

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 980**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C07D 207/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2012** **E 12710730 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016** **EP 2688907**

54 Título: **Mutante de HSP110 dominante negativo y su uso en el pronóstico y el tratamiento de cánceres**

30 Prioridad:

24.03.2011 EP 11305330

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

04.07.2016

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)**

101, rue de Tolbiac

75013 Paris, FR y

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE (50.0%)

72 Inventor/es:

GARRIDO, CARMEN y

DUVAL, ALEX

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 575 980 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

Mutante de HSP110 dominante negativo y su uso en el pronóstico y el tratamiento de cánceres

La presente invención se refiere a una proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada que carece de su dominio de unión a sustrato, que no exhibe su actividad chaperona y/o no es capaz de unirse a la proteína de choque térmico 70 (HSP70) y/o la proteína de choque térmico 27 (HSP27), pero que es capaz de unirse a HSP110 de tipo silvestre. Dicha proteína de choque térmico 110 mutada puede usarse (i) en métodos para el pronóstico de la supervivencia y/o de la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer, más particularmente de un cáncer propenso a tener un fenotipo de inestabilidad microsatelital (MSI), tal como cáncer colorrectal (CCR) y (ii) para tratar cánceres.

Proteínas HSP y HSP110

Las proteínas de choque térmico (HSP) son una clase de proteínas funcionalmente relacionadas denominadas proteínas chaperonas, cuya expresión aumenta cuando las células se exponen a temperaturas elevadas u otros estreses tales como infección, inflamación, ejercicio, exposición de la célula a toxinas (etanol, arsénico, trazas metálicas y luz ultravioleta, entre muchos otros), inanición, hipoxia (privación de oxígeno), deficiencia de nitrógeno (en plantas) o privación de agua. En consecuencia, se hace referencia también a las proteínas de choque térmico como proteínas de estrés y su regulación positiva se describe a veces más generalmente como parte de la respuesta al estrés. La actividad chaperona de las proteínas HSP está mediada por su dominio de unión a ATP y es esencial para el plegamiento de proteínas, para la formación de complejos proteicos, para el transporte transmembrana de proteínas y para orientar alguna de ellas a la degradación lisosómica. En seres humanos, hay al menos ocho proteínas HSP, incluyendo HSP70 y HSP110. Desde mediados de los 90, es conocido que la HSP70 se expresa abundantemente en células cancerosas (tanto estirpes celulares como tumores) con un patrón que se correlaciona con una mala diferenciación, una alta capacidad proliferativa con tendencia a la metástasis y resistencia a diversos agentes citotóxicos.

Como otras HSP inducibles por el estrés, la HSP100, también llamada HSP105, protege a la célula frente a condiciones adversas. Sin embargo, la HSP110 proporciona también funciones críticas específicas, puesto que la desactivación del gen *hsp100* tanto en levadura como en *Drosophila* es mortal (Trott *et al.*, *Genetics* **170** (3), 1009 (2005)). La HSP110 no solo actúa como factor de intercambio nucleotídico para HSP70 (Andreasson *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (43), 16519 (2008)), sino que posee también actividad chaperona antiagregación. Es aproximadamente cuatro veces más eficaz en la unión y estabilización de sustratos proteicos desnaturalizados en comparación con HSC70 y HSP70 (Wang *et al.*, *Cancer Research* **63** (10), 2553 (2003)). Además, es también conocido que la HSP110 puede actuar como inductor de HSP70, desempeñando así un papel importante en la protección de células frente a estresantes nocivos junto con HSP70. Recientemente, se ha demostrado que la HSP110 se acumula anormalmente en células cancerosas, y se cree que potencia su supervivencia (Yamagishi *et al.*, "The FEBS Journal" **275** (18), 4558 (2008); Hosaka *et al.*, *Cancer Science* **97** (7), 623 (2006); Yamagishi *et al.*, *Experimental Cell Research* **312** (17), 3215 (2006); Siatskas *et al.*, *Faseb J.* **19** (12), 1752 (2005)). La HSP110 se expresa con especial fuerza en células de cáncer de colon (Kai *et al.*, *Oncology Reports* **10** (6), 1777 (2003)), y los análisis del perfil de expresión génica de cáncer colorrectal primario (CCR) con estabilidad microsatelital (MSS) ha ligado la expresión de HSP100 con metástasis y mal pronóstico (Slaby *et al.*, *Oncology Reports* **21** (5), 1235 (2009)).

Fenotipo de inestabilidad microsatelital y fenotipo de estabilidad microsatelital

Un subconjunto de cánceres se caracteriza por una deficiencia de la reparación de desapareamientos (MMR), especialmente debida a alteraciones inactivadoras de los genes de MMR *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Como consecuencia, estos tumores exhiben un fenotipo particular llamado "inestabilidad microsatelital" o "MSI", caracterizado por un fenómeno de inestabilidad global que afecta a secuencias repetidas de microsatélites. Los tumores con fenotipo de MSI pueden aparecer en el contexto de síndromes hereditarios raros tales como el síndrome de Lynch o la deficiencia de reparación de desapareamientos constitutiva (CMMR-D) o puede aparecer esporádicamente en tantos como un 10-15 % de los cánceres colorrectales, gástricos y endométricos, y en menor extensión en muchos otros tumores (Duval y Hamelin, *Annales de génétique* **45**: 71-75 (2002)).

El síndrome de Lynch es debido a una mutación autosómica en uno de los 4 genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2* llamados "genes de MMR", que están implicados en la reparación de desapareamientos durante la replicación de ADN. Los pacientes que padecen el síndrome de Lynch tienen un riesgo del 70 % de desarrollar, en edad adulta, cáncer de colon y diversos cánceres que afectan a endometrio, ovario, estómago, intestino delgado, hígado, sistema urinario superior, cerebro y piel.

Aparte, el síndrome CMMR-D/Lynch 3 es debido a mutaciones de línea germinal nocivas bialélicas en los genes de MMR (Ricciardone *et al.*, *Cancer Res.* **59**: 290-3 (1999); Wang *et al.*, *Cancer Res.* **59**: 294-7 (1999)) y se caracteriza por el desarrollo de tumores pediátricos y un enorme espectro clínico muy diferente de un paciente a otro. Los tumores son principalmente linfomas, leucemias, tumores cerebrales derivados de astrocitos y/o tumores colorrectales de inicio muy temprano. Otros signos, llamados señales de aviso, tales como los típicos granos de "café con leche" se observan frecuentemente en pacientes de CMMR-D, estando sin embargo también presentes en

sujetos sanos de la población general. Permiten reconocer, aunque no específicamente, a los pacientes con riesgo de síndrome de CCMR-D en la población general antes de la emergencia de los cánceres.

En los cánceres con MSI esporádicos, tales como cánceres colorrectal, gástrico o endométrico, la deficiencia de MMR es debida al silenciamiento epigenético y bialélico de *MLH1* mediante metilación *de novo* de su sitio promotor en más de un 90 % de los casos, independientemente del sitio primario del tumor (Kane *et al.*, Cancer Research **57**: 808-811 (1997)). Los cánceres con MSI esporádicos no están limitados a cánceres colorrectal, gástrico o endométrico, sino que pueden comprender cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma.

La función normal del sistema de MMR es reconocer y reparar las inserciones, delecciones e incorporaciones erróneas de bases que surgen durante la replicación y recombinación de ADN, así como reparar algunas formas de daño de ADN. Está ahora bien establecido que la deficiencia de MMR no es por sí misma un evento transformador directo y que los tumores con MSI se desarrollan mediante una ruta molecular distintiva caracterizada por la inestabilidad genética de numerosas secuencias repetidas microsatelitales a lo largo del genoma (Duval y Hamelin, Cancer Research **62** (9), 2447 (2002)). La gran mayoría de artículos publicados sobre los mecanismos subyacentes a la carcinogénesis de MSI han implicado el estudio de cáncer colorrectal (CCR). Estos han revelado que los CCR con MSI comprendían un grupo distintivo y alternativo al tipo tumoral principal al que se hace referencia como CIN (por "inestabilidad cromosómica", también llamado MSS por "estabilidad microsatelital") (Walther *et al.*, Gut **57** (7), 941 (2008)). Además de la inestabilidad genética en las repeticiones codificantes, las células tumorales con MSI acumulan ciertos de alteraciones en las repeticiones microsatelitales no codificantes a lo largo del genoma (Giannini *et al.*, Oncogene **23** (15), 2640 (2004)), pero las consecuencias funcionales de estas mutaciones en la carcinogénesis tienen que investigarse detalladamente todavía.

El estado de MSI de un tumor dado puede determinarse observando la inestabilidad microsatelital en un panel de cinco marcadores genéticos microsatelitales: BAT25, BAT26, NR21, NR24 y NR27. Los tumores con inestabilidad en dos o más de estos marcadores se definieron como de MSI-High (MSI-H), mientras que aquellos con inestabilidad en un marcador o que no muestran inestabilidad se definieron respectivamente como tumores MSI-Low (MSI-L) y con estabilidad microsatelital (MSS). Los cánceres con MSI-H tienen rasgos clinicopatológicos distintos de los tumores con MSI-L y MSS, considerándose que los tumores con MSI-L y MSS tienen los mismos rasgos clínicos y moleculares, y la distinción entre tumores con MSI-H y MSI-L/MSS es importante para su pronóstico y tratamiento (Duval y Hamelin, Annales de génétique **45**: 71-75 (2002)). Por ejemplo, es conocido que el estado de MSI de los cánceres colorrectales (es decir, la clasificación de un tumor como MSI-H o MSI-L/MSS) es predictivo del beneficio de la quimioterapia de base complementaria con fluorouracilo en cánceres de colon en etapa II y etapa III (Ribic *et al.*, N. Engl. J. Med. **349**: 247 (2003)). Por tanto, la identificación y clasificación de los tumores colorrectales por el estado de MSI proporciona al facultativo médico información crítica en cuanto al diagnóstico, pronóstico y régimen de tratamiento óptimo del paciente.

Aunque se considera ahora que los cánceres con MSI representan una entidad tumoral distinta, no hay todavía un enfoque terapéutico específico que tenga en cuenta el modo único de transformación celular observado en estos tumores. Además, se ha reseñado consistentemente que los CCR con MSI muestran un pronóstico y respuesta diferentes ante agentes quimioterapéuticos (Sargent *et al.*, J. Clin. Oncol. **28** (20), 3219 (2010); Zaanan *et al.*, Ann. Oncol. **21** (4), 772 (2010)), que todavía no pueden valorarse.

Hyun *et al.*, J. of Biol. Chem. 1999, 274(22): 15712-15718 describe la actividad chaperona de HSP110 e identifica dominios funcionales en la proteína. Se muestra un fragmento de 382 aminoácidos de HSP105/110 de *Xenopus* en la base de datos Uniprot (número de acceso Q6P4M1). La solicitud de patente de EE.UU. 2006/167065 da a conocer moduladores de la degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD) útiles para tratar una serie de enfermedades, incluyendo cánceres. El documento FR 2.912.745 describe inhibidores de NMD adicionales. Deschoolmeester *et al.*, J. of Molecular Diagnostics, 2008, 10(2), 154-159 reseña la detección de inestabilidad microsatelital en cáncer colorrectal usando un ensayo múltiple de marcadores. Slaby *et al.*, Oncology Reports, 2009, 21(5): 1235-1241 da a conocer la sobreexpresión del gen Hsp110 durante la progresión del cáncer colorrectal.

Por tanto, existe la necesidad de identificar marcadores para el pronóstico de la supervivencia de pacientes afectados por cáncer, más particularmente por cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI y para evaluar su respuesta a la terapia. Existe también la necesidad de desarrollar tratamientos específicamente adaptados para cánceres con MSI y MSS, teniendo en cuenta su especificidad clínica y molecular.

Descripción de la invención

Los inventores han identificado sorprendentemente una forma mutada de la proteína HSP110, generada a partir de un ARNm cortado y empalmado aberrantemente que carece del exón 9 y por tanto carece de los aminoácidos 381 a 858 de HSP100 de tipo silvestre, en estirpes celulares de CCR con MSI y tumores primarios o adenomas. Los inventores han identificado también delecciones que afectan a una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen *HSPH1*, concretamente el gen que codifica la proteína HSP110. Se ha encontrado que la longitud de la delección que afecta a dicha repetición

microsatelital se correlaciona con el nivel de expresión de ARNm o proteína de HSP110 mutada, sugiriendo por tanto que la delección de la repetición microsatelital es el evento causante que conduce a la expresión aberrante de HSP110 mutada. Además, se ha encontrado que la expresión de HSP110 mutada perjudicaba tanto la localización celular normal de HSP110 como su interacción con otras HSP, anulando así su actividad chaperona y su función antiapoptótica de manera dominante negativa.

Se ha encontrado sorprendentemente que la HSP110 mutada no solo ha perdido sus propiedades antiapoptóticas, sino que también se asocia con la HSP110 de tipo silvestre, bloqueando por tanto la función antiapoptótica de HSP110 de tipo silvestre de manera dependiente de la dosis. Es decir, la proteína HSP110 mutada es un mutante dominante negativo.

Sin ligarse a teoría alguna, los inventores creen que este efecto proapoptótico de la HSP110 mutada, observado especialmente cuando el nivel de expresión de la HSP110 mutada es similar o superior al nivel de expresión de la HSP110 de tipo silvestre, es debido al hecho de que cada molécula de HSP110 mutada forma un complejo con una molécula de HSP110 de tipo silvestre, neutralizando así la actividad de HSP110 de tipo silvestre de manera dominante negativa. En consecuencia, las células que expresan la HSP110 mutada son más sensibles a la apoptosis, principalmente a la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos.

Como consecuencia, la HSP110 mutada puede administrarse a un paciente que padece cáncer, particularmente un cáncer con fenotipo de MSI o MSS, y más particularmente a un cáncer colorrectal, para aumentar la sensibilidad a la apoptosis y/o a fármacos quimioterapéuticos.

Además, se ha encontrado que el perfil de expresión de la HSP110 mutada puede usarse como marcador temprano y fiable del pronóstico de la supervivencia y la respuesta al tratamiento. Es más, los altos niveles de expresión de HSP110 humana están correlacionados con un buen pronóstico y una respuesta positiva al tratamiento.

Definiciones

El término “HSP110 de tipo silvestre” hace referencia a la proteína de choque térmico de 110 kDa. Se muestra una secuencia aminoacídica de la HSP110 de tipo silvestre como SEQ ID NO: 2 (número de acceso a Swiss-Prot Q92598, actualización de 8 de marzo de 2011, versión 119). El término “HSP110 de tipo silvestre” engloba la proteína de SEQ ID NO: 2 (completa e isoformas maduras) así como homólogos de otras especies, variantes obtenidas mediante procesamiento proteolítico, variantes de corte y empalme y variantes alélicas de las mismas.

El término “cáncer” hace referencia a o describe la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Dicho cáncer puede ser un cáncer esporádico o hereditario. Dicho cáncer puede ser un adenoma (concretamente, un tumor benigno que puede evolucionar y volverse maligno) o un tumor maligno (concretamente, un tumor primario o un tumor metastásico). Los ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, sarcomas, carcinomas, leucemias, linfomas, tumores de células germinales y blastomas.

En una realización preferida, dicho cáncer es un “cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI”. Un “cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI” hace referencia a un cáncer esporádico o hereditario en que puede estar presente (MSI) o ausente (MSS) inestabilidad microsatelital. La detección de si está presente inestabilidad microsatelital puede efectuarse, por ejemplo, genotipando marcadores microsatelitales, tales como BAT25, BAT26, NR21, NR24 y NR27, p. ej. como se describe en Buhard *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 24 (2), 241 (2006) y en la solicitud de patente europea nº EP 11305160.1. Se define que un cáncer tiene fenotipo de MSI si se detecta inestabilidad en al menos 2 marcadores microsatelitales. Por el contrario, si se detecta inestabilidad en uno o ningún marcador microsatelital, entonces dicho cáncer tiene un fenotipo de MSS.

