Gly Phe Tyr Ile Thr Ser Arg Thr Gln Phe Asn  
210 215 220

Ser Leu Gln Gln Leu Val Ala Tyr Tyr Ser Lys His Ala Asp Gly Leu  
225 230 235 240

Cys His Arg Leu Thr Thr Val Cys Pro Thr Ser Lys Pro Gln Thr Gln  
245 250 255

Gly Leu Ala Lys Asp Ala Trp Glu Ile Pro Arg Glu Ser Leu Arg Leu  
260 265 270

ES 2 551 713 T3

Glu Val Lys Leu Gly Gln Gly Cys Phe Gly Glu Val Trp Met Gly Thr  
 275 280 285  
 Trp Asn Gly Thr Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Pro Gly Thr  
 290 295 300  
 Met Ser Pro Glu Ala Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Met Lys Lys Leu  
 305 310 315 320  
 Arg His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Ala Val Val Ser Glu Glu Pro  
 325 330 335  
 Ile Tyr Ile Val Thr Glu Tyr Met Ser Lys Gly Ser Leu Leu Asp Phe  
 340 345 350  
 Leu Lys Gly Glu Thr Gly Lys Tyr Leu Arg Leu Pro Gln Leu Val Asp  
 355 360 365  
 Met Ala Ala Gln Ile Ala Ser Gly Met Ala Tyr Val Glu Arg Met Asn  
 370 375 380  
 Tyr Val His Arg Asp Leu Arg Ala Ala Asn Ile Leu Val Gly Glu Asn  
 385 390 395 400  
 Leu Val Cys Lys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Leu Ile Glu Asp  
 405 410 415  
 Asn Glu Tyr Thr Ala Arg Gln Gly Ala Lys Phe Pro Ile Lys Trp Thr  
 420 425 430  
 Ala Pro Glu Ala Ala Leu Tyr Gly Arg Phe Thr Ile Lys Ser Asp Val  
 435 440 445  
 Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Thr Glu Leu Thr Thr Lys Gly Arg Val  
 450 455 460  
 Pro Tyr Pro Gly Met Val Asn Arg Glu Val Leu Asp Gln Val Glu Arg  
 465 470 475 480  
 Gly Tyr Arg Met Pro Cys Pro Pro Glu Cys Pro Glu Ser Leu His Asp  
 485 490 495  
 Leu Met Cys Gln Cys Trp Arg Lys Glu Pro Glu Glu Arg Pro Thr Phe  
 500 505 510

ES 2 551 713 T3

Glu Tyr Leu Gln Ala Phe Leu Glu Asp Tyr Phe Thr Ser Thr Glu Pro  
515 520 525

Gln Tyr Gln Pro Gly Glu Asn Leu  
530 535

<210>3

<211> 382

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 551 713 T3

Met Asp Gly Glu Thr Ala Glu Glu Gln Gly Gly Pro Val Pro Pro Pro  
 1 5 10 15

Val Ala Pro Gly Gly Pro Gly Leu Gly Gly Ala Pro Gly Gly Arg Arg  
 20 25 30

Glu Pro Lys Lys Tyr Ala Val Thr Asp Asp Tyr Gln Leu Ser Lys Gln  
 35 40 45

Val Leu Gly Leu Gly Val Asn Gly Lys Val Leu Glu Cys Phe His Arg  
 50 55 60

Arg Thr Gly Gln Lys Cys Ala Leu Lys Leu Leu Tyr Asp Ser Pro Lys  
 65 70 75 80

Ala Arg Gln Glu Val Asp His His Trp Gln Ala Ser Gly Gly Pro His  
 85 90 95

Ile Val Cys Ile Leu Asp Val Tyr Glu Asn Met His His Gly Lys Arg  
 100 105 110

Cys Leu Leu Ile Ile Met Glu Cys Met Glu Gly Gly Glu Leu Phe Ser  
 115 120 125

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

Glu Ile Met Arg Asp Ile Gly Thr Ala Ile Gln Phe Leu His Ser His  
 145 150 155 160

Asn Ile Ala His Arg Asp Val Lys Pro Glu Asn Leu Leu Tyr Thr Ser  
 165 170 175

ES 2 551 713 T3

Lys Glu Lys Asp Ala Val Leu Lys Leu Thr Asp Phe Gly Phe Ala Lys  
 180 185 190

Glu Thr Thr Gln Asn Ala Leu Gln Thr Pro Cys Tyr Thr Pro Tyr Tyr  
 195 200 205

Val Ala Pro Glu Val Leu Gly Pro Glu Lys Tyr Asp Lys Ser Cys Asp  
 210 215 220

Met Trp Ser Leu Gly Val Ile Met Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Phe Pro  
 225 230 235 240

Pro Phe Tyr Ser Asn Thr Gly Gln Ala Ile Ser Pro Gly Met Lys Arg  
 245 250 255

Arg Ile Arg Leu Gly Gln Tyr Gly Phe Pro Asn Pro Glu Trp Ser Glu  
 260 265 270

Val Ser Glu Asp Ala Lys Gln Leu Ile Arg Leu Leu Leu Lys Thr Asp  
 275 280 285

Pro Thr Glu Arg Leu Thr Ile Thr Gln Phe Met Asn His Pro Trp Ile  
 290 295 300

Asn Gln Ser Met Val Val Pro Gln Thr Pro Leu His Thr Ala Arg Val  
 305 310 315 320

Leu Gln Glu Asp Lys Asp His Trp Asp Glu Val Lys Glu Glu Met Thr  
 325 330 335

Ser Ala Leu Ala Thr Met Arg Val Asp Tyr Asp Gln Val Lys Ile Lys  
 340 345 350

Asp Leu Lys Thr Ser Asn Asn Arg Leu Leu Asn Lys Arg Arg Lys Lys  
 355 360 365

Gln Ala Gly Ser Ser Ser Ala Ser Gln Gly Cys Asn Asn Gln  
 370 375 380

<210>4

<211> 802

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 551 713 T3

Met Arg Leu Leu Leu Ala Leu Leu Gly Val Leu Leu Ser Val Pro Gly  
 1 5 10 15

Pro Pro Val Leu Ser Leu Glu Ala Ser Glu Glu Val Glu Leu Glu Pro  
 20 25 30

Cys Leu Ala Pro Ser Leu Glu Gln Gln Glu Gln Glu Leu Thr Val Ala  
 35 40 45

Leu Gly Gln Pro Val Arg Leu Cys Cys Gly Arg Ala Glu Arg Gly Gly  
 50 55 60

His Trp Tyr Lys Glu Gly Ser Arg Leu Ala Pro Ala Gly Arg Val Arg  
 65 70 75 80

Gly Trp Arg Gly Arg Leu Glu Ile Ala Ser Phe Leu Pro Glu Asp Ala  
 85 90 95

Gly Arg Tyr Leu Cys Leu Ala Arg Gly Ser Met Ile Val Leu Gln Asn  
 100 105 110

Leu Thr Leu Ile Thr Gly Asp Ser Leu Thr Ser Ser Asn Asp Asp Glu  
 115 120 125

Asp Pro Lys Ser His Arg Asp Pro Ser Asn Arg His Ser Tyr Pro Gln  
 130 135 140

Gln Ala Pro Tyr Trp Thr His Pro Gln Arg Met Glu Lys Lys Leu His  
 145 150 155 160

Ala Val Pro Ala Gly Asn Thr Val Lys Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly  
 165 170 175

Asn Pro Thr Pro Thr Ile Arg Trp Leu Lys Asp Gly Gln Ala Phe His  
 180 185 190

Gly Glu Asn Arg Ile Gly Gly Ile Arg Leu Arg His Gln His Trp Ser  
 195 200 205

Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Thr Tyr Thr Cys  
 210 215 220

ES 2 551 713 T3

Leu Val Glu Asn Ala Val Gly Ser Ile Arg Tyr Asn Tyr Leu Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro  
 245 250 255  
 Ala Asn Thr Thr Ala Val Val Gly Ser Asp Val Glu Leu Leu Cys Lys  
 260 265 270  
 Val Tyr Ser Asp Ala Gln Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Ile Val  
 275 280 285  
 Ile Asn Gly Ser Ser Phe Gly Ala Asp Gly Phe Pro Tyr Val Gln Val  
 290 295 300  
 Leu Lys Thr Ala Asp Ile Asn Ser Ser Glu Val Glu Val Leu Tyr Leu  
 305 310 315 320  
 Arg Asn Val Ser Ala Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala Gly  
 325 330 335  
 Asn Ser Ile Gly Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Trp Leu Thr Val Leu Pro  
 340 345 350  
 Glu Glu Asp Pro Thr Trp Thr Ala Ala Ala Pro Glu Ala Arg Tyr Thr  
 355 360 365  
 Asp Ile Ile Leu Tyr Ala Ser Gly Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu  
 370 375 380  
 Leu Leu Ala Gly Leu Tyr Arg Gly Gln Ala Leu His Gly Arg His Pro  
 385 390 395 400  
 Arg Pro Pro Ala Thr Val Gln Lys Leu Ser Arg Phe Pro Leu Ala Arg  
 405 410 415  
 Gln Phe Ser Leu Glu Ser Gly Ser Ser Gly Lys Ser Ser Ser Ser Leu  
 420 425 430  
 Val Arg Gly Val Arg Leu Ser Ser Ser Gly Pro Ala Leu Leu Ala Gly  
 435 440 445  
 Leu Val Ser Leu Asp Leu Pro Leu Asp Pro Leu Trp Glu Phe Pro Arg  
 450 455 460