Los ejemplos de cánceres propensos a tener un fenotipo de MSI incluyen adenomas o tumores primarios, tales como cáncer colorrectal (también llamado cáncer de colon o cáncer de intestino grueso), cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemia, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma. Preferiblemente, el cáncer es un cáncer colorrectal. Aún más preferiblemente, el cáncer es un cáncer colorrectal en etapa II o etapa III.

Un cáncer esporádico propenso a tener fenotipo de MSI puede hacer referencia a un cáncer debido a una alteración genética somática de uno de los genes de reparación de desapareamientos (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. Por ejemplo, un cáncer esporádico propenso a tener un fenotipo de MSI puede ser un cáncer debido a la metilación bialélica *de novo* del promotor del gen *MLH1*.

Un cáncer hereditario propenso a tener un fenotipo de MSI puede hacer referencia a un cáncer que aparece en el contexto del síndrome de Lynch o la deficiencia constitucional de reparación de desapareamientos (CMMR-D).

Un paciente que padece el síndrome de Lynch se define como un paciente con una mutación autosómica en uno de los 4 genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*.

Un paciente que padece CMMR-D se define como un paciente con una mutación bialélica en la línea germinal de uno de los 4 genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* o *PMS2*.

Se entiende por "cáncer colorrectal en etapa II" un tumor sin extensión a nódulo linfático y sin invasión distante ("American Joint Committee on Cancer", 2010, cap. 14, pág. 173-201).

Se entiende por "cáncer colorrectal en etapa III" un tumor con extensión a nódulo linfático ("American Joint Committee on Cancer" 2010, cap. 14, pág. 173-201).

- 5 Como se usa en la presente memoria, el paciente es un mamífero humano o no humano, en particular un mamífero roedor, felino, canino, bovino u ovino. En una realización preferida, el paciente es un paciente humano. Más particularmente, el paciente es un niño, un adulto, un hombre o una mujer.

Se entiende por "tratamiento", sin limitación, el tratamiento quimioterapéutico y/o tratamiento radioterapéutico y/o tratamiento quirúrgico. Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" engloba métodos terapéuticos, p.ej., dirigidos a curar, mejorar la afección del paciente y/o alargar la vida del paciente que padece el cáncer. Engloba también métodos profilácticos tales como métodos dirigidos a prevenir la aparición o la extensión de metástasis, así como métodos dirigidos a prevenir una recaída. El tratamiento quimioterapéutico puede efectuarse, por ejemplo, con un agente alquilante tal como, p.ej., oxaliplatino. El tratamiento quimioterapéutico puede ser también un tratamiento quimioterapéutico complementario, p.ej. un tratamiento quimioterapéutico que usa el agente 5-fluorouracilo. En algunas realizaciones, dicho tratamiento quimioterapéutico puede combinar al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o como máximo 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 agentes tales como, p.ej., una combinación de oxaliplatino, 5-fluorouracilo y ácido folínico, concretamente el tratamiento FOLFOX, o una combinación de 5-fluorouracilo y ácido folínico, concretamente el tratamiento FUFOL o LV5FU2.

20 Como se usa en la presente memoria, el término "repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizados en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110)" hace referencia a la repetición de timidina comprendida entre la posición 73 y la posición 89 de la secuencia de SEQ ID NO: 9:

```
GAAAACCCCTGTCCATCCATTGGAATTGAGTTTTATATTAAGATGACTGGGAAGTGTTCC
ATGTGCTCATGATTTTTTTTTTTTTTTTAAAGTGTCGAATACTTTCCCCTTTCCCCGGCATT
TAAAGTTAGAGAATTTTCCGTCACAGATGCAGTTCCTTTTCC.
```

Proteína de choque térmico 110 mutada

25 Se describe en la presente memoria una proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada, en la que dicha proteína:

- a) no exhibe actividad chaperona y/o no es capaz de unirse a la proteína de choque térmico 70 (HSP70) y/o a la proteína de choque térmico 27 (HSP27); y
- b) es capaz de unirse a una proteína HSP110 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2.

30 En una realización preferida, la proteína HSP110 mutada carece del dominio consistente en los aminoácidos 381 a 858 de SEQ ID NO: 2. En otra realización preferida, la proteína HSP110 mutada está codificada por un ARNm que carece del exón 9. El exón 9 del gen que codifica HSP110 se describe, por ejemplo, entre las posiciones 1536 y 1642 de la secuencia de referencia del NCBI NM_006644.2 (versión publicada el 27 de diciembre de 2010).

35 En otra realización preferida, la proteína HSP110 mutada comprende o consiste en una secuencia aminoacídica al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % a la SEQ ID NO: 1. Lo más preferiblemente, la proteína HSP110 mutada comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1.

Se entiende por una proteína que tiene una secuencia aminoacídica al menos, por ejemplo, un 95 % "idéntica" a una secuencia aminoacídica de consulta de la presente invención, que la secuencia aminoacídica de la proteína en cuestión sea idéntica a la secuencia de consulta excepto porque la secuencia de proteína en cuestión pueda incluir hasta 5 alteraciones aminoacídicas por cada 100 aminoácidos de la secuencia aminoacídica de consulta. En otras palabras, para obtener una proteína que tenga una secuencia aminoacídica al menos un 95 % idéntica a una secuencia aminoacídica de consulta, pueden insertarse, eliminarse o sustituirse por otro aminoácido hasta un 5 % (5 de 100) de los residuos aminoacídicos en la secuencia en cuestión.

45 En el marco de la presente solicitud, el porcentaje de identidad se calcula usando un alineamiento global (concretamente, las dos secuencias se comparan en toda su longitud). Los métodos para comparar la identidad y homología de dos o más secuencias son bien conocidos en la materia. Puede usarse, por ejemplo, el programa "Needle", que usa el algoritmo de alineamiento global de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) para encontrar el alineamiento óptimo (incluyendo huecos) de dos secuencias cuando se considera toda su longitud. El programa Needle está disponible, por ejemplo, en el sitio web de internet ebi.ac.uk. El porcentaje de identidad de acuerdo con la invención se calcula preferiblemente usando el programa EMBOSS::needle (global) con un parámetro de "apertura de hueco" igual a 10,0, un parámetro de "extensión de

hueco" igual a 0,5 y una matriz Blosum62.

Una proteína que comprende o consiste en una secuencia aminoacídica "al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica" a una secuencia de referencia puede comprender mutaciones tales como delecciones, inserciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia de referencia. En el caso de sustituciones, la sustitución corresponde preferiblemente a una sustitución conservativa como se indica en la tabla siguiente. En una realización preferida, la proteína que comprende o consiste en una secuencia aminoacídica al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a una secuencia de referencia difiere solo de la secuencia de referencia por sustituciones conservativas. En otra realización preferida, la proteína que comprende o consiste en una secuencia aminoacídica al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a una secuencia de referencia corresponde a una variante alélica de origen natural de la secuencia de referencia. En aún otra realización preferida, la proteína que comprende o consiste en una secuencia aminoacídica al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % idéntica a una secuencia de referencia corresponde a una secuencia homóloga derivada de otra especie de mamífero no humana distinta de la secuencia de referencia.

Sustituciones conservativas	Tipo de aminoácido
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe, Trp	Aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Aminoácidos con cadenas laterales no cargadas pero polares
Asp, Glu	Aminoácidos con cadenas laterales ácidas
Lys, Arg, His	Aminoácidos con cadenas laterales básicas
Gly	Cadena lateral neutral

Las proteínas HSP110 mutadas según la invención no exhiben actividad chaperona y/o no son capaces de unirse a la proteína de choque térmico 70 (HSP70) y/o a la proteína de choque térmico 27 (HSP27), pero son capaces de unirse a una proteína HSP110 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2.

Se entiende por "actividad chaperona", sin limitaciones, la capacidad de permitir el plegamiento de proteínas, la formación de complejos proteicos, el transporte transmembrana de proteínas y la orientación de algunas de ellas a degradación lisosómica. El especialista en la materia puede determinar fácilmente si la HSP110 mutada posee una actividad chaperona. Por ejemplo, la actividad chaperona puede determinarse usando un ensayo de termolabilidad proteica, como se describe en el párrafo titulado "Actividad chaperona de HSP110" del Ejemplo 1.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, el término "unión" tiene su significado habitual en la materia. En particular, el término "unión" hace referencia a una unión específica, en contraposición con una unión no específica. El especialista en la materia puede determinar fácilmente si la HSP110 mutada es capaz de unirse a HSP70, HSP27 y/o HSP110 de tipo silvestre. Por ejemplo, puede determinarse la capacidad de la HSP110 mutada de unirse a HSP70, HSP27 y/o HSP110 de tipo silvestre mediante ensayos de inmunoprecipitación como se describen en el párrafo titulado "Inmunoprecipitación y transferencia Western" del Ejemplo 1.

Se describen además aquí fragmentos de la proteína HSP110 mutada que comprenden o consisten en una secuencia aminoacídica al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, a condición de que dichos fragmentos retengan la misma actividad biológica que la proteína HSP110 mutada (concretamente, que no exhiban actividad chaperona y/o no sean capaces de unirse a HSP70 y/o HSP27, pero que sean capaces de unirse a proteína HSP110 de tipo silvestre de SEQ ID NO: 2). Estos fragmentos comprenden o consisten preferiblemente en al menos 5 aminoácidos contiguos (consecutivos) de la proteína HSP110 mutada aquí descrita anteriormente. Preferiblemente, el fragmento comprende o consiste en al menos 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 275, 300, 325, 350 o 375 aminoácidos consecutivos de la HSP110 mutada. También preferiblemente, el fragmento es un péptido, concretamente consiste en como máximo 50 aminoácidos.

Se describen también peptidomiméticos de la proteína HSP110 mutada según la invención, o de fragmentos. Como se usa en la presente memoria, el término "peptidomimético" hace referencia a un compuesto que contiene elementos estructurales no peptídicos que imitan la acción biológica de una proteína HSP110 mutada según la invención. Los métodos para diseñar y sintetizar peptidomiméticos de una proteína dada son bien conocidos en la materia e incluyen, p.ej., aquellos descritos en Ripka y Rich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2** (4): 441-52 (1998) y en Patch y Barron, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6** (6): 872-7 (2002).

La presente invención está dirigida además a un ácido nucleico aislado que comprende o consiste en una secuencia que codifica la proteína HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente.

En una realización preferida, el ácido nucleico aislado comprende o consiste en una secuencia nucleotídica al

menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 3, preferiblemente al menos un 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 3, y más preferiblemente el ácido nucleico aislado comprende o consiste en la SEQ ID NO: 3.

Una “molécula de ácido nucleico” hace referencia a una forma polimérica de éster fosfato de ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina o citidina; “moléculas de ARN”) o desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina o desoxicitidina; “moléculas de ADN”) o a cualquier análogo de fosfoéster de los mismos, tales como fosforotioatos y tioésteres, en forma monocatenaria o de hélice bicatenaria. Son posibles hélices bicatenarias de ADN-ADN, ADN-ARN y ARN-ARN. El término molécula de ácido nucleico, y en particular molécula de ADN o ARN, hace referencia solo a la estructura primaria o secundaria de la molécula, y no lo limita a ninguna forma terciaria particular. Por tanto, este término incluye todo el ADN bicatenario, entre otros, en moléculas de ADN lineales (p.ej. fragmentos de restricción) o circulares, plásmidos y cromosomas. En la discusión de la estructura de las moléculas de ADN bicatenarias particulares, pueden describirse las secuencias en la presente memoria según la convención normal de dar solo la secuencia en la dirección 5' a 3' a lo largo de la hebra no transcrita de ADN (concretamente, la hebra que tiene una secuencia homóloga al ARNm). Una “molécula de ADN recombinante” es una molécula que ha experimentado una manipulación biomolecular.

La memoria descriptiva describe también vectores, p.ej. vectores de expresión, que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención. En otra realización, se proporciona una célula hospedadora (p.ej., célula hospedadora bacteriana, de levadura, fúngica o de mamífero) que contiene y/o expresa dicho vector. Se describen también métodos para producir una proteína HSP110 recombinante mutada según la invención mediante cultivo, en un medio adecuado, tal como una célula hospedadora de la invención. Dicho método puede comprender además la etapa de purificar la HSP110 recombinante mutada según la invención, y opcionalmente formularla en una composición farmacéutica.

Dichos ácidos nucleicos se pretenden administrar a un paciente usando un vector adenovírico y/o en el marco de la una terapia génica.

Se describe además un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 mutada según la invención.

En algunas realizaciones, dicho anticuerpo es capaz de reconocer una proteína HSP110 mutada según la invención, pero no es capaz de reconocer una proteína HSP110 de tipo silvestre, tal como la proteína HSP110 de tipo silvestre de secuencia SEQ ID NO: 2.

Preferiblemente, dicho anticuerpo es capaz de reconocer una proteína HSP110 mutada de secuencia SEQ ID NO: 1.

Un anticuerpo que “se une específicamente” a una proteína diana se une a dicha proteína diana con mayor afinidad y/o aidez que a otras proteínas o epítopos, incluso proteínas o epítopos estrechamente relacionados. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención se une a una proteína HSP110 mutada como se describe en la presente memoria, tal como una proteína que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, con mayor afinidad y/o aidez que se une a una proteína HSP110 de tipo silvestre de secuencia SEQ ID NO: 2. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 10^{-7} M o menos, tal como de aproximadamente 10^{-8} M o menos, tal como de aproximadamente 10^{-9} M o menos, de aproximadamente 10^{-10} M o menos o de aproximadamente 10^{-11} M o incluso menos cuando se determina por tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) en un instrumento BIAcore 3000 usando HSP110 mutada como ligando y el anticuerpo como analito. El anticuerpo puede unirse a la diana con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos 10 veces, tal como al menos 100 veces menor, por ejemplo al menos 1000 veces menor, tal como al menos 10.000 veces menor, por ejemplo al menos 100.000 veces menor que su afinidad de unión a un antígeno no específico (p.ej., HSP110 de tipo silvestre, BSA, caseína). La medida en que es menor la afinidad depende de la K_D del anticuerpo, de modo que cuando la K_D del anticuerpo es muy baja (es decir, el anticuerpo es altamente específico), entonces la medida en que la afinidad por el antígeno es menor que la afinidad por un antígeno no específico puede ser de al menos 10.000 veces.

Las frases “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico de un antígeno” se usan intercambiabilmente en la presente memoria con el término “un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno”.

El término “ k_d ” (s^{-1}), como se usa en la presente memoria, se pretende que haga referencia a la constante de la velocidad de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular. Se hace referencia también a dicho valor como el valor de k_{off} .

El término “ k_a ” ($M^{-1} \times s^{-1}$), como se usa en la presente memoria, pretende hacer referencia a la constante de la velocidad de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término “ K_D ” (M), como se usa en la presente memoria, pretende hacer referencia a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

El término “ K_A ” (M^{-1}), como se usa en la presente memoria, pretende hacer referencia a la constante de equilibrio de

disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular, y se obtiene dividiendo la k_a entre la k_d .

Como se usa en la presente memoria, "isotipo" hace referencia a la clase de anticuerpo (por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE o IgM) que está codificado por los genes de región constante de cadena pesada.

El término "anticuerpo" hace referencia a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, concretamente moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmuno-específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo engloba no solo moléculas de anticuerpo enteras, sino también fragmentos de anticuerpo así como variantes de anticuerpos, incluyendo derivados tales como anticuerpos humanizados. En los anticuerpos naturales, se ligan dos cadenas pesadas entre sí mediante enlaces disulfuro y se liga cada cadena pesada con una cadena ligera por un enlace disulfuro. Hay dos tipos de cadenas ligeras, lambda (λ) y kappa (κ). Hay cinco tipos de clases de cadenas pesadas principales (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Cada cadena contiene dominios de secuencia distintos. La cadena ligera incluye dos dominios, un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL). La cadena pesada incluye cuatro dominios, un dominio variable (VH) y tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3, a los que se hace referencia colectivamente como CH). Las regiones variables de ambas cadenas ligera (VL) y pesada (VH) determinan el reconocimiento de unión y la especificidad del antígeno. Los dominios de región constante de las cadenas ligera (CL) y pesada (CH) confieren propiedades biológicas importantes tales como asociación a cadena de anticuerpo, secreción, movilidad transplacentaria, unión a complemento y unión a receptores de Fc (FcR). El fragmento Fv es la parte N-terminal del fragmento Fb de una inmunoglobulina y consiste en las porciones variables de una cadena ligera y una cadena pesada. La especificidad del anticuerpo reside en la complementariedad entre el sitio de combinación con anticuerpo y el determinante antigénico. Los sitios de combinación con anticuerpo están compuestos por residuos que son principalmente de las regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR). Ocasionalmente, los residuos de regiones no hipervariables o estructurales (FR) incluyen en la estructura de dominios global y por ello el sitio de combinación. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) hacen referencia a secuencias aminoacídicas que, en conjunto, definen la afinidad de unión y especificidad de la región Fv natural de un sitio de unión a inmunoglobulina nativa. Las cadenas ligera y pesada de una inmunoglobulina tienen cada una tres CDR designadas L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2 y H-CDR3, respectivamente. Por lo tanto, un sitio de unión a antígeno incluye 6 CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de la cadena pesada y ligera.

Las regiones estructurales (FR) hacen referencia a secuencias aminoacídicas interpuestas entre las CDR, concretamente a aquellas porciones de regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina que están relativamente conservadas entre diferentes inmunoglobulinas en una sola especie, como se define por Kabat, *et al.* ("Sequences of Proteins of Immunological Interest" (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). Como se usa en la presente memoria, una "región estructural humana" es una región estructural que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85 % o más, en particular 90, 95 o 100 %) a la región estructural de un anticuerpo humano de origen natural.

El término "anticuerpo monoclonal" o "AcM" como se usa en la presente memoria hace referencia a una molécula de anticuerpo de una sola composición aminoacídica, que está dirigido contra un antígeno específico y que puede producirse por un solo clon de linfocitos B o hibridoma. Los anticuerpos monoclonales pueden ser también recombinantes, concretamente producidos por ingeniería de proteínas.

El término "anticuerpo quimérico" hace referencia a un anticuerpo genomanipulado que comprende un dominio VH y un dominio VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, en asociación con un dominio CH y un dominio CL de otro anticuerpo, en particular un anticuerpo humano. Como animal no humano, puede usarse cualquier animal tal como ratón, rata, hámster, conejo o similares. Un anticuerpo quimérico puede designar también un anticuerpo multiespecífico que tiene especificidad por al menos dos antígenos diferentes.

El término "anticuerpo humanizado" hace referencia a anticuerpos en que las regiones estructurales o "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) se han modificado para comprender la CDR de una inmunoglobulina donante de especificidad diferente en comparación con la de la inmunoglobulina original. En una realización preferida, se injerta una CDR de ratón en la región estructural de un anticuerpo humano, preparando el "anticuerpo humanizado".

Los "Fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fv, Fab, F(ab')₂, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

El término "Fab" designa un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, en que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y toda la cadena L, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, la papaína, están unidas entre sí a través de un enlace disulfuro.

El término "F(ab')₂" hace referencia a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente

100.000 y actividad de unión a antígeno, que es ligeramente mayor que el Fab unido a través de un enlace disulfuro de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, la pepsina.

El término "Fab" hace referencia a un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y actividad de unión a antígeno, que se obtiene cortando un puente disulfuro de la región de bisagra de F(ab')₂.

Un polipéptido Fv monocatenario ("scFv") es un heterodímero de VH::VL ligado covalentemente que se expresa habitualmente a partir de una fusión génica que incluye los genes que codifican VH y VL ligados por un ligador codificante de péptido. El fragmento de scFv humano de la invención incluye CDR que se mantienen en la conformación apropiada preferiblemente usando técnicas de recombinación génica.

"dsFv" es un heterodímero de VH::VL estabilizado por un enlace disulfuro. Pueden formarse fragmentos de anticuerpo divalentes y multivalentes espontáneamente mediante la asociación de scFv monovalentes, o pueden generarse acoplando scFv monovalentes con un ligador peptídico, tal como (scFv)₂ divalente.

El término "diacuerpos" hace referencia a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado con un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios de la misma cadena, se fuerza a los dominios a aparearse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno.

Métodos de pronóstico y usos según la invención

Se ha encontrado que, en CCR con MSI, están presentes la delección de nucleótidos en una repetición microsatelital de 17 timidinas localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 y una HSP110 mutada, y que la longitud de la delección influye en la expresión de la HSP110 mutada. Más precisamente, se ha encontrado que la delección de 3 timidinas se correlacionaba con una baja expresión de ARNm y proteína de HSP110 mutada y que la delección de 8 timidinas se correlaciona con una alta expresión de ARNm y proteína de HSP110 mutada. Se ha encontrado también que el nivel de expresión de la HSP110 mutada está correlacionado con el pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento. Además, se ha encontrado que la HSP110 mutada es capaz de formar un complejo con la HSP110 de tipo silvestre de manera dominante negativa, bloqueando por tanto su efecto antiapoptótico. Más específicamente, se ha encontrado que la proteína HSP110 mutada es capaz de formar un complejo con la proteína HSP110 de tipo silvestre de manera dominante negativa, bloqueando por tanto su efecto antiapoptótico. En consecuencia, las células tumorales que expresan un alto nivel de HSP110 mutada, y que son habitualmente tumores con fenotipo de MSI, son más sensibles a la apoptosis, principalmente a la apoptosis inducida por tratamiento quimioterapéutico.

Se ha encontrado también que la longitud de la repetición microsatelital de 17 timidinas localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 está correlacionada con el pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento. Se ha encontrado que los pacientes que padecen cáncer colorrectal en etapa III con fenotipo de MSI y que portan grandes delecciones tienen un buen pronóstico de supervivencia. Además, se ha encontrado que los pacientes que padecen cáncer colorrectal en etapa II o etapa III con fenotipo de MSI, tratados con quimioterapia y portadores de grandes delecciones, concretamente una delección de al menos 5 timidinas, en dicha repetición microsatelital, tienen también un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta a la quimioterapia.

Naturalmente, el tamaño de la delección puede determinarse determinando la longitud de la repetición de timidina de la repetición microsatelital de 17 timidinas, concretamente el número de timidinas en la repetición.

Como se usa en la presente memoria, determinar la longitud de la repetición de timidinas de dicha repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina es equivalente a determinar la longitud de la delección de timidinas en dicha repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina.

Por lo tanto, un aspecto de la invención está dirigido al uso de la repetición microsatelital de 17 timidinas localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 y/o la HSP110 mutada (concretamente, ARNm y/o proteína) y/o fragmentos como se describen aquí anteriormente, como biomarcador para el pronóstico de supervivencia y/o de la respuesta al tratamiento de un paciente que padece cáncer, en particular de un cáncer propenso a tener fenotipo de MSI. Una cantidad aumentada de HSP110 mutada (concretamente, ARNm y/o proteína) es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento. Las delecciones de timidinas pequeñas, concretamente 3 o 4 timidinas, son indicativas de un mal pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento, y las delecciones de timidinas grandes, concretamente de 5 a 8 timidinas, son indicativas de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

En algunas realizaciones, la invención está también dirigida al uso de la repetición microsatelital de 17 timidinas localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 y/o el ácido nucleico de HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente y/o de la proteína HSP110 y/o fragmentos de la misma como se describen aquí anteriormente, como biomarcador para el pronóstico de supervivencia y/o la respuesta al

tratamiento de un paciente que padece cáncer, en particular por un cáncer propenso a tener fenotipo de MSI.

En algunas realizaciones, las deleciones de timidinas pequeñas inferiores o iguales a 4 deleciones son indicativas de mal pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento, y las deleciones de timidinas grandes, concretamente superiores o iguales a 5 timidinas, son indicativas de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

Se entiende por "uso como biomarcador" un uso *in vitro*, en el que puede detectarse la HSP110 mutada, p.ej., usando ligandos, anticuerpos, sondas y/o cebadores, y en el que la longitud de la deleción de timidinas puede detectarse por genotipado o secuenciación. Por lo tanto, la invención está también dirigida al uso de medios para detectar la longitud de la deleción de timidinas de la repetición microsatelital y/o la HSP110 mutada en una muestra biológica de un paciente que padece un cáncer.

La presente invención está dirigida además a un método *in vitro* para el pronóstico de supervivencia y/o la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) medir el nivel de expresión de una proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente; y/o
- b) determinar la longitud de la repetición de timidinas de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de dicho paciente;
- c) y correlacionar el nivel de expresión medido en la etapa a) y/o la longitud de la repetición de timidina identificada en la etapa b) con el pronóstico de dicho paciente, deduciendo así el pronóstico de dicho paciente.

En algunas realizaciones, el método para pronosticar la supervivencia y/o la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer comprende las etapas de:

- a) medir la expresión de una proteína HSP110 mutada según la invención en una muestra biológica de dicho paciente; y/o
- b) medir la expresión de un ARNm de HSP110 mutada según la invención en una muestra biológica de dicho paciente; y/o
- c) determinar la longitud de la repetición de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de dicho paciente;
- d) y correlacionar el nivel de expresión medido en la etapa a) y/o b) y/o la longitud de la repetición de timidina identificada en la etapa c) con el pronóstico de dicho paciente, deduciendo así el pronóstico de dicho paciente.

Es más, como se demuestra en los ejemplos, el alto nivel de expresión de HSP110 mutada se correlaciona con un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

Además, como se demuestra en los ejemplos, las deleciones de timidina pequeñas en la repetición (concretamente, 3 o 4 timidinas o menos) son indicativas de mal pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento, y las deleciones de timidina grandes en la repetición (concretamente de 5 a 8 timidinas o más) son indicativas de buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento. Es decir, la deleción de al menos 5 timidinas en la repetición es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento. En algunas realizaciones, la deleción de al menos 5 timidinas en la repetición indica que el paciente tiene un bajo riesgo de recaída después del tratamiento en comparación con un paciente con deleciones de timidina pequeñas en la repetición, o que el paciente no recaerá después del tratamiento. En algunas realizaciones, la deleción de 5 timidinas o más en la repetición indica que el paciente es más probable que responda al tratamiento en comparación con un paciente con deleciones de timidina pequeñas en la repetición.

En una realización específica, el método según la invención comprende las etapas de:

- a) medir la expresión de una HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente;
- b) medir la expresión de HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra de control negativo;

en el que una expresión significativamente mayor de HSP110 mutada medida en la etapa a) en comparación con la expresión medida en la etapa b) es indicativa de buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

Se considera que es estadísticamente significativa la mayor expresión si el nivel de expresión de HSP110 mutada en la muestra biológica del paciente aumenta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o al menos un 30, 40, 50, 60, 70 o 75 % en comparación con el nivel de HSP110 mutada en la muestra de control negativo. En una realización preferida, se considera estadísticamente significativa la mayor expresión si el nivel de expresión de HSP110 mutada en la muestra biológica del paciente aumenta al menos un 75 %.

En otra realización específica, el método según la invención comprende las etapas de:

- a) medir la expresión de una HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente;
- b) medir la expresión de una HSP110 de tipo silvestre en dicha muestra biológica;
- c) comparar la expresión medida en la etapa (a) y (b), deduciendo así el pronóstico de dicho paciente.

Es más, cuando se expresa HSP110 mutada a niveles similares o superiores a HSP110 de tipo silvestre, el pronóstico será bueno. En particular, en el marco de esta realización, un nivel de expresión de HSP110 mutada superior o igual a un 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 100 % del nivel de expresión de HSP110 de tipo silvestre puede ser indicativo, por ejemplo, de buen pronóstico y/o de que el paciente es probable que responda al tratamiento.

La comparación de la expresión medida en las etapas a) y b) puede efectuarse calculando la relación de expresión, por ejemplo con la fórmula: relación= nivel de expresión de HSP110 mutada/nivel de expresión de HSP110 de tipo silvestre. Una relación de expresión superior o igual a 0,75 puede ser, por ejemplo, indicativa de un buen pronóstico y/o de que el paciente es probable que responda al tratamiento.

En aún otra realización específica, el método según la invención comprende las etapas de:

- a) medir la expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente;
- b) analizar la expresión obtenida en la etapa a) para generar una relación de expresión;
- c) medir la expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre como se describe aquí anteriormente en una muestra de control negativo;
- d) analizar la expresión obtenida en la etapa c) para generar una relación de expresión;

en el que una relación de expresión significativamente mayor generada en la etapa b) en comparación con la relación de expresión generada en la etapa d) indica que el paciente tiene un buen pronóstico de supervivencia y/o que el paciente es probable que responda al tratamiento.

Se considera que es estadísticamente significativo el mayor nivel de expresión si la relación generada en la etapa (b) aumenta al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces en comparación con la relación generada en la etapa (d). En una realización preferida, se considera que es estadísticamente significativa la relación si la relación de expresión en la muestra biológica del paciente aumenta al menos 7,5 veces.

Los métodos para medir el nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre son bien conocidos en la materia. El nivel de expresión puede medirse cuantificando ARNm o cuantificando proteínas. Los métodos adecuados incluyen, p.ej., inmunoquímica, ELISA, transferencia Western, citometría de flujo, transferencia Northern, PCR (p.ej., PCR-RT y PCR-QRT), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación mediada por transcripción (TMA), amplificación por desplazamiento de hebra (SDA), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

El sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) es una estrategia de amplificación en que se diseña un cebador de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de tal modo que sea capaz de discriminar entre moldes que difieren en un solo residuo nucleotídico. El ARMS se ha denominado también PCR específico de alelo o amplificación por PCR de alelos específicos (PASA). Por tanto, puede diseñarse un cebador de ARMS para amplificar un miembro específico de un sistema multialélico, permaneciendo refractario a la amplificación de otro alelo que puede diferir tan poco como una sola base del anterior. La ventaja principal del ARMS es que la etapa de amplificación y las etapas de diagnóstico se combinan, y que la presencia de un producto amplificado indica la presencia de un alelo particular y viceversa. Para diagnóstico rutinario, esta característica del ARMS significa que es un método muy rápido.