ES 2 551 713 T3

Asp Arg Leu Val Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln  
 465 470 475 480  
 Val Val Arg Ala Glu Ala Phe Gly Met Asp Pro Ala Arg Pro Asp Gln  
 485 490 495  
 Ala Ser Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asn Ala Ser Asp Lys  
 500 505 510  
 Asp Leu Ala Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Val Met Lys Leu Ile Gly  
 515 520 525  
 Arg His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Val Cys Thr Gln Glu Gly  
 530 535 540  
 Pro Leu Tyr Val Ile Val Glu Cys Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu  
 545 550 555 560  
 Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Pro Asp Leu Ser Pro Asp Gly  
 565 570 575  
 Pro Arg Ser Ser Glu Gly Pro Leu Ser Phe Pro Val Leu Val Ser Cys  
 580 585 590  
 Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Gln Tyr Leu Glu Ser Arg Lys Cys  
 595 600 605  
 Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn  
 610 615 620  
 Val Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Gly Val His His Ile  
 625 630 635 640  
 Asp Tyr Tyr Lys Lys Thr Ser Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met  
 645 650 655  
 Ala Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Gln Ser Asp Val  
 660 665 670  
 Trp Ser Phe Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser  
 675 680 685  
 Pro Tyr Pro Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Ser Leu Leu Arg Glu  
 690 695 700

ES 2 551 713 T3

Gly His Arg Met Asp Arg Pro Pro His Cys Pro Pro Glu Leu Tyr Gly  
705 710 715 720

Leu Met Arg Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Gln Arg Pro Thr Phe  
725 730 735

Lys Gln Leu Val Glu Ala Leu Asp Lys Val Leu Leu Ala Val Ser Glu  
740 745 750

Glu Tyr Leu Asp Leu Arg Leu Thr Phe Gly Pro Tyr Ser Pro Ser Gly  
755 760 765

Gly Asp Ala Ser Ser Thr Cys Ser Ser Ser Asp Ser Val Phe Ser His  
770 775 780

Asp Pro Leu Pro Leu Gly Ser Ser Ser Phe Pro Phe Gly Ser Gly Val  
785 790 795 800

Gln Thr

<210>5

<211> 487

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 551 713 T3

Met Glu Thr Val Gln Leu Arg Asn Pro Pro Arg Arg Gln Leu Lys Lys  
 1 5 10 15

Leu Asp Glu Asp Ser Leu Thr Lys Gln Pro Glu Glu Val Phe Asp Val  
 20 25 30

Leu Glu Lys Leu Gly Glu Gly Ser Tyr Gly Ser Val Tyr Lys Ala Ile  
 35 40 45

His Lys Glu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ile Lys Gln Val Pro Val Glu  
 50 55 60

Ser Asp Leu Gln Glu Ile Ile Lys Glu Ile Ser Ile Met Gln Gln Cys  
 65 70 75 80

Asp Ser Pro His Val Val Lys Tyr Tyr Gly Ser Tyr Phe Lys Asn Thr  
 85 90 95

ES 2 551 713 T3

Asp Leu Trp Ile Val Met Glu Tyr Cys Gly Ala Gly Ser Val Ser Asp  
 100 105 110  
 Ile Ile Arg Leu Arg Asn Lys Thr Leu Thr Glu Asp Glu Ile Ala Thr  
 115 120 125  
 Ile Leu Gln Ser Thr Leu Lys Gly Leu Glu Tyr Leu His Phe Met Arg  
 130 135 140  
 Lys Ile His Arg Asp Ile Lys Ala Gly Asn Ile Leu Leu Asn Thr Glu  
 145 150 155 160  
 Gly His Ala Lys Leu Ala Asp Phe Gly Val Ala Gly Gln Leu Thr Asp  
 165 170 175  
 Thr Met Ala Lys Arg Asn Thr Val Ile Gly Thr Pro Phe Trp Met Ala  
 180 185 190  
 Pro Glu Val Ile Gln Glu Ile Gly Tyr Asn Cys Val Ala Asp Ile Trp  
 195 200 205  
 Ser Leu Gly Ile Thr Ala Ile Glu Met Ala Glu Gly Lys Pro Pro Tyr  
 210 215 220  
 Ala Asp Ile His Pro Met Arg Ala Ile Phe Met Ile Pro Thr Asn Pro  
 225 230 235 240  
 Pro Pro Thr Phe Arg Lys Pro Glu Leu Trp Ser Asp Asn Phe Thr Asp  
 245 250 255  
 Phe Val Lys Gln Cys Leu Val Lys Ser Pro Glu Gln Arg Ala Thr Ala  
 260 265 270  
 Thr Gln Leu Leu Gln His Pro Phe Val Arg Ser Ala Lys Gly Val Ser  
 275 280 285  
 Ile Leu Arg Asp Leu Ile Asn Glu Ala Met Asp Val Lys Leu Lys Arg  
 290 295 300  
 Gln Glu Ser Gln Gln Arg Glu Val Asp Gln Asp Asp Glu Glu Asn Ser  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Asp Glu Met Asp Ser Gly Thr Met Val Arg Ala Val Gly Asp  
 325 330 335

ES 2 551 713 T3

Glu Met Gly Thr Val Arg Val Ala Ser Thr Met Thr Asp Gly Ala Asn  
 340 345 350

Thr Met Ile Glu His Asp Asp Thr Leu Pro Ser Gln Leu Gly Thr Met  
 355 360 365

Val Ile Asn Ala Glu Asp Glu Glu Glu Glu Gly Thr Met Lys Arg Arg  
 370 375 380

Asp Glu Thr Met Gln Pro Ala Lys Pro Ser Phe Leu Glu Tyr Phe Glu  
 385 390 395 400

Gln Lys Glu Lys Glu Asn Gln Ile Asn Ser Phe Gly Lys Ser Val Pro  
 405 410 415

Gly Pro Leu Lys Asn Ser Ser Asp Trp Lys Ile Pro Gln Asp Gly Asp  
 420 425 430

Tyr Glu Phe Leu Lys Ser Trp Thr Val Glu Asp Leu Gln Lys Arg Leu  
 435 440 445

Leu Ala Leu Asp Pro Met Met Glu Gln Glu Ile Glu Glu Ile Arg Gln  
 450 455 460

Lys Tyr Gln Ser Lys Arg Gln Pro Ile Leu Asp Ala Ile Glu Ala Lys  
 465 470 475 480

Lys Arg Arg Gln Gln Asn Phe  
 485

<210>6

<211> 512

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 551 713 T3

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys  
1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr  
20 25 30

Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg  
35 40 45

ES 2 551 713 T3

Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg  
 50 55 60  
 Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn  
 85 90 95  
 Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg  
 100 105 110  
 Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro  
 115 120 125  
 Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu  
 130 135 140  
 Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr  
 145 150 155 160  
 Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val Asp Ile His Glu Asp Pro  
 165 170 175  
 Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu Lys Pro Leu Gln Leu  
 180 185 190  
 Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val Trp Lys Ala Gln  
 195 200 205  
 Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu Gln Asp Lys  
 210 215 220  
 Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly Met Lys  
 225 230 235 240  
 His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser Asn  
 245 250 255  
 Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser  
 260 265 270

ES 2 551 713 T3

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

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

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

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

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

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

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

Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys  
 385 390 395 400

Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu  
 405 410 415

Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu Glu Leu Gln Glu Val Val Val  
 420 425 430

His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp His Trp Leu Lys His Pro  
 435 440 445

Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu Cys Trp Asp His Asp  
 450 455 460

Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu Arg Val Ser Leu  
 465 470 475 480

Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu Val Ser Leu  
 485 490 495

Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser Ser Ile  
 500 505 510



## REIVINDICACIONES

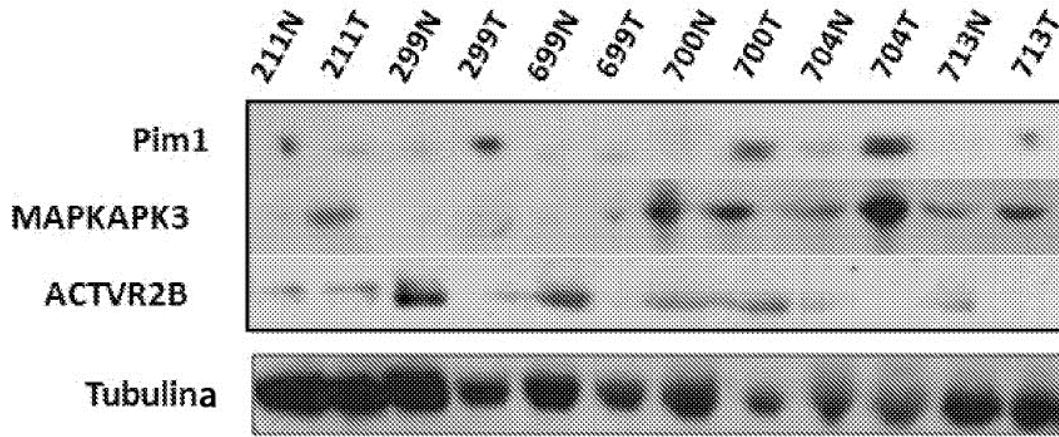
1. Un procedimiento para diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR) que comprende comparar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica de dicho sujeto, con el nivel de referencia para dichos autoanticuerpos, en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho autoanticuerpo, y en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos autoanticuerpos, y/o si el nivel de autoanticuerpo para ACVR2B en dicha muestra es menos que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, entonces dicho sujeto se diagnostica con CCR.
2. Un procedimiento para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y el nivel de al menos un autoanticuerpo para una proteína, en el que dicho autoanticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4, un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, en una muestra biológica de dicho paciente que padece CCR, con el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína Pim1 en dicha muestra es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, y en el que si el nivel de dicho autoanticuerpo para la proteína SRC, o de dicho autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, o de dicho autoanticuerpo para la proteína FGFR4, o de dicho autoanticuerpo para la proteína STK4, en dicha muestra es mayor que el correspondiente nivel de referencia para dichos autoanticuerpos, y/o si el nivel del autoanticuerpo para ACVR2B en dicha muestra es menos que el nivel de referencia para dicho autoanticuerpo, entonces dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.
3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende determinar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1, y el nivel de un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3 o el nivel de un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende determinar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína Pim1, el nivel de un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3 y el nivel de un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B.
5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además determinar el nivel de un autoanticuerpo para la proteína FGFR4.
6. Un procedimiento de obtener datos en una muestra de un sujeto que comprende detectar el producto de expresión del gen Pim1 y el producto de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, y, si se desea, cuantificar el nivel de expresión de dicho producto de expresión de dichos genes en dicha muestra, en el que dicha muestra comprende células tumorales de cáncer colorrectal (CCR).
7. Un procedimiento para diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR) que comprende comparar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *Pim1* y el nivel de expresión de al menos un producto de expresión de un gen, en el que dicho gen está seleccionado del grupo que consiste en genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 y ACVR2B, en una muestra de dicho sujeto, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dichos genes, en el que si el nivel de dicho producto de expresión del gen *Pim1* es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si el nivel de producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dicho gen, dicho sujeto se diagnostica con CCR.
8. Un procedimiento para evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece cáncer colorrectal (CCR), que comprende comparar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen Pim1 y el nivel de expresión de un producto de expresión de un gen, en el que dicho gen está seleccionado del grupo que consiste en genes SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, en una muestra de dicho paciente que padece CCR, con el nivel de referencia para dicho producto de expresión de dichos genes, en el que si el nivel de dicho producto de expresión del gen *Pim1* es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de dicho gen y el nivel de dicho producto de expresión del gen SRC, o de dicho producto de expresión del gen MAPKAPK3, o de dicho producto de expresión del gen FGFR4, o de dicho producto de expresión del gen STK4, es mayor que el nivel de referencia correspondiente para dichos productos de expresión de dichos genes y/o si el nivel del producto de expresión del gen ACVR2B es menos que el nivel de referencia correspondiente para dicho producto de expresión de

dicho gen, dicho paciente padece un CCR con un mal pronóstico o presenta un CCR con un progreso desfavorable.

9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende determinar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *Pim1* y el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *MAPKAPK3* o el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *ACVR2B*.
- 5 10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende determinar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *Pim1*, el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *MAPKAPK3* y el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *ACVR2B*.
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende además determinar el nivel de expresión de un producto de expresión del gen *FGFR4*.
- 10 12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho producto de expresión del gen *Pim1*, *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* o *ACVR2B* es la proteína Pim1, SRC, MAPKAPK3, FGFR4, STK4 o ACVR2B, respectivamente, o un fragmento de la misma.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el nivel de dicha proteína se determina por medio de un inmunoensayo.
- 15 14. Un kit que comprende:
  - los elementos necesarios para detectar al menos un autoanticuerpo para la proteína Pim1 y un autoanticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un autoanticuerpo para la proteína SRC, un autoanticuerpo para la proteína MAPKAPK3, un autoanticuerpo para la proteína FGFR4, un autoanticuerpo para la proteína STK4 y un autoanticuerpo para la proteína ACVR2B, o alternativamente
- 20 -los elementos necesarios para detectar un producto de expresión del gen *Pim1* y al menos un producto de expresión de un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *SRC*, *MAPKAPK3*, *FGFR4*, *STK4* y *ACVR2B*.
15. Uso de un kit de acuerdo con la reivindicación 14 para:
  - diagnosticar si un sujeto padece cáncer colorrectal (CCR); o para
  - evaluar el pronóstico o monitorizar el progreso de un paciente que padece CCR.

**A**

Extractos de tejidos normales y tumorales emparejados



**B**

Extractos de líneas celulares

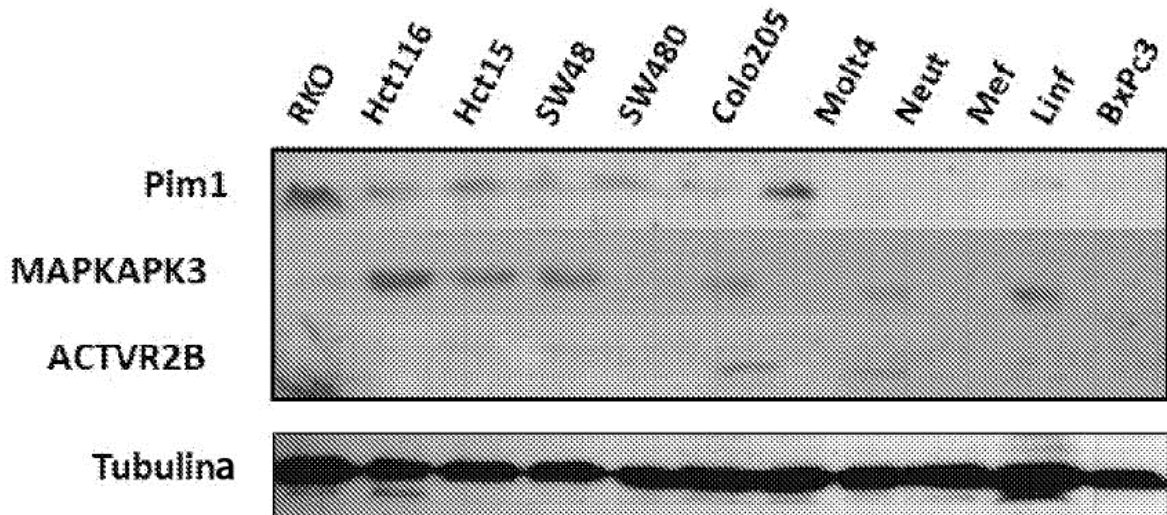


Fig. 1

C

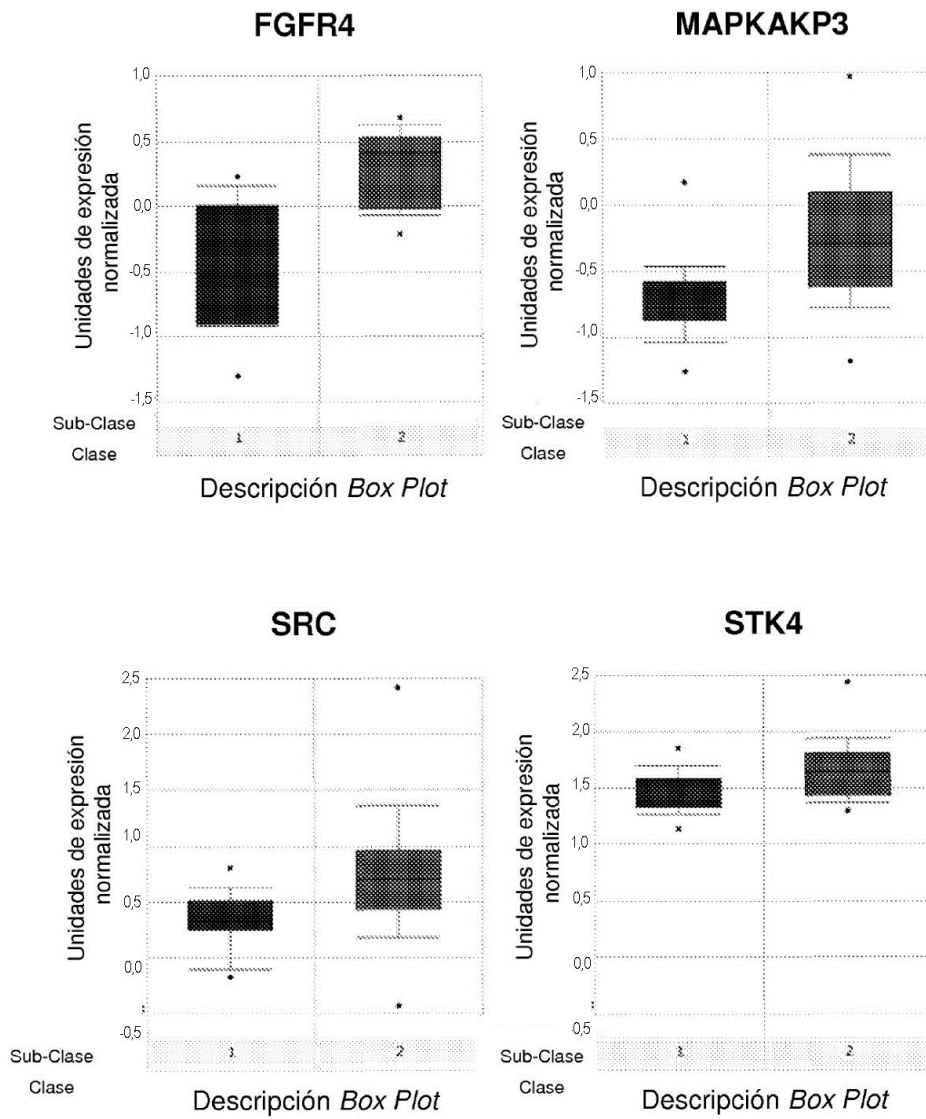


Fig. 1 (cont.)