El análisis de fusión de alta resolución (HRM) es una potente técnica en biología molecular para la detección de mutaciones, polimorfismos y diferencias epigenéticas en muestras de ADN bicatenario. El análisis de HRM se efectúa en muestras de ADN bicatenario. Típicamente, se usará la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) antes del análisis de HRM para amplificar la región de ADN en que se encuentra la mutación de interés. Esencialmente, el

proceso de PCR transforma una mínima cantidad de la región de ADN de interés en una gran cantidad, de modo que las cantidades sean suficientemente grandes para un mejor análisis. En el tubo, hay ahora muchas copias de la región de ADN de interés. Esta región que se amplifica se conoce como amplicón. Después del proceso de PCR, empieza el análisis de HRM. El proceso es simplemente un calentamiento preciso del ADN de amplicón de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 95 °C. En cierto punto durante este proceso, se alcanza la temperatura de fusión del amplicón y se separan o “funden” separadamente las dos hebras de ADN. El secreto del HRM es monitorizar este proceso que sucede instantáneamente. Esto se consigue usando un tinte fluorescente. Los tintes que se usan para HRM son conocidos como tintes intercalantes y tienen una propiedad única. Se unen específicamente a ADN bicatenario y, cuando están unidos, fluorescen brillantemente. En ausencia de ADN bicatenario, no tienen nada donde unirse y solo fluorescen a bajo nivel. Al inicio del análisis de HRM, hay un alto nivel de fluorescencia en la muestra debido a los miles de millones de copias del amplicón. Pero a medida que se calienta la muestra y se funden separadamente las dos hebras de ADN, disminuye la presencia de ADN bicatenario y por tanto se reduce la fluorescencia. La máquina de HRM tiene una cámara que observa este proceso midiendo la fluorescencia. La máquina representa entonces simplemente estos datos como una gráfica conocida como curva de fusión, que muestra el nivel de fluorescencia frente a la temperatura. La temperatura de fusión del amplicón a la que se separan las dos hebras de ADN es enteramente predecible. Depende de la secuencia de las bases de ADN. Si se comparan dos muestras de dos personas diferentes, deberían dar exactamente la misma forma de curva de fusión. Sin embargo, si una de las personas tiene una mutación en la región de ADN amplificada, entonces esto alterará la temperatura a la que las hebras de ADN se funden separadamente. Así, ahora las dos curvas de fusión parecen diferentes. La diferencia puede ser mínima, quizás una fracción de grado, pero debido a que la máquina de HRM tiene la capacidad de monitorizar este proceso a “alta resolución”, es posible documentar exactamente estos cambios e identificar por lo tanto si está presente una mutación o no.

Los métodos anteriores permiten predecir la respuesta a cualquier tratamiento. En una realización específica, dicho tratamiento es un tratamiento con un agente alquilante tal como, p.ej., oxaliplatino, o un tratamiento con 5-fluorouracilo, o el tratamiento FOLFOX o el tratamiento FUFOL.

En una realización preferida, se efectúa la medida del nivel de expresión de HSP110 mutada por PCR-QRT usando un cebador de codificación, un cebador inverso y una sonda, que puede usarse para detectar la presencia de HSP110 mutada. En particular, el cebador de codificación puede tener la secuencia **5'-GCTACACGAATTCCAGCTGTGA-3' (SEQ ID NO: 4)**, el cebador inverso puede tener la secuencia **5'-GAGCAGCATGGTTTCGACTAAA-3' (SEQ ID NO: 5)** y la sonda fluorescente que hibrida específicamente con HSP110 mutada puede ser la sonda HSP110delE9 de secuencia **5'-ATGTGCATTACAGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 6)**.

En otra realización preferida, se efectúa la medida del nivel de expresión de HSP110 de tipo silvestre por PCR-QRT usando un cebador de codificación, un cebador inverso y una sonda, que puede usarse para detectar la presencia de HSP110 de tipo silvestre. En particular, el cebador de codificación puede tener la secuencia SEQ ID NO: 4, el cebador inverso puede tener la secuencia SEQ ID NO: 5 y la sonda fluorescente que hibrida específicamente con la HSP110 mutada puede ser la sonda HSP110wt de secuencia **5'-TACAGTGTGCAATACTT-3' (SEQ IDNO: 7)**.

Preferiblemente, las sondas están marcadas con al menos un marcaje o tinte fluorescente. El tinte fluorescente puede ser una amplia variedad de tintes conocidos en la materia, incluyendo 6-FAM™, VIC®, TET™, NED™, Cy3®, Cy5®, HEX, TAMRA, DABCYL, BHQ™, DDQ, etc.

Más preferiblemente, las sondas se marcan con un tinte indicador y un tinte apagador. Aún más preferiblemente, las sondas se marcan en su extremo 5' con el tinte indicador y en su extremo 3' con el tinte apagador. El tinte indicador puede ser un tinte fluorescente que puede ser, por ejemplo, 6-FAM™, VIC®, TET™, NED™, Cy3®, Cy5®, HEX, etc. El tinte apagador puede ser un tinte no fluorescente (p.ej. MGB™) o un tinte fluorescente, que puede ser por ejemplo TAMRA, DABCYL, BHQ™, DDQ, etc.

En una realización más preferida, la sonda HSP110delE9 está marcada con el tinte indicador VIC™ en su extremo 5' y con el tinte apagador TAMRA en su extremo 3', y la sonda HSP110wt está marcada con el tinte indicador 6-FAM™ en su extremo 5' y con el tinte apagador TAMRA en su extremo 3'.

En una realización preferida, la PCR-QTR comprende una etapa de desnaturalización inicial seguida de ciclos de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento.

La etapa de desnaturalización inicial puede efectuarse en condiciones de calentamiento que oscilan de 90 a 105 °C, durante 15 s a 15 min. Preferiblemente, las condiciones de calentamiento oscilan de 92 a 102 °C, más preferiblemente de 95 a 100 °C, aún más preferiblemente las condiciones de calentamiento son de 95 °C. Preferiblemente, la etapa de desnaturalización inicial se efectúa durante 1 min a 15 min, más preferiblemente durante 8 min a 12 min, aún más preferiblemente durante 5 min a 10 min, y aún más preferiblemente la etapa de desnaturalización inicial se efectúa durante 10 min.

En una realización preferida, la etapa de desnaturalización inicial se efectúa a 95 °C durante 10 min.

Cada ciclo de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento incluye una etapa de desnaturalización en condiciones de calentamiento, seguida de una fase de reasociación efectuada en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores y la sonda con la secuencia para amplificar, y una fase de alargamiento efectuada en condiciones que permitan a la polimerasa sintetizar un producto de extensión de cada cebador que se reasocie con la secuencia para amplificar.

La fase de desnaturalización puede efectuarse a entre 90 a 105 °C, preferiblemente 92 y 100 °C, más preferiblemente entre 94 y 98 °C, durante 10 s a 4 min, preferiblemente durante 10 s a 20 min, más preferiblemente durante 15 s a 1 min.

La fase de reasociación puede efectuarse a entre 35 y 70 °C, preferiblemente entre 40 y 65 °C, más preferiblemente entre 45 y 60 °C, aún más preferiblemente entre 50 y 60 °C, durante 10 s a 2 min, preferiblemente durante 2 s a 1,5 min, más preferiblemente durante 30 s a 1 min.

La fase de alargamiento puede efectuarse a entre 40 y 80 °C, preferiblemente entre 50 y 75 °C, más preferiblemente entre 55 y 65 °C, aún más preferiblemente entre 58 y 62 °C, durante 10 s a 5 min, preferiblemente durante 20 s a 3 min, más preferiblemente durante 30 s a 10 min, aún más preferiblemente durante 30 s a 45 s.

En una realización preferida, la fase de desnaturalización se efectúa a 95 °C durante 15 s, la fase de reasociación y la fase de alargamiento se combinan y se efectúan a 60 °C durante 1 min. La etapa de desnaturalización-reasociación-alargamiento puede repetirse durante 30 a 60 ciclos, preferiblemente durante 35 a 50 ciclos, más preferiblemente durante 40 a 45 ciclos. Aún más preferiblemente, la etapa de desnaturalización-reasociación-alargamiento se repite durante 40 ciclos.

Como alternativa, la medida de la expresión de HSP110 mutada puede efectuarse mediante transferencia Western o inmunohistoquímica.

Como se usa en la presente memoria, transferencia Western hace referencia al análisis de proteína o proteínas (o polipéptidos) inmovilizados sobre un soporte tal como nitrocelulosa o una membrana. Se separa en primer lugar una mezcla que comprende al menos una proteína en un gel de acrilamida, y se transfieren entonces las proteínas separadas del gel a un soporte sólido, tal como nitrocelulosa o una membrana de nailon. Se exponen las proteínas inmovilizadas a al menos un anticuerpo con reactividad frente a al menos un antígeno de interés. Los anticuerpos unidos pueden detectarse mediante diversos métodos, incluyendo el uso de anticuerpos radiomarcados. Preferiblemente, el anticuerpo usado para detectar HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre puede reconocer la parte N-terminal de las proteínas. Por ejemplo, dicho anticuerpo puede ser el anticuerpo policlonal de conejo ab24503 de Abcam®. La HSP110 de tipo silvestre puede reconocerse también usando el anticuerpo policlonal de conejo SPA-11101 de Stressgen®.

Preferiblemente, la medida del nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre en los métodos según la invención se efectúa usando la misma técnica. Por ejemplo, si la medida del nivel de expresión de HSP110 mutada se efectúa por PCR-QRT, la medida del nivel de expresión de HSP110 de tipo silvestre se efectúa por PCR-QRT.

Más preferiblemente, la medida del nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre se efectúa de manera competitiva, concretamente, la medida de nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre se efectúa simultáneamente en la misma muestra biológica. En particular, la medida del nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre se efectúa por PCR-QRT de manera competitiva usando cebadores de codificación e inverso como se describen anteriormente que sean capaces de hibridar con HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre y dos sondas, siendo capaces cada una de ellas de hibridar específicamente con HSP110 mutada o con HSP110 de tipo silvestre como se describe anteriormente. En una realización preferida, la PCR-QRT comprende una etapa de desnaturalización inicial seguida de ciclos de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento como se describe anteriormente.

En otra realización preferida, la medida de la expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre puede efectuarse a nivel de proteína.

La relación de expresión puede calcularse usando cualquier método bien conocido en la materia. Preferiblemente, la relación de expresión se obtiene como sigue:

- midiendo la expresión de HSP110 mutada como se describe anteriormente mediante PCR-QRT en una muestra biológica de dicho paciente, para obtener el valor de Ct;
- midiendo la expresión de HSP110 de tipo silvestre como se describe anteriormente mediante PCR-QRT en una muestra biológica de dicho paciente, para obtener el valor de Ct;
- calculando la relación de expresión (E) usando la fórmula $E = 2^{-(Ct \text{ de HSP110 de tipo silvestre} - Ct \text{ de HSP110 mutada})}$

Como se usa en la presente memoria, la muestra biológica puede consistir en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de heces o una biopsia de un cáncer. Preferiblemente, la muestra biológica puede consistir en una biopsia de un adenoma o un cáncer primario. Aún más preferiblemente, la muestra biológica puede consistir en una biopsia de un adenoma o un cáncer primario seleccionado del grupo consistente en

5 cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma. Preferiblemente, la muestra biológica es una biopsia de un cáncer colorrectal.

Cuando se usa una muestra de control negativo, la muestra de control negativo puede corresponder, p.ej., a una muestra de tejido de un individuo sano o con MSS (preferiblemente del mismo tejido que las células cancerosas), a una muestra de tejido sano del paciente (p.ej. tejido sano que rodea al tejido canceroso) o a una muestra que comprende una cantidad de HSP110 mutada y/o de tipo silvestre que es indicativa del nivel de expresión de HSP110 mutada y/o de tipo silvestre en un individuo sano o con MSS. En una realización específica, la muestra de control negativo es el mismo tipo de muestra que la muestra biológica del paciente. Por ejemplo, si la muestra biológica del paciente es sangre, la muestra de control negativo es sangre. En otro ejemplo, si la muestra biológica del paciente es una biopsia de un cáncer colorrectal, la muestra de control negativo es una biopsia de un cáncer colorrectal con fenotipo de estabilidad microsatelital (MSS).

10 Cuando se usa una muestra de control negativo, la muestra de control negativo puede corresponder, p.ej., a una muestra de tejido de un individuo sano o con MSS (preferiblemente del mismo tejido que las células cancerosas), a una muestra de tejido sano del paciente (p.ej. tejido sano que rodea al tejido canceroso) o a una muestra que comprende una cantidad de HSP110 mutada y/o de tipo silvestre que es indicativa del nivel de expresión de HSP110 mutada y/o de tipo silvestre en un individuo sano o con MSS. En una realización específica, la muestra de control negativo es el mismo tipo de muestra que la muestra biológica del paciente. Por ejemplo, si la muestra biológica del paciente es sangre, la muestra de control negativo es sangre. En otro ejemplo, si la muestra biológica del paciente es una biopsia de un cáncer colorrectal, la muestra de control negativo es una biopsia de un cáncer colorrectal con fenotipo de estabilidad microsatelital (MSS).

En algunas realizaciones, el método según la invención comprende las etapas de determinar la longitud de la repetición de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de dicho paciente, en el que la identificación de una delección de 5 timidinas o más en la repetición es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

20 En algunas realizaciones, el método según la invención comprende las etapas de determinar la longitud de la repetición de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de dicho paciente, en el que la identificación de una delección de 5 timidinas o más en la repetición es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

La determinación de la longitud de dicha repetición de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, puede efectuarse mediante genotipado. El genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado como se describe en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1 o como se describe en el párrafo "Método de diagnóstico según la invención" de la descripción. El genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse amplificando dicha repetición microsatelital y aislando los productos de amplificación por electroforesis capilar. La amplificación de dicha repetición microsatelital puede efectuarse usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales como se describe en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1. Los métodos adecuados pueden incluir también el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

25 La determinación de la longitud de dicha repetición de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado como se describe en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1 o como se describe en el párrafo "Método de diagnóstico según la invención" de la descripción. El genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse amplificando dicha repetición microsatelital y aislando los productos de amplificación por electroforesis capilar. La amplificación de dicha repetición microsatelital puede efectuarse usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales como se describe en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1. Los métodos adecuados pueden incluir también el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

En algunas realizaciones, dicho paciente es un paciente que padece un cáncer colorrectal en etapa II o etapa III con fenotipo de MSI, y preferiblemente que padece un cáncer colorrectal en etapa III con fenotipo de MSI. En algunas realizaciones, dicho paciente es un paciente que ha recibido tratamiento quimioterapéutico, tal como un tratamiento quimioterapéutico complementario. En una realización preferida, dicho paciente es un paciente que padece un cáncer colorrectal en etapa II o etapa III con fenotipo de MSI que ha recibido un tratamiento quimioterapéutico complementario.

35 En algunas realizaciones, dicho paciente es un paciente que padece un cáncer colorrectal en etapa II o etapa III con fenotipo de MSI, y preferiblemente que padece un cáncer colorrectal en etapa III con fenotipo de MSI. En algunas realizaciones, dicho paciente es un paciente que ha recibido tratamiento quimioterapéutico, tal como un tratamiento quimioterapéutico complementario. En una realización preferida, dicho paciente es un paciente que padece un cáncer colorrectal en etapa II o etapa III con fenotipo de MSI que ha recibido un tratamiento quimioterapéutico complementario.

40 **Métodos de diagnóstico según la invención**

Los inventores han encontrado sorprendentemente que una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen *HSPH1* (NCBI Gene 10: 10808) que codifica la proteína HSP110 estaba casi siempre mutada en estirpes celulares de CCR con MSI y tumores primarios. Además, dicha repetición microsatelital está también frecuentemente mutada en adenoma con MSI. Por tanto, dicho análisis de repetición microsatelital puede usarse para diagnosticar el fenotipo de MSI en adenoma y tumores primarios de etapa muy temprana cuando los métodos de diagnóstico son ineficaces.

Por tanto, la invención proporciona también un método *in vitro* para diagnosticar el fenotipo de inestabilidad microsatelital (MSI) de un tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- a) genotipar la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de un paciente probablemente afectado por un cáncer con fenotipo de MSI;
- b) detectar la presencia o ausencia de inestabilidad en dicha repetición microsatelital,

en el que la detección de inestabilidad en dicha repetición microsatelital de la muestra biológica del paciente indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

Como se usa en la presente memoria, la muestra biológica puede ser células cultivadas o células inmortalizadas cultivadas y/o una biopsia de un adenoma o tumor primario seleccionado del grupo consistente en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario,

cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma. Preferiblemente, la muestra biológica es una biopsia de cáncer colorrectal.

El genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse amplificando dicha repetición microsatelital y aislando los productos de amplificación por electroforesis capilar. La amplificación de dicha repetición microsatelital puede efectuarse usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales como se describen en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1. Los métodos adecuados incluyen también el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

En una realización preferida, el cebador de codificación y el cebador inverso para el genotipado de la repetición microsatelital tienen respectivamente las secuencias

5'-CCCTGTCCATCCATTGGAATTGA-3' (SEQ ID NO: 10) y

5'-GGAAGTGCATCTGTGACGGAA-3' (SEQ ID NO: 11).

En una realización preferida, la amplificación de los marcadores microsatelitales comprende una etapa de desnaturalización inicial seguida de ciclos de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento y una etapa de alargamiento final.

La etapa de desnaturalización inicial puede efectuarse en condiciones de calentamiento que oscilan de 90 a 105 °C, durante 15 s a 5 min. Preferiblemente, las condiciones de calentamiento oscilan de 92 a 102 °C, más preferiblemente las condiciones de calentamiento son de 94 °C. Preferiblemente, la etapa de desnaturalización inicial se efectúa durante 20 s a 2 min, más preferiblemente durante 25 s a 1 min, y aún más preferiblemente la etapa de desnaturalización inicial se efectúa durante 30 s.

En una realización preferida, la etapa de desnaturalización inicial se efectúa a 94 °C durante 30 s.

Cada ciclo de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento incluye una fase de desnaturalización en condiciones de calentamiento, seguida de una fase de reasociación efectuada en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores con la secuencia para amplificar, y una fase de alargamiento efectuada en condiciones que permitan a la polimerasa sintetizar un producto de extensión a partir de cada cebador que se reasocia con la secuencia para amplificar.

La fase de desnaturalización puede efectuarse a entre 90 y 105 °C, preferiblemente de 92 a 100 °C, más preferiblemente entre 94 y 98 °C, durante 10 s a 4 min, preferiblemente durante 10 s a 2 min, más preferiblemente durante 15 s a 1 min.

La fase de reasociación puede efectuarse a entre 35 y 70 °C, preferiblemente entre 40 y 65 °C, más preferiblemente entre 45 y 60 °C, aún más preferiblemente entre 50 y 60 °C, durante 10 s a 20 min, preferiblemente durante 20 s a 1,5 min, más preferiblemente durante 25 s a 45 s.

La fase de alargamiento puede efectuarse a entre 40 y 80 °C, preferiblemente entre 50 y 75 °C, más preferiblemente entre 60 y 72 °C, durante 10 s a 5 min, preferiblemente durante 20 s a 3 min, más preferiblemente durante 40 s a 20 min, aún más preferiblemente durante 30 s a 1 min.

En una realización preferida, la fase de desnaturalización se efectúa a 94 °C durante 30 s, la fase de reasociación se efectúa a 57 °C durante 30 s y la fase de alargamiento se efectúa a 72 °C durante 1 min. Las etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento pueden repetirse durante 30 a 60 ciclos, preferiblemente durante 32 a 45 ciclos, más preferiblemente durante 35 a 42 ciclos. Aún más preferiblemente, las etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento se repiten durante 40 ciclos.

La etapa de alargamiento final puede efectuarse a entre 40 y 80 °C, preferiblemente a entre 50 y 75 °C, más preferiblemente a entre 60 y 72 °C, durante 1 min a 10 min, preferiblemente durante 3 min a 8 min, y más preferiblemente durante 5 min a 7 min.

En una realización preferida, la etapa de alargamiento final se efectúa a 72 °C durante 7 min.

Se entiende por "inestabilidad" una delección o adición del patrón repetido de nucleótidos de timidina.

En una realización particular, está presente inestabilidad cuando se detecta una delección o adición de al menos un nucleótido en dicha muestra biológica. Preferiblemente, está presente inestabilidad cuando se detecta una delección de al menos 3 nucleótidos de timidina en dicha muestra biológica. Más preferiblemente, está presente inestabilidad cuando se detecta una delección de 3 a 8 nucleótidos de timidina en dicha muestra biológica.

La invención proporciona también un método *in vitro* para diagnosticar el fenotipo de inestabilidad microsatelital

(MSI) de un tumor, comprendiendo dicho método las etapas de:

- 5 a) detectar la presencia o ausencia de inestabilidad en la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de un paciente que está probablemente afectado por un cáncer con fenotipo de MSI;
- b) detectar la presencia o ausencia de inestabilidad en al menos un microsatélite seleccionado del grupo consistente en los microsatélites BAT26, NR21, NR27, NR24 y BAT25 en una muestra biológica de un paciente que está probablemente afectado por un cáncer con fenotipo de MSI;

10 en el que la detección de inestabilidad de dicha repetición microsatelital en la etapa a) y la detección de inestabilidad en al menos una repetición microsatelital en la etapa b) en la muestra biológica del paciente indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

15 La muestra biológica puede ser células cultivadas o células inmortalizadas cultivadas y/o una biopsia de un adenoma o tumor primario seleccionado del grupo consistente en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma. Preferiblemente, la muestra biológica es una biopsia de cáncer colorrectal.

20 En algunas realizaciones, la detección de la inestabilidad en la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 y en al menos 2, 3, 4 o 5 repeticiones microsatelitales seleccionadas del grupo consistente en las repeticiones microsatelitales BAT26, NR21, NR27, NR24 y BAT25, indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

Preferiblemente, la detección de inestabilidad en la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 y en las cinco repeticiones microsatelitales BAT26, NR21, NR27, NR24 y BAT25 indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

25 El marcador microsatelital BAT26 es una repetición de 26 A localizada en el intrón 5 del gen *hMSH2*, y se encuentra por ejemplo entre las posiciones 16298 y 16323 de la secuencia de referencia del NCBI NG_0007110.1. Más preferiblemente, el marcador microsatelital BAT26 tiene un patrón repetido comprendido entre 20 A y 26 A.

El marcador microsatelital NR21 es una repetición de 21 T localizada en la región 5' no traducida del gen *SLC7A8*, y se encuentra por ejemplo entre las posiciones 483 y 503 de la secuencia de referencia del NCBI NM_012244.2. Más preferiblemente, el marcador microsatelital NR21 consiste en un patrón repetido comprendido entre 16 T y 21 T.

30 El marcador microsatelital NR27 es una repetición de 26 A localizada en la región 5' no traducida del gen *BIRC3*, y se encuentra por ejemplo entre las posiciones 1031 y 1056 de la secuencia de referencia del NCBI NM_001165.3. Más preferiblemente, el marcador microsatelital NR27 consiste en un patrón repetido comprendido entre 23 A y 26 A.

35 El marcador microsatelital NR24 es una repetición de 23 T localizada en la región 3' no traducida del gen *ZNF2*, y se encuentra por ejemplo entre las posiciones 3248 y 3270 de la secuencia de referencia del NCBI NM_021088.2. Más preferiblemente, el marcador microsatelital NR24 consiste en un patrón repetido comprendido entre 18 T y 23 T.

El marcador microsatelital BAT25 es una repetición de 25 T localizada en el intrón 16 del gen *c-KIT*, y se encuentra por ejemplo entre las posiciones 74118 y 74142 de la secuencia de referencia del NCBI NG_007456.1. Más preferiblemente, el marcador microsatelital BAT25 consiste en un patrón repetido comprendido entre 19 T y 25 T.

40 Según la presente invención, la detección en la etapa a) y b) de la presencia o ausencia de inestabilidad puede efectuarse mediante cualquier método bien conocido en la materia. Por ejemplo, la detección de la presencia o ausencia de inestabilidad se efectúa secuenciando o genotipando. Los métodos adecuados pueden incluir el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión a alta resolución (PCR-HRM).

45 El genotipado puede efectuarse amplificando los microsatélites y aislando los productos de amplificación mediante electroforesis capilar. La amplificación de los microsatélites puede efectuarse usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales y, más preferiblemente, la amplificación de microsatélites se efectúa mediante PCR múltiple. Los métodos adecuados pueden incluir también el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

50 En una realización preferida, la amplificación de dicha repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 puede efectuarse como se describe aquí anteriormente.

En una realización preferida, la amplificación de dicho al menos un microsatélite seleccionado del grupo consistente en las repeticiones microsatelitales BAT26, NR21, NR27, NR24 y BAT25 comprende una etapa de desnaturalización inicial seguida de ciclos de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento y una etapa de extensión final.

La etapa de desnaturalización inicial puede efectuarse en condiciones de calentamiento que oscilan de 90 a 105 °C durante 15 s a 15 min. Preferiblemente, las condiciones de calentamiento oscilan de 92 a 102 °C, más preferiblemente de 95 a 100 °C, aún más preferiblemente las condiciones de calentamiento son de 95 °C. Preferiblemente, la etapa de desnaturalización inicial se efectúa durante 1 min a 15 min, más preferiblemente durante 2 min a 12 min, aún más preferiblemente durante 5 min a 10 min, y aún más preferiblemente la etapa de desnaturalización inicial se efectúa durante 5 min.

En una realización preferida, la etapa de desnaturalización inicial se efectúa a 95 °C durante 5 min.

Cada ciclo de etapas de desnaturalización-reasociación-alargamiento incluye una fase de desnaturalización en condiciones de calentamiento, seguido de una fase de reasociación efectuada en condiciones que permitan la hibridación de los cebadores con la secuencia para amplificar, y una fase de alargamiento efectuada en condiciones que permitan que la polimerasa sintetice un producto de extensión a partir de cada cebador que se reasocia con la secuencia para amplificar.

La fase de desnaturalización puede efectuarse a entre 90 y 105 °C, preferiblemente de 92 a 100 °C, más preferiblemente entre 94 y 98 °C, durante 10 s a 4 min, preferiblemente durante 10 s a 2 min, más preferiblemente durante 15 s a 1 min.

La fase de reasociación puede efectuarse a entre 35 y 70 °C, preferiblemente entre 40 y 65 °C, más preferiblemente entre 45 y 60 °C, aún más preferiblemente entre 50 y 60 °C, durante 10 s a 2 min, preferiblemente durante 20 s a 1,5 min, más preferiblemente durante 25 s a 45 s.

La fase de alargamiento puede efectuarse a entre 40 y 60 °C, preferiblemente entre 50 y 75 °C, más preferiblemente entre 60 y 72 °C, durante 10 s a 5 min, preferiblemente durante 20 s a 3 min, más preferiblemente durante 25 s a 1 min, aún más preferiblemente durante 30 s a 45 s.

En una realización preferida, la fase de desnaturalización se efectúa a 95 °C durante 30 s, la fase de reasociación se efectúa a 55 °C durante 30 s y la fase de alargamiento se efectúa a 72 °C durante 30 s. La etapa de desnaturalización-reasociación-alargamiento puede repetirse durante 30 a 60 ciclos, preferiblemente durante 32 a 40 ciclos, más preferiblemente durante 35 a 40 ciclos. Aún más preferiblemente, la etapa de desnaturalización-reasociación-alargamiento se repite durante 35 ciclos.

La etapa de extensión final puede efectuarse a entre 40 y 80 °C, preferiblemente a entre 50 y 75 °C, más preferiblemente a entre 60 y 72 °C, durante 1 min a 10 min, preferiblemente durante 3 min a 8 min, más preferiblemente durante 4 min a 6 min.

En una realización preferida, la etapa de extensión final se efectúa a 72 °C durante 5 min.

La amplificación del marcador microsatelital BAT26 puede efectuarse usando el cebador de codificación que tiene la secuencia **5'-CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG-3'** (SEQ ID NO: 14) y el cebador inverso que tiene la secuencia **5'-AACCATTCAACATTTTAAACC-3'** (SEQ ID NO: 15).

La amplificación del marcador microsatelital NR21 puede efectuarse usando el cebador de codificación que tiene la secuencia **5'-GAGTCGCTGGCACAGTTCTA-3'** (SEQ ID NO: 16) y el cebador inverso que tiene la secuencia **5'-CTGGTCACTCGCGTTTACAA-3'** (SEQ ID NO: 17).

La amplificación del marcador microsatelital NR27 puede efectuarse usando el cebador de codificación que tiene la secuencia **5'-AACCATGCTTGCAAACCACT-3'** (SEQ ID NO: 18) y el cebador inverso que tiene la secuencia **5'-CGATAATACTAGCAATGACC-3'** (SEQ ID NO: 19).

La amplificación del marcador microsatelital NR24 puede efectuarse usando el cebador de codificación que tiene la secuencia **5'-GCTGAATTTTACCTCCTGAC-3'** (SEQ ID NO: 20) y el cebador inverso que tiene la secuencia **5'-ATTGTGCCATTGCATTCCAA-3'** (SEQ ID NO: 21).

La amplificación del marcador microsatelital BAT25 puede efectuarse usando el cebador de codificación que tiene la secuencia **5'-TACCAGGTGGCAAAGGGCA-3'** (SEQ ID NO: 22) y el cebador inverso que tiene la secuencia **5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'** (SEQ ID NO: 23).

Se entiende por "inestabilidad en una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110" una delección o adición del patrón repetido de nucleótidos de timidina. Como se describe en la presente memoria, puede considerarse que está presente

inestabilidad cuando se detecta una delección de al menos 3 nucleótidos de timidina en dicha muestra biológica. Como se describe en la presente memoria, puede considerarse que está presente inestabilidad cuando se detecta una delección de 3 a 8 nucleótidos de timidina o más en dicha muestra biológica.

5 Se entiende por "inestabilidad en al menos un marcador microsatelital seleccionado del grupo consistente en las repeticiones microsatelitales BAT26, NR21, NR27, NR24 y BAT25" una delección o adición del patrón repetido de mononucleótidos, dinucleótidos o trinucleótidos.

En una realización ejemplar, se considera que está presente inestabilidad en el microsatélite BAT26 cuando el microsatélite BAT26 consiste en un patrón repetido de más de 26 A o menos de 20 A.

10 En una realización ejemplar, se considera que está presente inestabilidad en el microsatélite NR21 cuando el microsatélite NR21 consiste en un patrón repetido de más de 21 T o menos de 16 T.

En una realización ejemplar, se considera que está presente inestabilidad en el microsatélite NR27 cuando el microsatélite NR27 consiste en un patrón repetido de más de 26 A o menos de 23 A.

En una realización ejemplar, se considera que está presente inestabilidad en el marcador microsatelital NR24 cuando el microsatélite NR24 consiste en un patrón repetido de más de 23 T o menos de 18 T.

15 En una realización ejemplar, se considera que está presente inestabilidad en el marcador microsatelital BAT25 cuando el microsatélite BAT25 consiste en un patrón repetido de más de 25 T o menos de 19 T.

Preferiblemente, se considera que está presente inestabilidad cuando se detecta una delección o adición en un alelo, y más preferiblemente en dos alelos.

20 En una realización particular, el método comprende además la comparación en la etapa a) y b) con una muestra de control. Cuando se usa una muestra de control negativo, la muestra de control negativo puede corresponder, p.ej., a una muestra de tejido de un individuo sano o con MSS (preferiblemente del mismo tejido que las células cancerosas) o a una muestra de tejido sano del paciente (p.ej. tejido sano que rodea al tejido canceroso). En una realización específica, la muestra de control negativo es el mismo tipo de muestra que la muestra biológica del paciente. Por ejemplo, si la muestra biológica del paciente es sangre, la muestra de control negativo es sangre. En otro ejemplo, si la muestra biológica del paciente es una biopsia de un cáncer colorrectal, la muestra de control negativo es una biopsia de un cáncer colorrectal con fenotipo de estabilidad microsatelital (MSS).