D

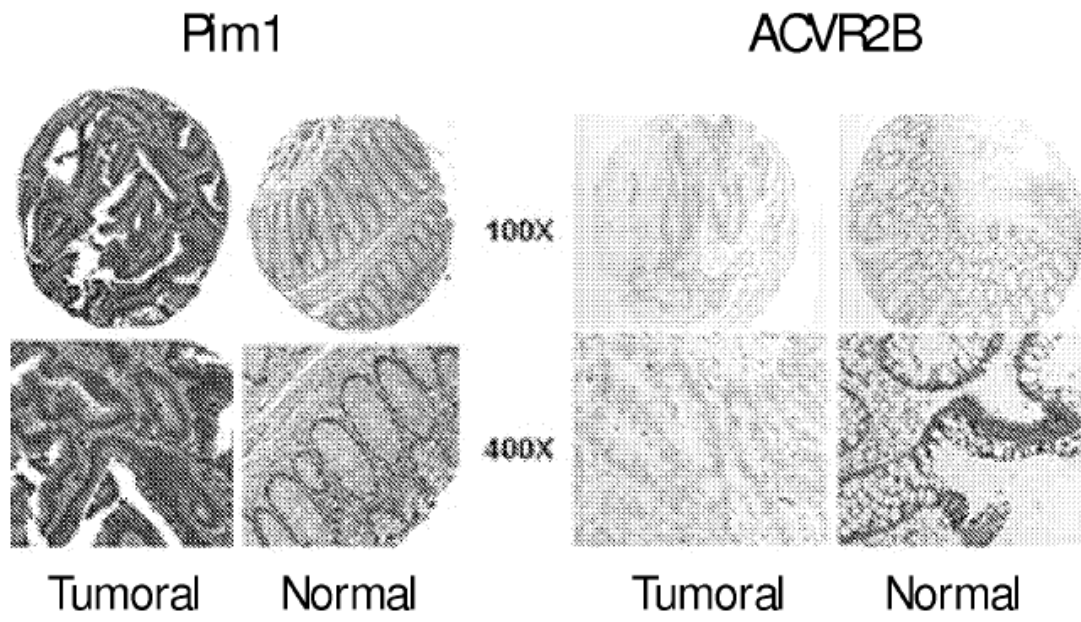
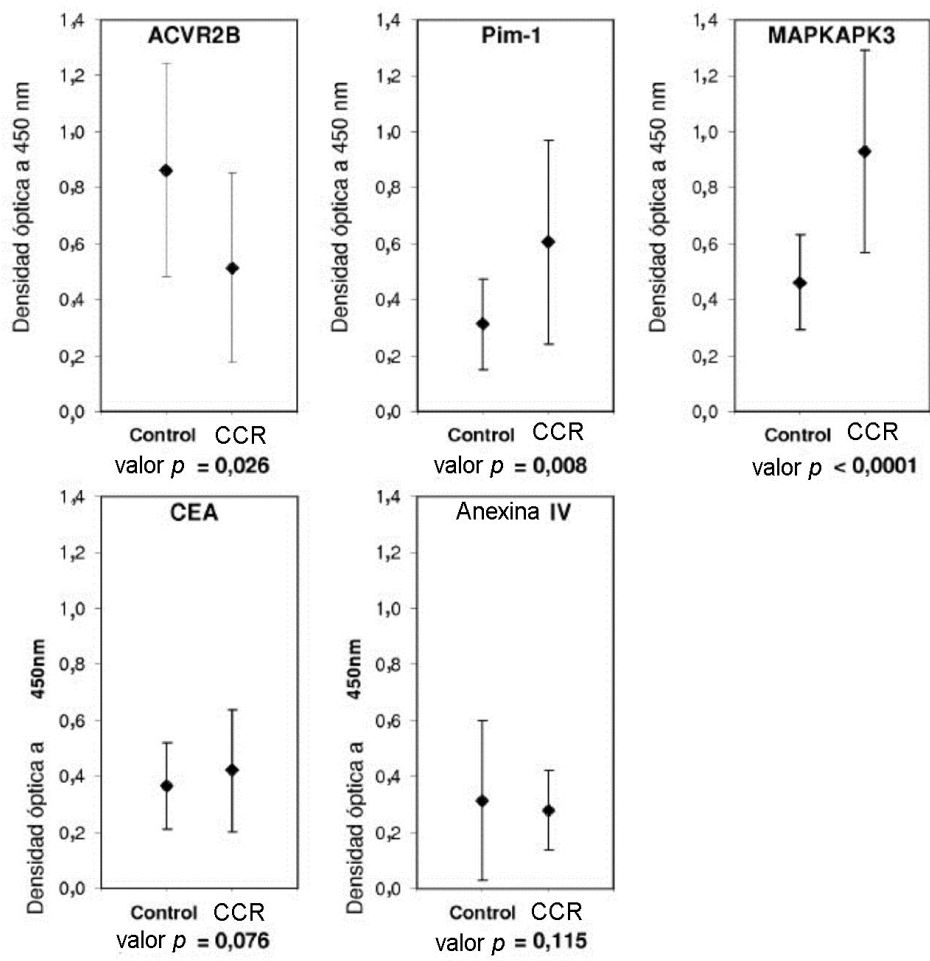
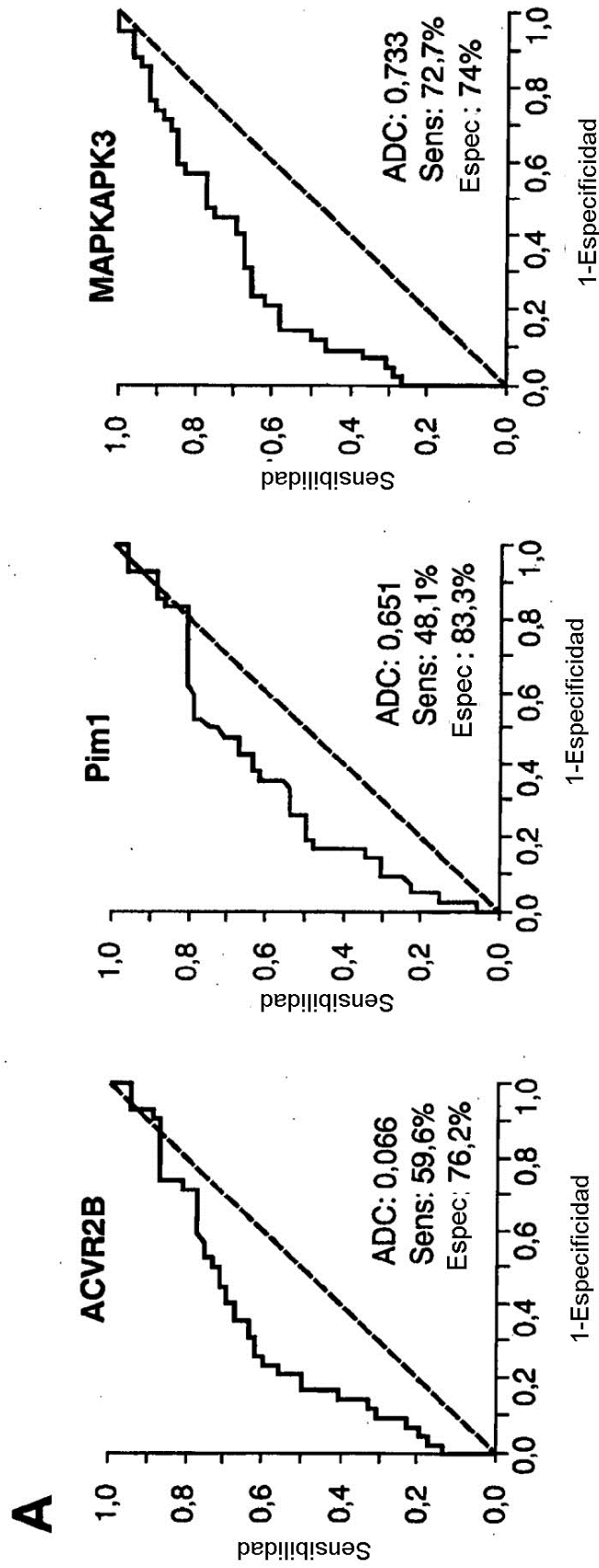


Fig. 1 (cont.)



**Fig. 2**



**Fig. 3**

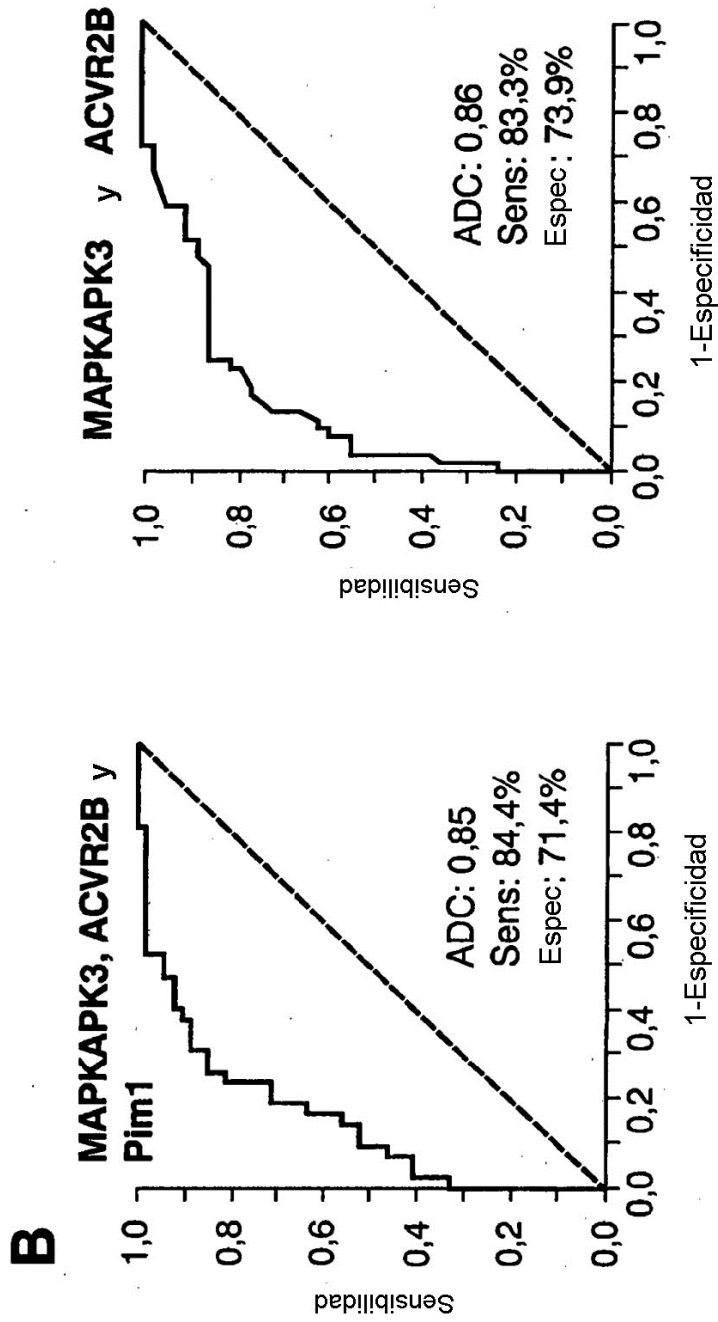
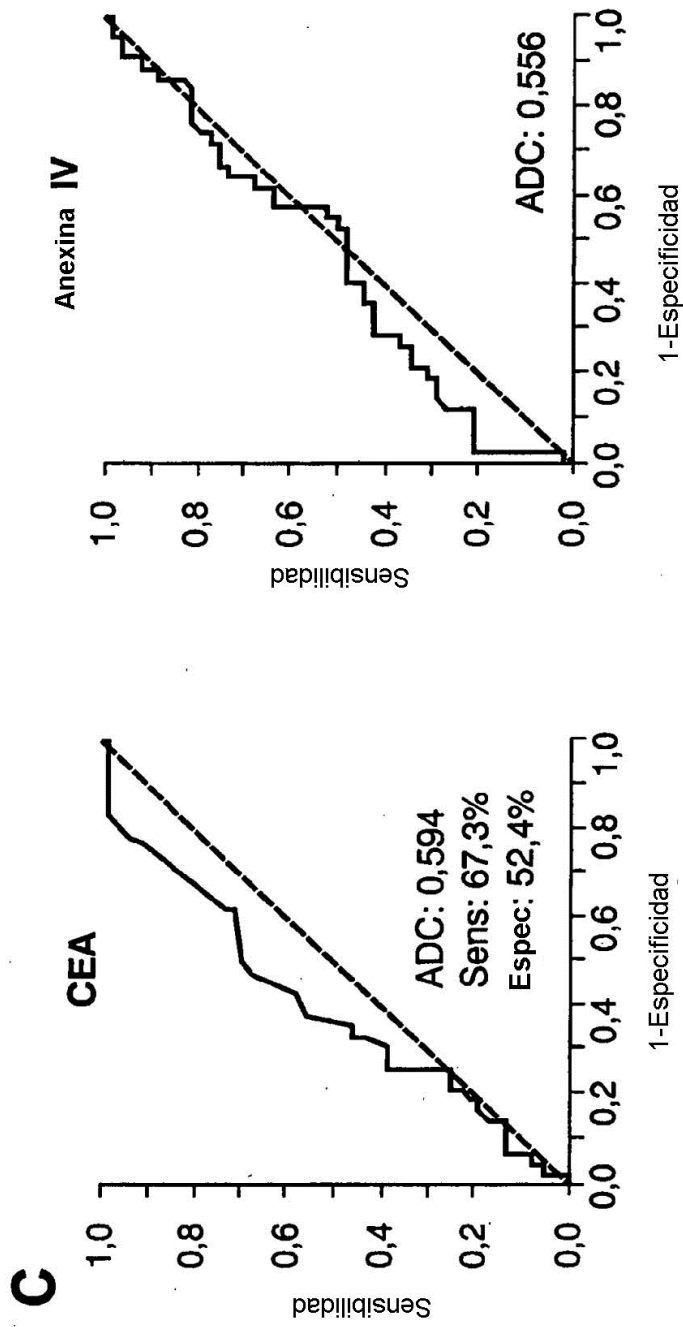


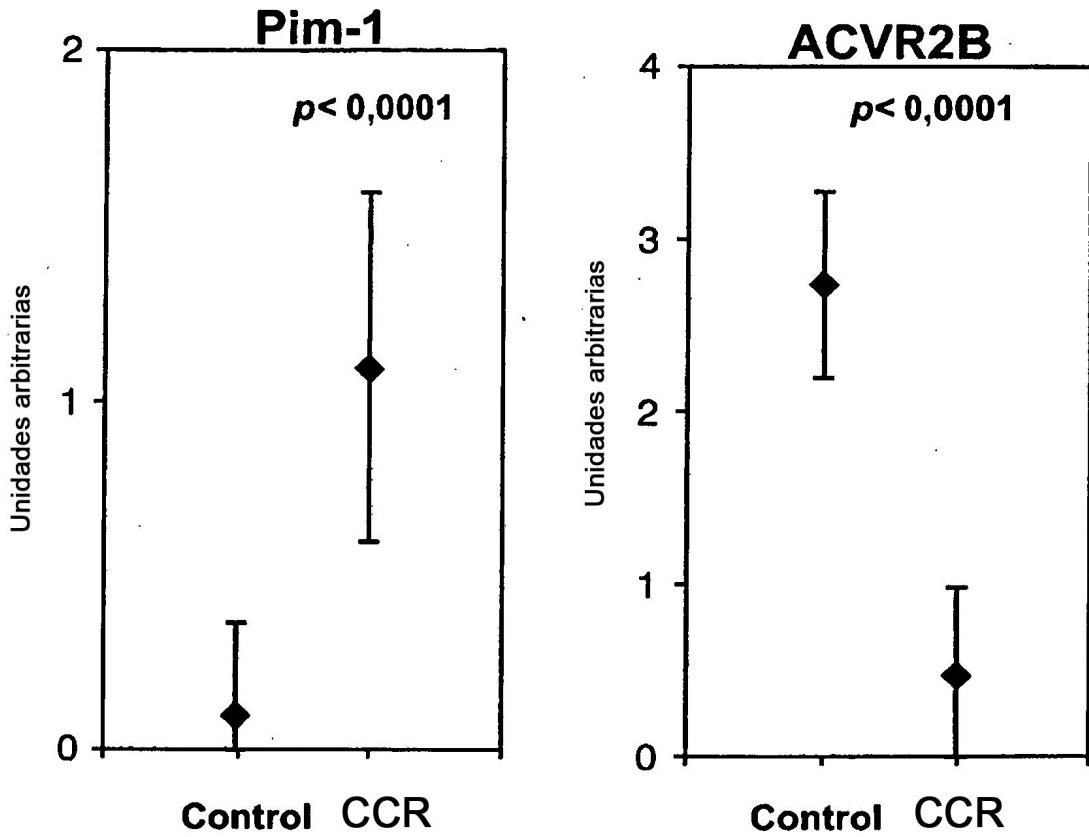
Fig. 3 (cont.)