25 La presente invención está también dirigida a un método *in vitro* para diagnosticar el fenotipo de inestabilidad microsatelital (MSI) de un tumor, comprendiendo dicho método la etapa de detectar la presencia o ausencia de una proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente, en el que la detección de la presencia de dicha HSP110 mutada en la muestra biológica del paciente indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

En algunas realizaciones, dicho método comprende las etapas de:

- a) medir la expresión de una proteína HSP110 mutada según la invención en una muestra biológica de dicho paciente; y/o
- 35 b) medir la expresión de un ARNm de HSP110 mutada según la invención en una muestra biológica de dicho paciente,

en el que la detección de la presencia de dicha proteína y/o ARNm de HSP110 mutada en la muestra biológica del paciente indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

En una realización específica, el método según la invención comprende las etapas de:

- 40 a) medir la expresión de una HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente;
- b) medir la expresión de una HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra de control negativo;

45 en el que la expresión significativamente mayor de HSP110 mutada medida en la etapa a) en comparación con la expresión medida en la etapa b) es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.

En las etapas a) y b), puede efectuarse la medida de la expresión de HSP110 mutada midiendo la proteína HSP110 mutada y/o el ARNm de HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente.

50 Se considera estadísticamente significativa la mayor expresión si el nivel de expresión de HSP110 mutada en la muestra biológica del paciente aumenta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o al menos un 30, 40, 50, 60, 70 o 75 % en

comparación con el nivel de HSP110 mutada en la muestra de control negativo. En una realización preferida, se considera estadísticamente significativa la mayor expresión si el nivel de expresión de HSP110 mutada en la muestra biológica del paciente aumenta al menos un 75 %.

En otra realización específica, el método según la invención comprende las etapas de:

- 5 a) medir la expresión de HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente;
- b) medir la expresión de HSP110 de tipo silvestre en dicha muestra biológica;
- c) comparar la expresión medida en la etapa (a) y (b), deduciendo así el diagnóstico de fenotipo de MSI.

10 En la etapa a), la medida de la expresión de HSP110 mutada puede efectuarse midiendo la proteína HSP110 mutada y/o el ARNm de HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente.

En la etapa b), la medida de la expresión de HSP110 de tipo silvestre puede efectuarse midiendo la proteína HSP110 de tipo silvestre y/o el ARNm de HSP110 de tipo silvestre como se describe aquí anteriormente.

15 Es más, un nivel de expresión de HSP110 mutada mayor o igual al 50, 60, 70, 75, 80, 90 o 100 % del nivel de expresión de HSP110 de tipo silvestre indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

La comparación de la expresión medida en las etapas a) y b) puede efectuarse calculando una relación de expresión, por ejemplo con la fórmula: relación= nivel de expresión de HSP110 mutada/nivel de expresión de HSP110 de tipo silvestre. Un nivel de expresión mayor o igual a 0,75 puede indicar, por ejemplo, que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

20 En aún otra realización específica, el método según la invención comprende las etapas de:

- a) medir la expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre como se describe aquí anteriormente en una muestra biológica de dicho paciente;
- b) analizar la expresión obtenida en la etapa a), generando una relación de expresión;
- 25 c) medir la expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre como se describe aquí anteriormente en una muestra de control negativo;
- d) analizar la expresión obtenida en la etapa c), generando una relación de expresión;

en el que una relación de expresión significativamente mayor generada en la etapa b) en comparación con la relación de expresión generada en la etapa d) indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

30 En las etapas a) y c), la medida de la expresión de una HSP110 mutada puede efectuarse midiendo la proteína HSP110 mutada y/o el ARNm de HSP110 mutada como se describe aquí anteriormente, y la medida de la expresión de HSP110 de tipo silvestre puede efectuarse midiendo la proteína HSP110 de tipo silvestre y/o el ARNm de HSP110 de tipo silvestre como se describe aquí anteriormente.

35 Se considera estadísticamente significativa la mayor relación de expresión si la relación generada en la etapa (b) aumenta al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces en comparación con la relación generada en la etapa (d). En una realización preferida, se considera estadísticamente significativa la relación si la relación de expresión en la muestra biológica del paciente aumenta al menos 7,5 veces.

40 Los métodos para medir el nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre son bien conocidos en la materia. El nivel de expresión puede medirse cuantificando ARNm o cuantificando proteínas. Los métodos adecuados incluyen, p.ej., inmunoquímica, ELISA, transferencia Western, citometría de flujo, transferencia Northern, PCR (p.ej., PCR-RT y PCR-QTR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación medida por transcripción (TMA), amplificación de desplazamiento de hebra (SDA) y amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA). Los métodos adecuados pueden incluir también el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

45 En algunas realizaciones, se efectúa la medida del nivel de expresión de HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre usando el método descrito aquí anteriormente en el capítulo "Métodos de pronóstico y usos según la invención".

50 Como se usa en la presente memoria, la muestra biológica puede consistir en una muestra de sangre, una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de heces o una biopsia de un cáncer. Preferiblemente, la muestra biológica puede consistir en una biopsia de un adenoma o cáncer primario. Aún más preferiblemente, la muestra biológica puede consistir en una biopsia de un adenoma o cáncer primario seleccionado del grupo consistente en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de

ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma. Preferiblemente, la muestra biológica es una biopsia de cáncer colorrectal.

Cuando se usa una muestra de control negativo, la muestra de control negativo puede corresponder, p.ej., a una muestra de tejido de un individuo sano o con MSS (preferiblemente de mismo tejido que las células cancerosas), a una muestra de tejido sano del paciente (p.ej., tejido sano que rodea el tejido canceroso) o a una muestra que comprende una cantidad de HSP110 mutada y/o de tipo silvestre que es indicativa del nivel de expresión de HSP110 mutada y/o de tipo silvestre en un individuo sano o con MSS. En una realización específica, la muestra de control negativo es el mismo tipo de muestra que la muestra biológica del paciente. Por ejemplo, si la muestra biológica del paciente es sangre, la muestra de control negativo es sangre. En otro ejemplo, si la muestra biológica del paciente es una biopsia de cáncer colorrectal, la muestra de control negativo es una biopsia de cáncer colorrectal con fenotipo de estabilidad microsatelital (MSS).

Métodos para la determinación de un régimen terapéutico adecuado

Los métodos anteriores pueden usarse para determinar y/o seleccionar el régimen terapéutico adecuado para tratar un sujeto que padece un cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI.

Por tanto, la invención se refiere también a un método para determinar un régimen terapéutico adecuado para tratar un paciente que padece un cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI, en el que dicho método comprende las etapas de:

- a) determinar la longitud de la repetición de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de dicho paciente, y
- b) deducir y/o seleccionar un régimen terapéutico adecuado para el sujeto basándose en la longitud de dicha repetición de timidina.

La invención atañe también al uso de la repetición microsatelital de 17 timidinas, localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110, como biomarcador para determinar un régimen terapéutico adecuado.

En algunas realizaciones, dicho cáncer propenso a tener fenotipo de MSI puede ser un cáncer colorrectal, preferiblemente un cáncer colorrectal en etapa II o etapa III.

Un "régimen terapéutico adecuado" puede hacer referencia a cirugía, quimioterapia y/o radioterapia adecuadas para tratar un sujeto que padece un cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI.

Las deleciones de timidina pequeñas, concretamente de 3 o 4 timidinas o menos, indican que un régimen terapéutico adecuado puede ser un tratamiento quimioterapéutico que combina al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o como máximo 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 agentes tales como, p.ej., una combinación de oxaliplatino, 5-fluorouracilo y ácido folínico, concretamente el tratamiento FOLFOX o una combinación de 5-fluorouracilo y ácido folínico, concretamente el tratamiento FUFOL o LV5FU2.

Las deleciones de timidina grandes, concretamente de 5 a 8 timidinas o más, indican que un régimen terapéutico adecuado puede ser un tratamiento quimioterapéutico con un solo agente tal como 5-fluorouracilo.

La determinación de la longitud de dicha repetición de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, puede efectuarse mediante genotipado. El genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado como se describe en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1 o como se describe en el párrafo "Método de diagnóstico según la invención" de la descripción. El genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse mediante métodos conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, el genotipado de la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina puede efectuarse amplificando dicha repetición microsatelital y aislando los productos de amplificación por electroforesis capilar. La amplificación de dicha repetición microsatelital puede efectuarse usando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencionales como se describen en el párrafo "Análisis de mutación" del Ejemplo 1. Los métodos adecuados pueden incluir también el sistema de mutación refractario a la amplificación (ARMS) y el análisis de fusión de alta resolución (PCR-HRM).

Kits según la invención

La invención proporciona también un kit que comprende o consiste en un cebador de codificación, un cebador inverso y una sonda, que puede usarse para detectar la presencia de HSP110 mutada como se define aquí anteriormente. El kit puede comprender además un cebador de codificación, un cebador inverso y una sonda, que puede usarse para detectar HSP110 de tipo silvestre.

En particular, la invención proporciona un kit que comprende cebadores de codificación e inversos que son capaces

de hibridar con HSP110 mutada y HSP110 de tipo silvestre y dos sondas, siendo capaces cualquiera de ellas de hibridar específicamente con HSP110 mutada o con HSP110 de tipo silvestre como se describe anteriormente.

El cebador de codificación según la invención puede tener una secuencia nucleotídica que comprende, o consiste en, la SEQ ID NO: 4 o una secuencia diferente de la secuencia SEQ ID NO: 4 en una o dos sustituciones nucleotídicas.

El cebador inverso según la invención puede tener una secuencia nucleotídica que comprende, o consiste en, la SEQ ID NO: 5 o una secuencia diferente de la SEQ ID NO: 5 en una o dos sustituciones nucleotídicas.

La sonda que hibrida específicamente con HSP110 mutada puede tener una secuencia nucleotídica que comprende, o consiste en, la secuencia SEQ ID NO: 6 o una secuencia diferente de la secuencia SEQ ID NO: 6 en una o dos sustituciones nucleotídicas.

La sonda que hibrida específicamente con HSP110 de tipo silvestre puede tener una secuencia nucleotídica que comprende, o consiste en, la secuencia SEQ ID NO: 7 o una secuencia diferente de la secuencia SEQ ID NO: 7 en una o dos sustituciones nucleotídicas.

Preferiblemente, la sonda está marcada. Por ejemplo, la sonda puede marcarse de manera covalente o no covalente con una amplia variedad de marcajes conocidos en la materia, incluyendo marcajes de hapteno (p.ej. biotina), marcajes de marcado masivo (p.ej., marcajes de isótopo estable), marcajes radiactivos, marcajes de quelato metálico, marcaje luminiscente (p.ej., marcajes fluorescentes, fosforescentes y quimioluminiscentes), etc.

Preferiblemente, la sonda se marca con al menos un marcaje o tinte fluorescente. El tinte fluorescente puede ser una amplia variedad de tintes conocidos en la materia incluyendo 6-FAM™, VIC®, TET™, NED™, Cy3®, Cy5®, HEX, TAMRA, DABCYL, BHQ™, DDQ, etc.

Más preferiblemente, la sonda se marca con un tinte indicador y un tinte apagador. Aún más preferiblemente, la sonda se marca en su extremo 5' con el tinte indicador y en su extremo 3' con el tinte apagador. El tinte indicador puede ser un tinte fluorescente, que puede ser por ejemplo 6-FAM™, VIC®, TET™, NED™, Cy3®, Cy5®, HEX, etc. El tinte apagador puede ser un tinte no fluorescente (p.ej. MGB™) o un tinte fluorescente que puede ser, por ejemplo, TAMRA, DABCYL, BHQ™, DDQ, etc.

En una realización más preferida, la sonda que hibrida específicamente con HSP110 mutada se marca con el tinte indicador VIC™ en su extremo 5' y con el tinte apagador TAMRA en su extremo 3', y la sonda que hibrida específicamente con HSP110 de tipo silvestre se marca con el tinte indicador 6-FAM™ en su extremo 5' y con el tinte apagador TAMRA en su extremo 3'.

Los cebadores de codificación e inverso y la sonda según la invención son preferiblemente de 17 a 30 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 17 a 25 nucleótidos de longitud. En particular, dichos cebadores de codificación e inversos y sonda pueden ser, independientemente entre sí, de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud.

Dichos cebadores de codificación e inverso hibridan respectivamente con la secuencia SEQ ID NO: 3 y la SEQ ID NO: 8 o con la secuencia inversa a la secuencia SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 8 en condiciones de alto rigor e hibridación específica. Además, dicha sonda que hibrida con HSP110 mutada según la invención hibrida con la secuencia SEQ ID NO: 3 y dicha sonda que hibrida con HSP110 de tipo silvestre según la invención hibrida con la secuencia SEQ ID NO: 8.

Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan el "rigor" de la hibridación.

La invención proporciona además un kit que comprende o consiste en un cebador de codificación y un cebador inverso que puede usarse para detectar la longitud de la delección de timidina en la repetición microsatelital como se describe aquí anteriormente.

El cebador de codificación según la invención puede tener una secuencia nucleotídica que comprende, o consiste en, la SEQ ID NO: 10 o una secuencia diferente de la secuencia SEQ ID NO: 10 en una o dos sustituciones nucleotídicas.

El cebador inverso según la invención puede tener una secuencia nucleotídica que comprende, o consiste en, la SEQ ID NO: 11 o una secuencia diferente de la SEQ ID NO: 11 en una o dos sustituciones nucleotídicas.

Los cebadores de codificación e inverso y la sonda según la invención son preferiblemente de 17 a 30 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 17 a 25 nucleótidos de longitud. En particular, dichos cebadores de codificación e inverso y sonda pueden ser, independientemente entre sí, de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud.

Dichos cebadores de codificación e inverso hibridan con la secuencia SEQ ID NO: 9 o con la secuencia inversa a la secuencia SEQ ID NO: 9 en condiciones de alto rigor e hibridación específica.

Las condiciones de temperatura y fuerza iónica determinan el "rigor" de la hibridación. Las condiciones de hibridación de alto rigor corresponden a una alta T_m entre 60 y 75 °C. La hibridación requiere que los dos ácidos nucleicos contengan secuencias complementarias, aunque dependiendo del rigor de la hibridación, son posibles desapareamientos entre las bases.

- 5 La invención proporciona también un kit que comprende o consiste en un anticuerpo que puede usarse para detectar la presencia de HSP110 mutada como se define aquí anteriormente, concretamente un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 mutada según la invención. El kit puede comprender además un anticuerpo que puede usarse para detectar HSP110 de tipo silvestre.

- 10 En algunas realizaciones, la invención proporciona un kit que comprende un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP100 mutada y un anticuerpo que reconoce específicamente una HSP110 de tipo silvestre como se describe anteriormente.

En algunas realizaciones, dicho anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 mutada y dicho anticuerpo que reconoce específicamente una HSP110 de tipo silvestre son idénticos. Por ejemplo, dicho anticuerpo puede ser el anticuerpo Ab24503 de Abcam.

- 15 En algunas realizaciones, dicho anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 mutada y dicho anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 de tipo silvestre son diferentes. Por ejemplo, dicho anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 mutada es capaz de reconocer una proteína HSP110 mutada de secuencia SEQ ID NO: 1, y dicho anticuerpo que reconoce específicamente una HSP110 de tipo silvestre puede ser el anticuerpo SPA-1101 de Stressgen.

- 20 La invención proporciona también un kit que comprende o consiste en:

- a) medios para detectar la presencia de HSP110 mutada como se define aquí anteriormente, y/o
- b) medios para detectar la longitud de la delección de timidina en la repetición microsatelital como se describe aquí anteriormente.

- 25 En algunas realizaciones, dichos medios para detectar la presencia de HSP110 mutada pueden ser un cebador de codificación, un cebador inverso y una sonda como se describen aquí anteriormente, y/o un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 mutada como se define aquí anteriormente. En algunas realizaciones, dichos medios para detectar la presencia de HSP110 de tipo silvestre pueden ser un cebador de codificación, un cebador inverso y una sonda como se describen aquí anteriormente, y/o un anticuerpo que reconoce específicamente una proteína HSP110 de tipo silvestre como se define aquí anteriormente.