**Fig. 3 (cont.)**

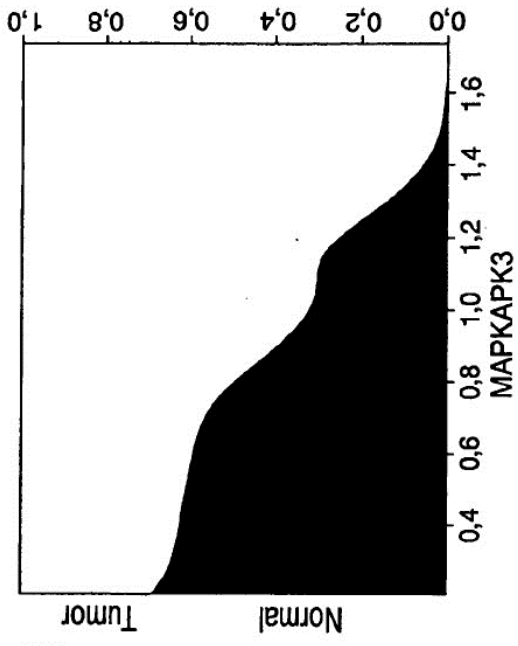
A



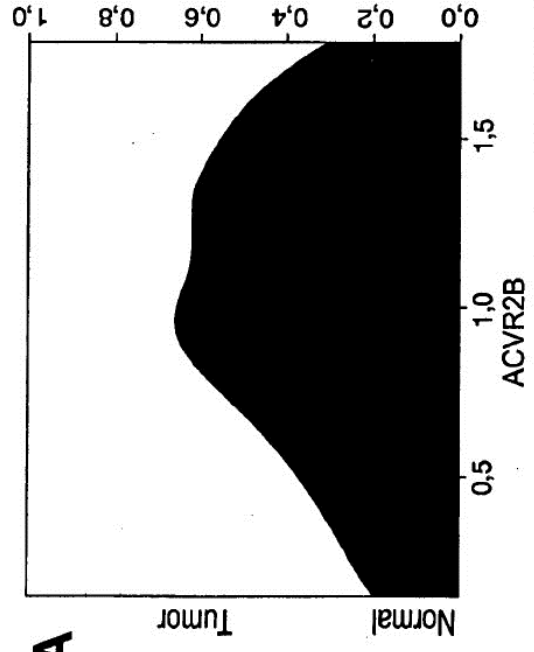
B

	Pim-1		ACVR2B	
	Control	Tumor	Control	Tumor
Tamaño de la muestra	35	42	19	34
Media aritmética	0,1	1,1	2,74	0,46
I.C. del 95 % para la media	0,009-0,2	0,94-1,25	2,48-3	0,27-0,64
Desviación estándar	0,27	0,5	0,54	0,53
Prueba de la t	<0,0001		<0,0001	

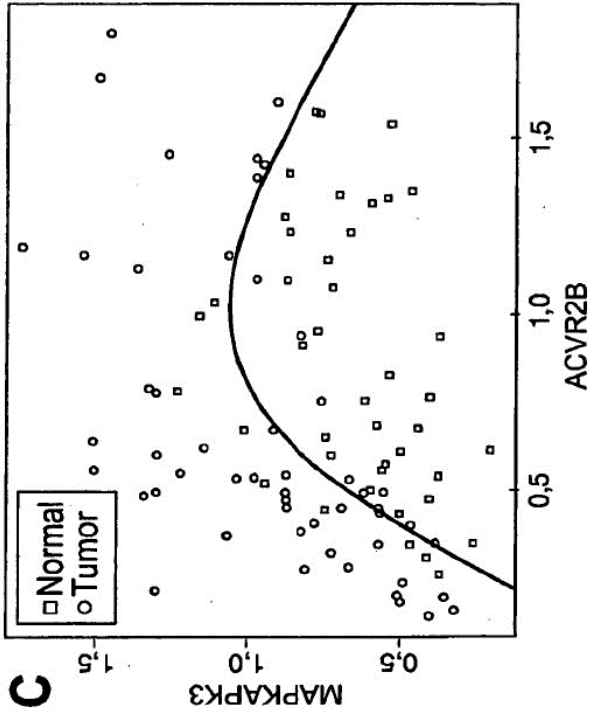
Fig. 4



**B**



**A**



**C**

Fig. 5

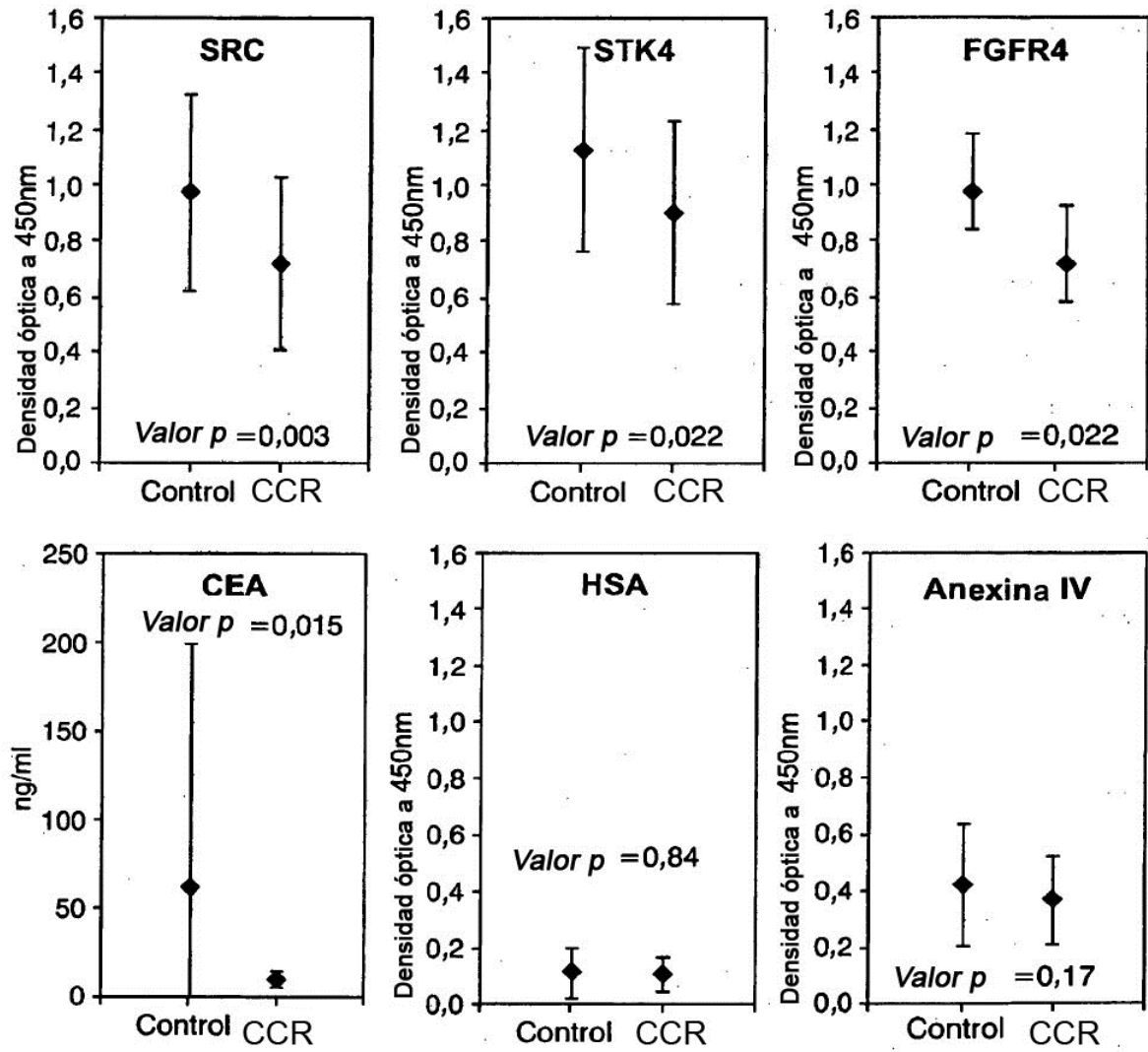
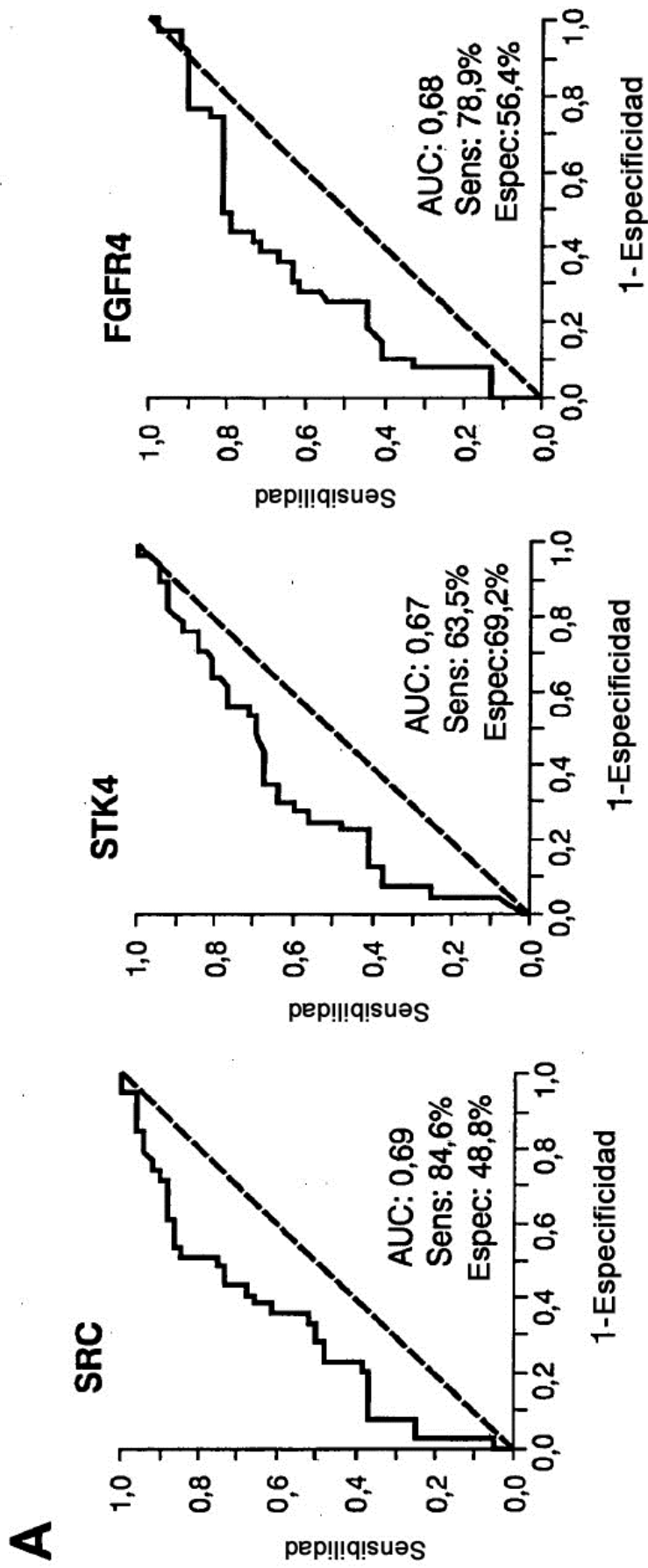