- 30 En algunas realizaciones, dichos medios para detectar la longitud de la delección de timidina en la repetición microsatelital pueden ser un cebador de codificación y un cebador inverso como se definen aquí anteriormente.

"Detectar la longitud de la delección de timidina en la repetición microsatelital" puede significar también "detectar la inestabilidad de dicha repetición microsatelital".

Compuestos y composiciones farmacéuticas

- 35 Es conocido que la HSP110 es una proteína que se acumula anormalmente en células cancerosas, potenciando por tanto su supervivencia (Yamagishi *et al.*, *The FEBS Journal* **275** (18), 4558 (2008); Hosaka *et al.*, *Cancer Science* **97** (7), 623 (2006); Yamagishi *et al.*, *Experimental Cell Research* **312** (17), 3215 (2006); Siatskas *et al.*, *Faseb J.* **19** (12), 1752 (2005)). Además, la HSP110 se expresa con especial fuerza en células de cáncer de colon (Kai *et al.*, *Oncology Reports* **10** (6), 1777 (2003)) y el análisis del perfil génico de CCR primario con MSS ha ligado la expresión de HSP110 con metástasis y mal pronóstico (Slaby *et al.*, *Oncology Reports* **21** (5), 1235 (2009)).

Se ha encontrado aquí que una HSP110 mutada es capaz de tener un efecto dominante negativo sobre la HSP110 de tipo silvestre en células tumorales, bloqueando por tanto su efecto antiapoptótico y sensibilizando las células tumorales ante la apoptosis.

Por tanto, la memoria descriptiva da a conocer además un compuesto seleccionado del grupo consistente en:

- 45 a) la proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada como se describe aquí anteriormente; y/o
- b) un fragmento de al menos 6 aminoácidos consecutivos de la proteína de choque térmico (HSP110) mutada que comprende o consiste en una secuencia aminoacídica al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 1; y/o
- 50 c) un peptidomimético de la HSP110 mutada de a) o del fragmento de b); y/o
- d) un ácido nucleico que codifica la HSP110 mutada de a) o el fragmento de b); y/o

e) un inhibidor de la degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD);

para uso en el tratamiento de un cáncer.

En una realización preferida, el compuesto consiste en una combinación de la proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada como se describe aquí anteriormente y un inhibidor de la degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD).

La degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD) es un proceso de control de calidad de ARNm que degrada el ARNm que contiene codones de terminación prematuros (PTC) para evitar la producción de proteínas truncadas con efectos nocivos potenciales para las células.

La HSP110 mutada identificada se genera por un ARNm que carece del exón 9, conduciendo por tanto a la presencia de un PTC. Los inventores han encontrado que la HSP110 mutada se degrada parcialmente en las células tumorales con MSI mediante el proceso de NMD. En consecuencia, es aconsejable inhibir la NMD para restaurar la expresión de HSP110 mutada endógena en tumor que expresa dicha proteína, y/o para evitar la degradación de una HSP110 mutada administrada a un paciente.

Como se usa en la presente memoria, un inhibidor de NMD puede ser un compuesto derivado de indol, preferiblemente un compuesto derivado de indol que se ha descrito en la solicitud de patente internacional WO 2008/101935. En particular, dicho inhibidor de NMD puede ser un compuesto derivado de indol que tiene la fórmula II de la reivindicación 16 de la solicitud de patente WO 2008/101935. Preferiblemente, dicho inhibidor de NMD puede ser un derivado de indol seleccionado del grupo consistente en 6-cloro-5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina, 5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina, 5,8-dimetil-6-(piridin-2-ilamino)-2H-isoquinolin-1-ona, 6-(3-metoxipiridin-2-ilamino)isoquinolin-1-ona, 5,8-dimetil-6-(5-metilpiridin-2-ilamino)isoquinolina como se definen en la reivindicación 21 de la solicitud de patente WO 2008/101935. Más preferiblemente, dicho inhibidor de NMD puede ser 6-cloro-5,10-dimetil-11H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[3,2-g]isoquinolina. Se hace referencia también a este compuesto como NMDI1 en la bibliografía científica (Durant *et al.*, The Journal of Cell Biology **178**: 1145-1160 (2007)).

Los métodos para obtener dicho compuesto son conocidos por los especialistas en la materia. Por ejemplo, se describen métodos para obtener dicho compuesto en la solicitud de patente WO 2008/101935.

Lo más preferiblemente, dicho cáncer es un cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI. Dicho cáncer puede ser, sin limitación, un cáncer seleccionado del grupo consistente en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma. Preferiblemente, dicho cáncer es un cáncer colorrectal. Preferiblemente, dicho cáncer puede ser un tumor primario o un adenoma.

Aún más preferiblemente, dicho cáncer es un cáncer con fenotipo de MSS. Es más, estos cánceres expresan bajos niveles de HSP110 mutada. Se cree que administrar la HSP110 mutada y/u otro inhibidor de HSP110 de tipo silvestre (concretamente, un peptidomimético o un fragmento como se describe aquí anteriormente) restaura su sensibilidad ante la apoptosis.

Como alternativa, el cáncer puede tener un fenotipo de MSI.

Los inventores han encontrado que las células que expresan HSP110 mutada son más sensibles a la apoptosis, principalmente la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos. Por lo tanto, se describe también una combinación de un compuesto como se describe aquí anteriormente y de un fármaco quimioterapéutico para uso simultáneo o secuencial en el tratamiento de cáncer. Se entiende por "fármaco quimioterapéutico" un fármaco que tiene aprobación de comercialización para el tratamiento del cáncer, o un fármaco que está experimentando un ensayo clínico o preclínico para el tratamiento del cáncer.

El compuesto descrito en la presente memoria puede formularse en una composición farmacéutica. Por tanto, se describe una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los compuestos anteriores y un portador fisiológicamente aceptable. Los portadores fisiológicamente aceptables pueden prepararse mediante cualquier procedimiento conocido por los especialistas en la materia.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un compuesto como se describe anteriormente incluyen todas las composiciones en las que el compuesto o compuestos están contenidos en una cantidad eficaz para el fin pretendido. Además, las composiciones farmacéuticas pueden contener portadores farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que faciliten el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Company, Easton, EE.UU., 1985), que es un texto de referencia estándar en este campo. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden seleccionarse rutinariamente de acuerdo con el modo de administración, solubilidad y estabilidad de los péptidos. Por ejemplo, las formulaciones para administración intravenosa pueden incluir disoluciones acuosas estériles que pueden contener también tampones, diluyentes y

otros aditivos adecuados. Se da a conocer en la bibliografía el uso de biomateriales y otros polímeros para suministro de fármacos, así como las diferentes técnicas y modelos para validar un modo de administración específico.

5 El compuesto puede administrarse mediante cualquier medio que consiga el fin pretendido. Por ejemplo, la administración puede conseguirse mediante una serie de vías diferentes incluyendo, pero sin limitación, el uso subcutáneo, intravenoso, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intratecal, intranasal, oral, rectal, transdérmico, bucal, tópico, local, inhalativo o subcutáneo.

10 Las dosificaciones para administrar dependen de las necesidades individuales, del efecto deseado y de la ruta de administración elegida. Se entiende que la dosificación administrada dependerá de la edad, sexo, salud y peso del receptor, del tratamiento concurrente si lo hubiera, de la frecuencia de tratamiento y de la naturaleza del efecto deseado. La dosis total requerida para cada tratamiento puede administrarse en múltiples dosis o en una sola dosis.

Dependiendo de la vía de suministro pretendida, los compuestos pueden formularse en formas líquida (p.ej., disoluciones, suspensiones), sólida (p.ej., píldoras, comprimidos, supositorios) o semisólida (p.ej., cremas geles).

15 En una realización preferida, las composiciones se presentan en formas de dosificación unitarias para facilitar una dosificación exacta. El término "formas de dosificación unitaria" hace referencia a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico deseado. Las formas de dosificación unitaria típicas incluyen ampollas o jeringuillas prellenadas premedidas de composiciones líquidas o píldoras, comprimidos, cápsulas o similares en el caso de 20 composiciones sólidas. En dichas composiciones, el compuesto de la invención es habitualmente un componente minoritario (de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 % en peso, o preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 40 % en peso), siendo el resto diversos vehículos o portadores y auxiliares de procesamiento útiles para formar la forma de dosificación deseada.

25 Los compuestos de esta invención pueden administrarse también en formas de liberación prolongada o a partir de sistemas de suministro de fármaco de liberación prolongada.

La invención contempla también una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico que codifica la HSP110 mutada de la invención en el marco, p.ej., de un tratamiento por terapia génica. En este caso, el ácido nucleico está preferiblemente presente en un vector, en el que se dispone la secuencia que codifica el péptido bajo el control de señales de expresión (p.ej., un promotor, un terminador y/o un potenciador) que permitan su expresión. 30 El vector puede corresponder, por ejemplo, a un vector vírico tal como un vector adenovírico o lentivírico.

La invención proporciona además kits que comprenden una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la invención e instrucciones referentes al modo de administración. Estas instrucciones pueden indicar, p.ej., la indicación médica y/o la vía de administración y/o la dosificación y/o el grupo de pacientes para tratar.

35 Se describe además un método para tratar cáncer, en el que dicho método comprende la administración de una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado del grupo consistente en:

- a) la proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada como se describe aquí anteriormente; y/o
- b) un fragmento que comprende o consiste en al menos 6 aminoácidos consecutivos al menos un 80 % idénticos a la SEQ ID NO: 1, preferiblemente al menos un 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % idénticos a la SEQ ID NO: 1; y/o
- 40 c) un peptidomimético de la HSP110 mutada de a) o del fragmento de b); y/o
- d) un ácido nucleico que codifica la HSP110 mutada de a) o un fragmento de b); y/o
- e) un inhibidor de la degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMO),

a un individuo necesitado de ello.

45 En una realización preferida, dicho método comprende la administración de la proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada como se describe aquí anteriormente y un inhibidor de la degradación de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD).

El compuesto se administra en una "cantidad eficaz", concretamente en una cantidad suficiente para tratar el cáncer. Se apreciará que esta cantidad variará con la eficacia del agente o agentes terapéuticos empleados, con la naturaleza de cualquier portador usado, con la gravedad de la enfermedad y la edad del paciente. La determinación 50 de las cantidades apropiadas para cualquier composición dada está dentro de las habilidades en la materia, mediante series estándares de pruebas diseñadas para valorar los niveles terapéuticos apropiados.

Se entiende por "individuo necesitado de ello" un individuo que padece un cáncer, o un individuo que está en

remisión después de haber padecido un cáncer.

En el marco de la presente descripción, el individuo es preferiblemente un individuo humano. Sin embargo, se prevé también el uso veterinario de los polipéptidos y fármacos descritos en la presente memoria. El individuo puede corresponder también por tanto a un individuo no humano, preferiblemente un mamífero no humano.

- 5 El término “tratar” pretende englobar tanto métodos terapéuticos como profilácticos, concretamente un método orientado a curar, mejorar la afección y/o alargar la vida de un individuo que padece cáncer. Hace referencia también a métodos orientados a prevenir la aparición o extensión de metástasis, así como a métodos orientados a prevenir una recaída.

- 10 Aunque tienen significados distintos, los términos “comprende”, “tiene”, “contiene” y “consiste en” se han usado intercambiamente a lo largo de esta memoria descriptiva y pueden reemplazarse entre sí.

La invención se evaluará además con vistas a los siguientes ejemplos y figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- 15 La **Figura 1** representa el cribado de un gran serie de genes candidatos que contienen repeticiones de ADN intrónico cuya inestabilidad debida a MSI podía generar omisión exónica o retención exónica. Se muestran los criterios usados para seleccionar los genes candidatos (IR: repetición intrónica. IEJ: conexión intrón-exón). Todos los genes seleccionados se expresaban en CCR. Entre los 45 genes candidatos, dos exhibían perfiles de PCR-RT aberrantes que sugerían omisión exónica en estirpes celulares de CCR que exhiben MSI, concretamente *MRE11* y *HSP110*.

- 20 La **Figura 2** representa el análisis de la presencia de un producto específico adicional de PCR-RT de *HSP110* detectado en muestras de tumor con MSI para 14 estirpes celulares de CCR. Su tamaño sugería la omisión del exón 9 en ARNm de *HSP110*. No se consiguió detectar su expresión en estirpes celulares competentes de MMR, p.ej. en 7 estirpes celulares de CCR con MSS y 4 estirpes celulares de LBL con MSS. Se confirmaron los resultados en una serie de 4 y 7 CCR primarios (T) que eran MSI o MSS, respectivamente, y sus mucosas normales coincidentes (N).

La **Figura 3** representa la estructura de proteínas HSP110 de tipo silvestre y HSP110 mutada.

- 25 La **Figura 4** representa perfiles alélicos para varias estirpes celulares de CCR con MSI y tumores primarios y controles (estirpes celulares de CCR y LBL con MSS) en T_{17} de *HSP110* intrónico. Las muestras con MSS eran débilmente polimórficas, mientras que las estirpes celulares de CCR con MSI y tumores primarios exhibían siempre alelos aberrantes que caían fuera de la zona polimórfica (zona rayada). Se observaron diversas delecciones alélicas en el intervalo de 3 a 8 pares de bases de tamaño. Las delecciones observadas eran mayoritariamente bialélicas en las estirpes celulares de CCR con MSI. En los tumores primarios con MSI, los perfiles alélicos sugerían en gran medida en la mayoría de casos mutaciones bialélicas, como se muestran. Los números indican el tamaño de la delección de T_{17} de *HSP110* en muestras de tumor con MSI (en pares de bases).

- 30 La **Figura 5** representa el análisis de frecuencia de mutación de T_{17} de *HSP110* intrónico. La mutación de la repetición se detectaba más frecuentemente en CCR primarios con MSI (100 %) y adenoma premaligno (53 %) que para cualquiera las alteraciones codificantes microsatelitales. Los números indican el tamaño de la delección de T_{17} de *HSP110* en muestras de tumor con MSI o adenoma.

- 35 La **Figura 6** representa un diagrama que muestra el análisis de la expresión de HSP110wt y HSP110delE9 por PCR-RT. Se muestran gráficas de amplificación correspondientes a productos de PCR-QTR de HSP110wt y HSP110delE9. Se amplificaron de manera comparativa por PCR-RT usando los mismos cebadores de PCR, pero distintas sondas internas que eran específicas del transcrito de HSP110wt o HSP110delE9. Se expresan los resultados (E) como la diferencia en N veces de expresión de HSP110delE9 respecto a HSP110wt (deltaCt), en que deltaCt se determinó en cada caso restando el valor medio de Ct de ARNm de HSP110delE9 del valor medio de Ct de ARNm de HSP110wt.

- 40 La **Figura 7** representa la cuantificación de la expresión de HSP110wt y HSP110delE9 en estirpes celulares con MSS y MSI y CCR primarios. Se calcularon los valores de la relación de E ($E_{HSP110delE9}/E_{HSP110wt}$) para 14 estirpes celulares de CCR con MSI y 43 muestras de tumor primario. Se ensayaron también como controles LBL con MSS (N= 20), estirpes celulares de CCR con MSS (N= 7; ALA, COLO320, SW480, FET, GLY, FRI, EB) y CCR primarias con MSS (N= 20). Se observó una diferencia altamente significativa entre los CCR primarios con MSI y MSS referente a la expresión de HSP110delE9 ($P = 8,5 \times 10^{-5}$; prueba t de Student). Los valores medios de E se indican por barras negras en cada caso.