Fig. 6



**Fig. 7**

B

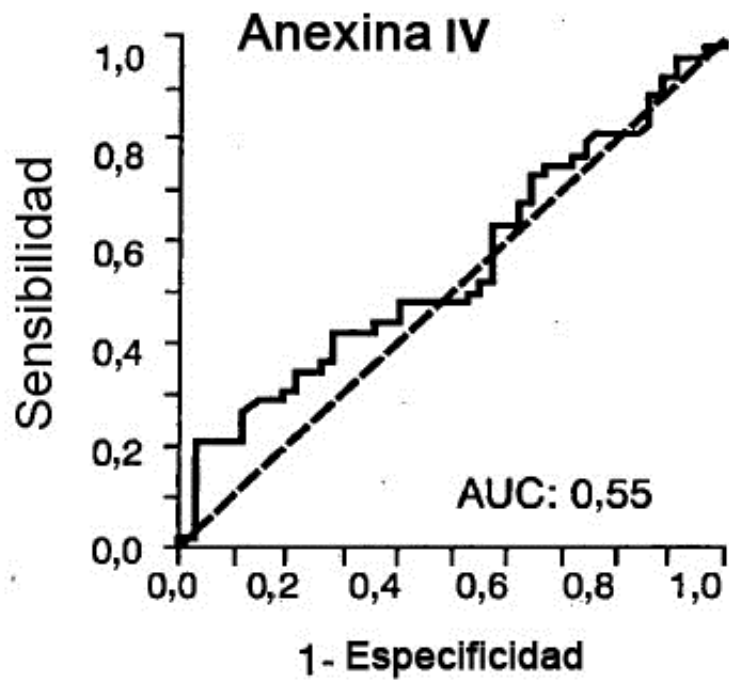
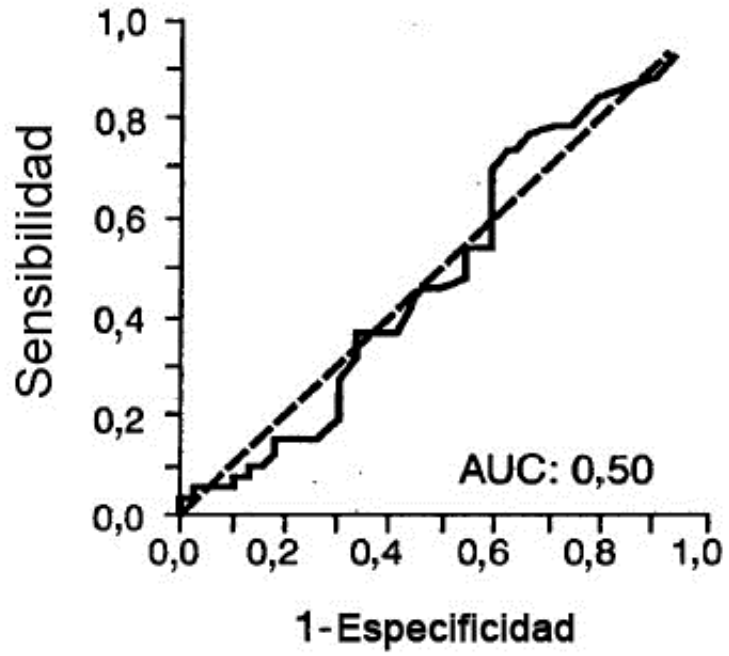


Fig. 7 (cont.)

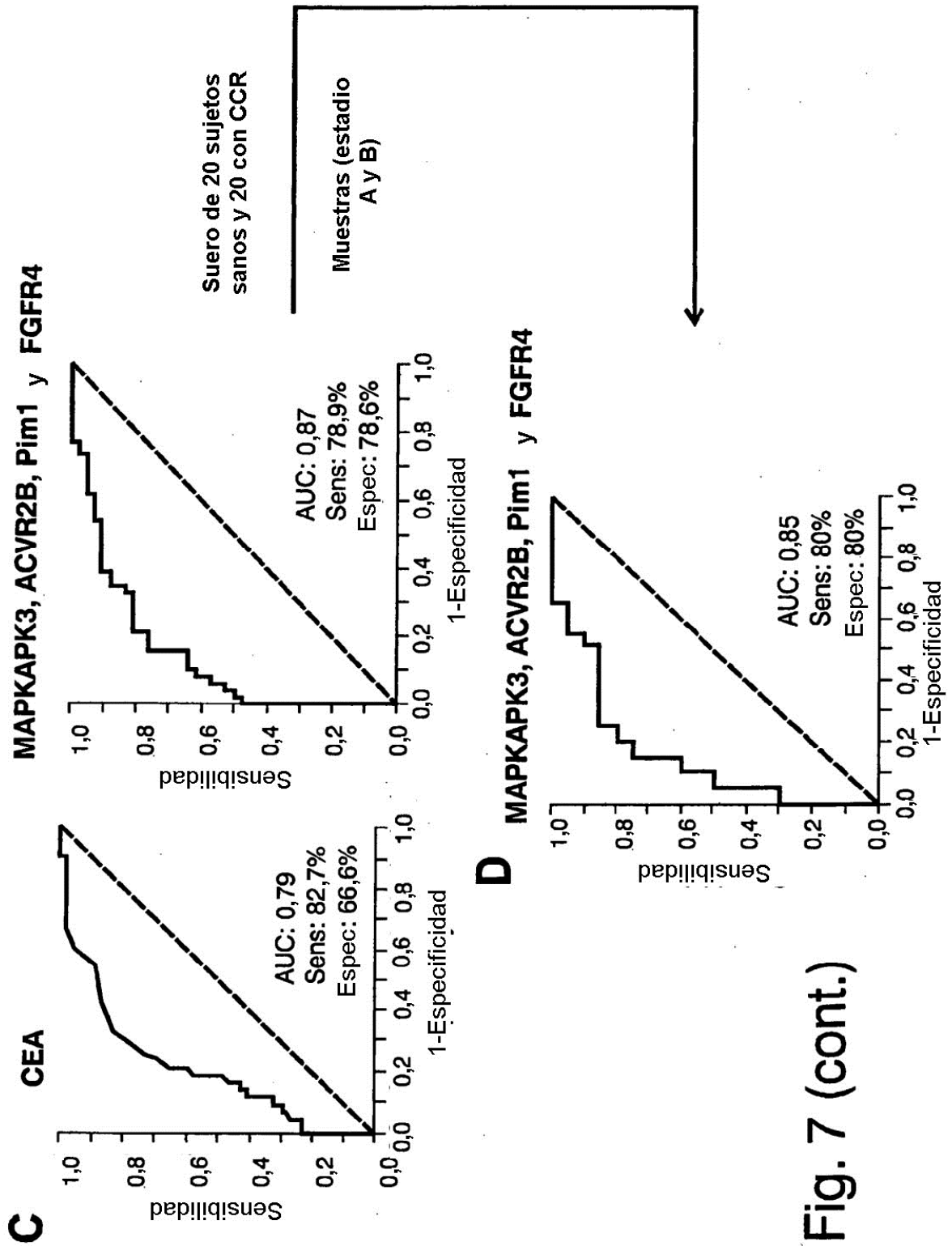


Fig. 7 (cont.)

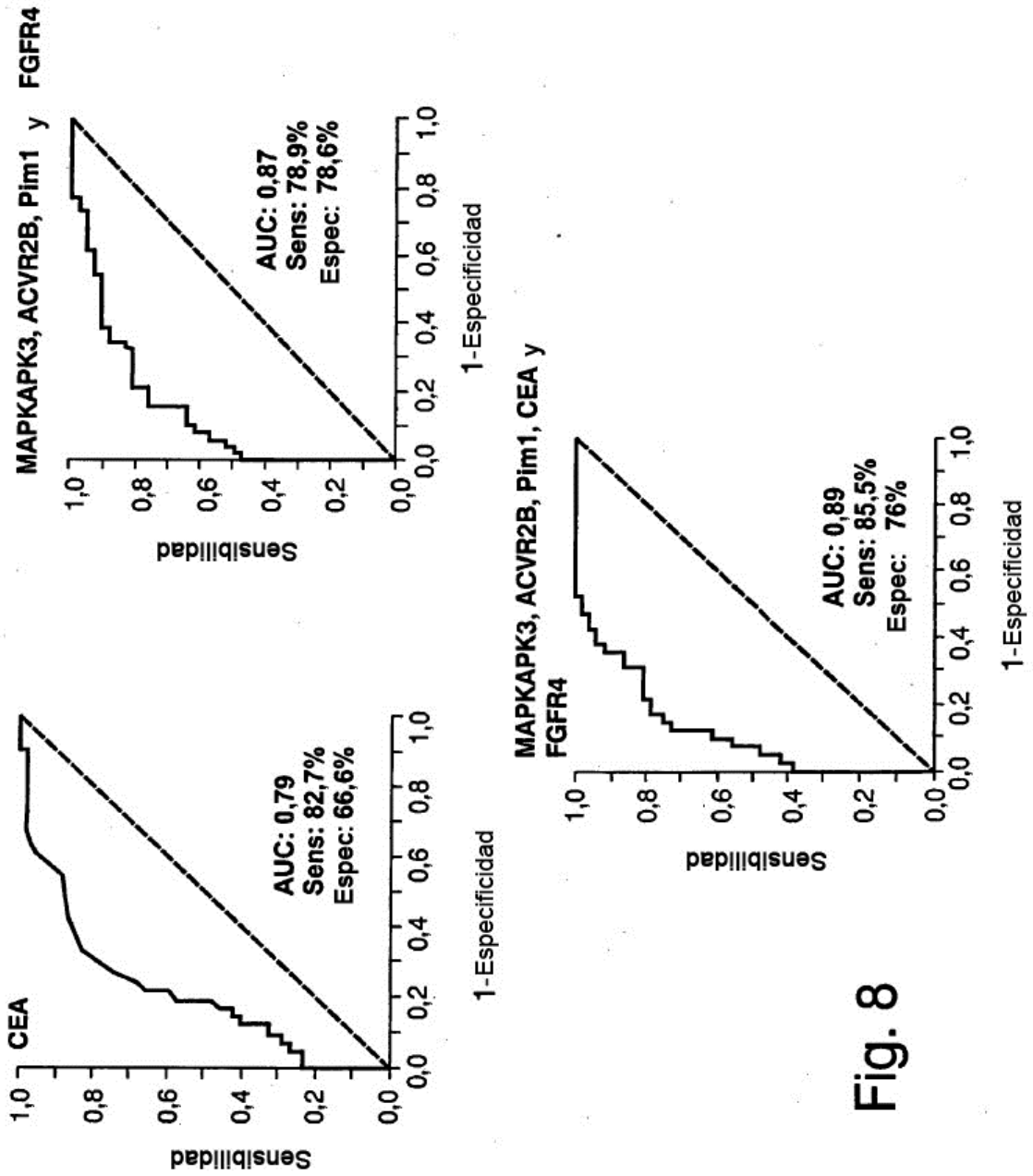


Fig. 8



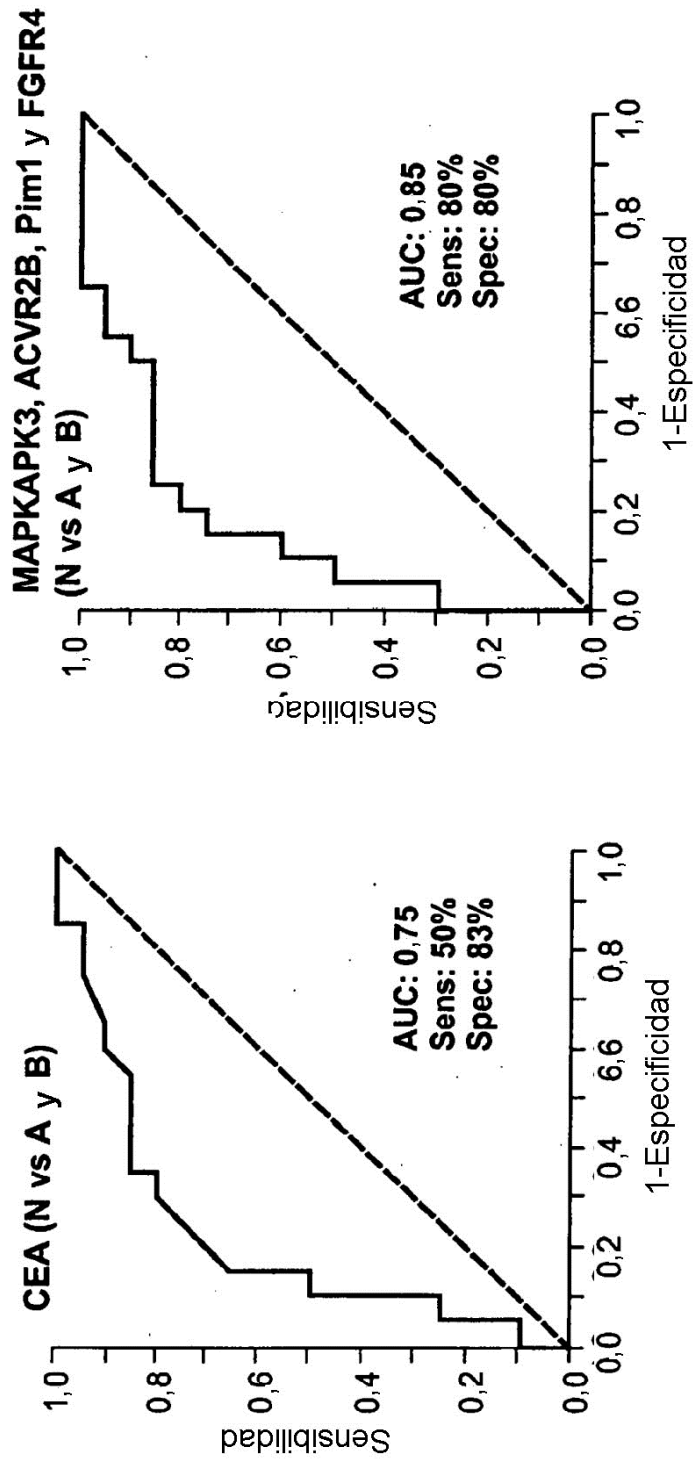


Fig. 9

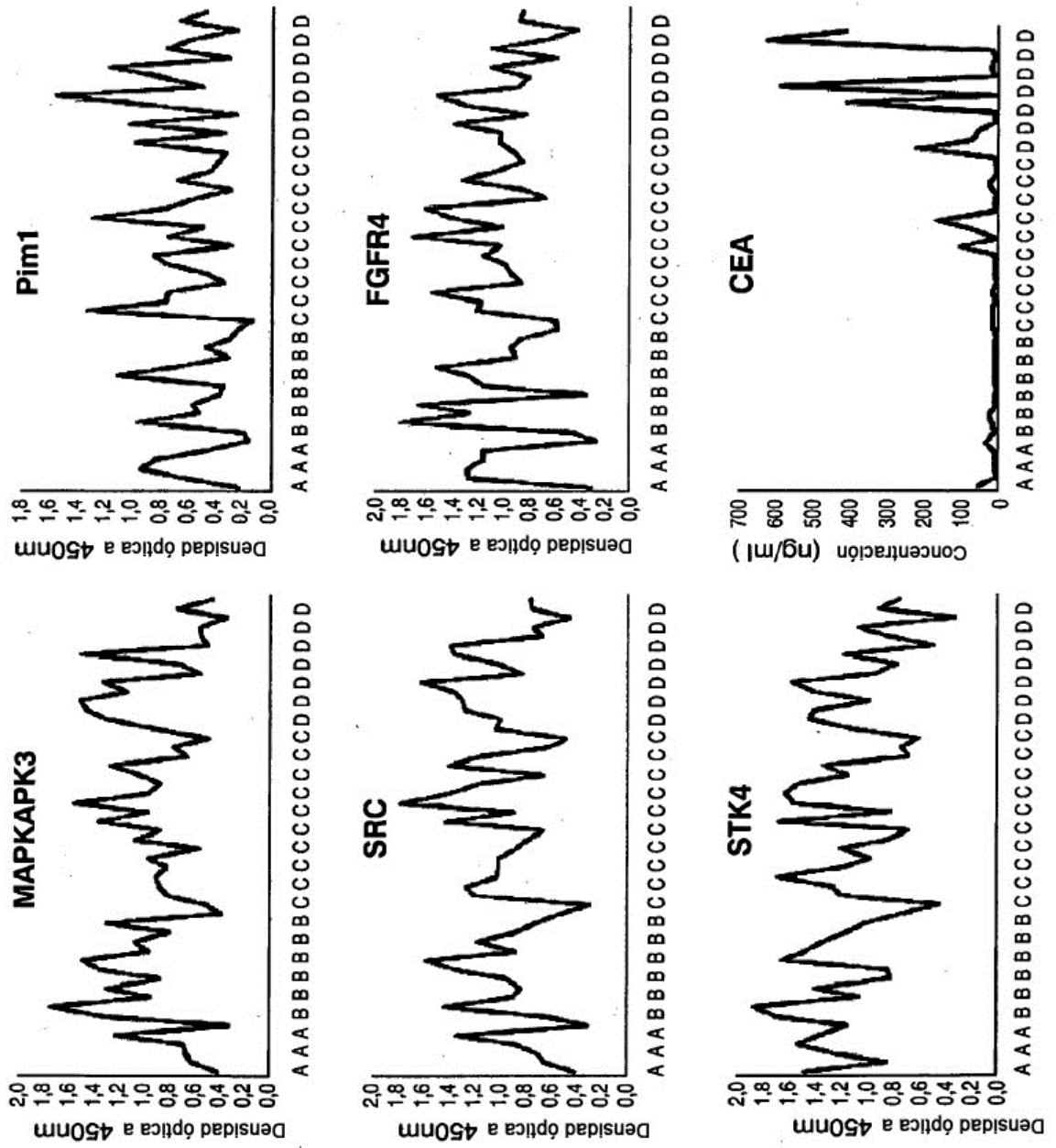


Fig. 10