- 45 La **Figura 8** representa la correlación de la longitud de la repetición T_{17} y la expresión de ARNm de HSP110delE9. Las barras rayadas y blancas corresponden a CCR en que la expresión de ARNm de HSP110delE9 era baja o alta, respectivamente, concretamente por debajo o por encima del valor mediano calculado en la serie tumoral. El tamaño de la delección en T_{17} era significativamente diferente entre estos dos grupos de tumores ($P = 1,1 \times 10^{-13}$; prueba t de Student). El ARNm de HSP110delE9 se expresaba generalmente a bajos niveles en tumores con MSI que exhibían

deleciones de T_{17} pequeñas, concretamente de 3 o 4 pares de bases, o en tumores con MSS que no estaban mutados. En contraposición, se expresaba en gran medida en tumores con MSI que exhibían deleciones de T_{17} mayores, concretamente de 5 a 8 pares de bases.

5 La **Figura 9** representa el efecto de la expresión de HSP110delE9 sobre la agregación de proteína. Se calentaron a 55 °C durante 1 h extractos de proteína de células MEF HSF1^{-/-} transfectadas con HSP70, HSP110 y/o HSP110delE9. La relación entre la cantidad inicial de proteína soluble antes y después del choque térmico permitía la cuantificación de la agregación de proteína. Cada barra es el valor medio de 4 experimentos diferentes. * $P < 0,05$.

10 La **Figura 10** representa el análisis de HSP110delE9 ante HSP110 de tipo silvestre. Se sometieron lisados celulares de HCT116 transfectadas con HSP110 marcada con GFP y/o HSP110delE9 a inmunoprecipitación usando HSP110 que reconoce el extremo C de HSP110. Después de la migración, se inmunotifieron las membranas con anticuerpo de GFP. Entradas: nivel de proteína en los lisados celulares totales.

La **Figura 11** representa el efecto de HSP110delE9 sobre la apoptosis. Se trataron células HCT116 transfectadas con HSP110 marcada con GFP, HSP110delE9 o un vector vacío (GFP) con el ligando TRAIL recombinante (5 h) a las dosis indicadas. Se midió la apoptosis mediante análisis FACS de la actividad de caspasa 3.

15 La **Figura 12** representa el efecto de aumentar la dosis de HSP110delE9 sobre la apoptosis. Se trataron células HCT116 transfectadas con HSP110 marcada con GFP y dosis aumentadas de HSP110delE9 o un vector vacío (GFP) con ligando TRAIL recombinante (60 ng/ml, 5 h) y se determinó el porcentaje de apoptosis por tinción con DAPI (condensación de cromatina).

20 La **Figura 13** representa el efecto proapoptótico de HSP110delE9 sobre células tumorales tratadas con un agente quimioterapéutico. Se transfectaron células HCT116 (MSI) o SW480 (MSS) con HSP110wt (1,5 µg) y se cotransfectaron con dos dosis diferentes (0,5 y 1 µg) de cualquiera de vector vacío con GFP o HSP110delE9. Después del tratamiento con oxaliplatino (Oxa, 40 µM, 48 h), se valoró la apoptosis por análisis FACS. * $P < 0,05$.

25 La **Figura 14** representa análisis univariados de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad (DFS) en pacientes de CCR con MSI o MSS. Para los análisis estadísticos, solo se muestran los 5 primeros años. Como se esperaba, las siguientes características clinicopatológicas de los pacientes de CCR con MSI o MSS eran diferentes, concretamente la etapa de Dukes ($P = 2,6 \times 10^{-4}$; prueba exacta de Fisher), la edad de diagnóstico ($P = 2,9 \times 10^{-5}$) y la localización tumoral ($P = 5 \times 10^{-4}$).

30 La **Figura 15** representa estimaciones de Kaplan-Meier de la DFS en diferentes grupos de pacientes de CCR según la expresión de HSP110. Se efectuó el análisis univariado como en la Figura 1. Las siguientes características clinicopatológicas de pacientes con tumores MSI-HSP110delE9^{high} ($N = 9$; 24 %) o MSI-HSP110delE9^{low} ($N = 29$; 76 %) no eran significativamente diferentes, concretamente, etapa de Dukes, localización tumoral, género, estado de mutación del gen *BRAF*, *KRAS* y *PIK3CA*, estado de CIMP y CIN, mutaciones de desplazamiento de marco en genes diana para MSI, estado de metilación de *MLH1* y *MGMT*.

La **Figura 16** representa la distribución de los genotipos de T_{17} de *HSP110* en 405 CCR con MSS.

35 La **Figura 17** representa la distribución de los alelos de T_{17} de *HSP110* mutada en CCR con MSI.

La **Figura 18** representa el análisis de supervivencia de pacientes de CCR con MSI en etapa II y etapa III a partir de la cohorte inicial según el tamaño de las deleciones en la repetición de ADN T_{17} de *HSP110*. Se clasifican los pacientes en dos grupos según el tamaño de la deleción en la repetición intrónica T_{17} de *HSP110* ($\Delta T \geq 5$ pb, T_{11} , T_{10} , T_9 para pacientes HSP110Del^L con MSI; $0 \leq \Delta T < 5$, T_{17} a T_{12} para pacientes HSP110Del^S con MSI).

40 La **Figura 19** representa el análisis de supervivencia de pacientes de CCR con MSI en etapa II y etapa III a partir de la cohorte de validación según el tamaño de las deleciones en la repetición de ADN T_{17} de *HSP110*. Se clasifican los pacientes en dos grupos según el tamaño de la deleción en la repetición intrónica T_{17} de *HSP110* ($\Delta T \geq 5$ pb, T_{11} , T_{10} , T_9 para pacientes HSP110Del^L con MSI; $0 \leq \Delta T < 5$, T_{17} a T_{12} para pacientes HSP110Del^S con MSI).

45 La **Figura 20** representa el análisis de supervivencia de pacientes de CCR con MSI en etapa II y etapa III según el tamaño de las deleciones en la repetición de ADN T_{17} de *HSP110* (cohorte global de pacientes). Se clasifican los pacientes en dos grupos según el tamaño de la deleción en la repetición intrónica T_{17} de *HSP110* ($\Delta T \geq 5$ pb, T_{11} , T_{10} , T_9 para pacientes HSP110Del^L con MSI; $0 \leq \Delta T < 5$, T_{17} a T_{12} para pacientes HSP110Del^S con MSI).

50 La **Figura 21** representa el análisis de supervivencia de pacientes de CCR con MSI según el tamaño de la deleción en la repetición de ADN T_{17} de *HSP110*. En cada análisis de supervivencia, se agrupan los pacientes en dos grupos según el tamaño de la deleción de T_{17} en el ADN tumoral (panel superior izquierdo: $\Delta T \geq 2$ pb, T_{14} a T_9 , concretamente pacientes de CCR HSP110Del^L con MSI, $0 \leq \Delta T < 2$, T_{17} a T_{15} , concretamente HSP110Del^S con MSI. Panel superior derecho: $\Delta T \geq 3$ pb, T_{13} a T_9 , concretamente pacientes de CCR HSP110Del^L con MSI, $0 \leq \Delta T < 3$, T_{17} a T_{14} , concretamente HSP110Del^S con MSI. Panel inferior izquierdo: $\Delta T \geq 4$ pb, T_{12} a T_9 , concretamente pacientes de CCR HSP110Del^L con MSI, $0 \leq \Delta T < 4$, T_{17} a T_{13} , concretamente HSP110Del^S con MSI. Panel inferior derecho: $\Delta T \geq 5$ pb, T_{11} a T_9 , concretamente pacientes de CCR HSP110Del^L con MSI, $0 \leq \Delta T < 5$, T_{17} a T_{12} , concretamente

HSP110Del^S con MSI.

La **Figura 22** representa el análisis de supervivencia de pacientes de CCR con MSI en etapa II y etapa III tratados con quimioterapia según el tamaño de las deleciones en la repetición de ADN T₁₇ de HSP110. Se clasifican los pacientes en dos grupos según el tamaño de la deleción en la repetición intrónica T₁₇ de HSP110 ($\Delta T \geq 5$ pb, T₁₁, T₁₀, T₉ para pacientes HSP110Del^L con MSI; $0 \leq \Delta T < 5$, T₁₇ a T₁₂ para pacientes HSP110Del^S con MSI).

La **Figura 23** representa el análisis de supervivencia de pacientes de CCR con MSI en etapa II y etapa III tratados con 5-fluorouracilo según el tamaño de las deleciones en la repetición de ADN T₁₇ de HSP110. Se clasifican los pacientes en dos grupos según el tamaño de la deleción en la repetición intrónica T₁₇ de HSP110 ($\Delta T \geq 5$ pb, T₁₁, T₁₀, T₉ para pacientes HSP110Del^L con MSI; $0 \leq \Delta T < 5$, T₁₇ a T₁₂ para pacientes HSP110Del^S con MSI).

DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

La SEQ ID NO: 1 hace referencia a la secuencia aminoacídica de la proteína HSP110 mutada.

La SEQ ID NO: 2 hace referencia a la secuencia aminoacídica de la proteína HSP110 de tipo silvestre.

La SEQ ID NO: 3 hace referencia a la secuencia nucleotídica de HSP110 mutada.

Las SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12 a 23 hacen referencia a secuencias de cebadores y sondas.

La SEQ ID NO: 8 hace referencia a la secuencia nucleotídica de HSP110 de tipo silvestre.

La SEQ ID NO: 9 hace referencia a la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Material y métodos

Muestras tumorales y estirpes celulares

Se adquirieron las estirpes celulares de CCR en la American Type Culture Collection y se mantuvieron en DMEM (LifeTechnologies) que contenía 10 % de suero fetal bovino (Invitrogen) y glutamina. Se obtuvieron tumores primarios y tejidos colónicos normales de pacientes que experimentaron cirugía por CCR. Se confirmó histopatológicamente que todos los casos eran adenocarcinomas. Se determinó el estado de MSI mediante PCR múltiple fluorescente que comprende 5 repeticiones mononucleotídicas cuasimonomórficas (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR24 y NR-27), como se describe en Buhard *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **24** (2), 241 (2006).

Análisis de mutación

Se extrajo ADN tumoral de muestras congeladas usando el kit QIAamp DNA Tissue Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Se diseñaron cebadores específicos del intrón 8 de HSP110 usando e-primer3 (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/eprimer3.html>). El cebador de codificación y cebador inverso para análisis de mutación tienen respectivamente las secuencias

5'-CCCTGTCCATCCATTGGAATTGA-3' (SEQ ID NO: 10)_y

5'-GGAAGTGCATCTGTGACGGAA-3' (SEQ ID NO: 11). Se efectuaron reacciones de PCR a un volumen final de 20 µl que contenía 100 ng de ADN genómico, 0,15-0,40 µM de cada cebador y 1 unidad de ADN polimerasa HotStarTaq (Qiagen). Las condiciones de ciclación térmica comprendían una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min y 40 ciclos a 94 °C durante 30 s y a 57 °C durante 30 s. Se mezclaron diluciones adecuadas de los productos de PCR fluorescentes con formamida y patrón de tamaño GeneScan™ 400HD ROX™ (Applied Biosystems), se termodesnaturalizaron y se procesaron en un capilar corto que contenía polímero 4 de rendimiento optimizado de GS en el analizador genético ABI 3130 usando el software GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

Análisis de PCR-RT cuantitativo (PCR-QTR) inmediato

Se aisló el ARN total usando el reactivo Trizol según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Se evaluó la integridad del ARN en un 2100 Bioanalyzer usando el kit RNA 6000 Nano LabChip kit (Agilent). Se usaron solo las muestras con ARN intactos para el análisis de expresión génica (relación de ARN de 28S/18S > 1,6 y ausencia de picos aberrantes en el perfil de ARN). Se sintetizaron los ADNc usando el kit High Capacity cDNA Archive Kit según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Para los experimentos de PCR-QTR, se obtuvieron los valores de expresión a partir del número Ct al que empieza a detectarse el aumento de señal asociado a la amplificación exponencial de los productos de PCR usando el software de análisis Applied SDS Biosystems según el fabricante. Se diseñaron cebadores (de codificación

5'-GCTACACGAATTCCAGCTGTGA-3' (SEQ ID NO: 4) e inverso 5'-

GAGCAGCATGGTTTCGACTAAA-3' y sondas internas usando Primer Express y se sintetizaron por Applied Biosystems. Se diseñaron específicamente las sondas internas para amplificar transcritos de HSP110 de tipo silvestre (llamada de aquí en adelante HSP110wt)

(5'-6FAM-TACAGTGTGCAATACTT-3' (SEQ ID NO: 7))_o HSP110 mutada (llamada de aquí en adelante HSP110delE9) (5'-VIC-ATGTGCATTACAGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 6)).

Los ensayos de control sin molde y control sin transcriptasa inversa (negativo de transcriptasa inversa) producían señales insignificantes (habitualmente Ct > 35) y se usaron para confirmar la ausencia de formación de cebador dimérico y de contaminación de ADN genómico. Se efectuaron las reacciones de PCR por triplicado usando un sistema de detección de secuencia ABI Prism 7900 y la mezcla maestra de PCR TaqMan (Applied Biosystems). Se expresaron los resultados como la diferencia en N veces de expresión de HSP110ΔE9 respecto a HSP110wt (ΔCt), en que se determinaba ΔCt en cada caso restando el valor medio de Ct de ARNm de HSP110delE9 del valor medio de Ct de ARNm de HSP110wt. Las condiciones de ciclación térmica comprendían una etapa de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 min y 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y a 60 °C durante 1 min.

Células, plásmidos, transfecciones y materiales

Se cultivaron células HCT116, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), MEF de la American Type Culture Collection, ATCC) y HSF1^{-/-} en DMEM/10 % de FBS (suero fetal bovino, Lonza, Basilea, Suiza). Los constructos de HSP70 y HSP27 se han descrito anteriormente (Ribeil *et al.*, *Nature* **445**: 102-105 (2007); Brunet *et al.*, *BMC Med Gene* **10**: 144 (2009)). Se obtuvo el constructo GFP-HSP110 de Addgene (Cambridge, Inglaterra). Se produjo el mutante de HSP110 por PCR a partir del vector GFP-HSP110 usando los siguientes cebadores:

5'CGC GCG CGC AAG ATC TAC ATG TCG GTG GTG GGG 3' (Bgl II)
(SEQ ID NO:12)

5'CGC GCG CGC AAG CTT TCA TGA ACA CTG TAA TGC ACA
TCC3' (HindIII) (SEQ ID NO:13).

Después de la digestión con las enzimas Bgl II e Hind III, se clonó ADNc de HSP110 mutante en el vector EGFP C2. Se efectuaron las transfecciones usando el reactivo Jet PEI (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, Francia). Se adquirió oxaliplatino en Sigma-Aldrich (disolución madre 5 mg/ml). El His-TRAIL recombinante fue un regalo de Olivier Micheau (INSERM U866, Francia).

Inmunoprecipitación y transferencia Western

Se lisaron en primer lugar las células transfectadas con tampón de lisis (Hepes 50 mM (pH 7,6), NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y 0,1 % de NP40) seguido de inmunoprecipitación usando anticuerpo marcado con GFP. Se separaron los inmunoprecipitados en gel de poliacrilamida con 10 % de SDS y se transfirieron entonces a membranas de PVDF usando un aparato de transferencia en húmedo (BioRad, Hercules, California, EE.UU.). Se sondearon en primer lugar las membranas durante una noche usando anticuerpos primarios: el anticuerpo con marcaje HA era de Covance (Eurogentec, Angers, Francia), 14-3-3 de Santa-Cruz (TebuBio, le Perray en Yvelines, Francia) y el anticuerpo con marcaje GFP de Millipore (Molsheim, Francia). A continuación, se incubaron las membranas durante 1 hora con anticuerpos secundarios apropiados acoplados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PE) y se revelaron con ECL (Amersham, Les Ulis, Francia).

Análisis de la muerte celular

Se sembraron células adherentes sobre placas de cultivo de 12 pocillos (1,5 x 10⁵ células/pocillo) en medio completo. Cuando se indica, se trataron las células con TRAIL (150 ng/ml o 500 ng/ml) durante 4 horas y se midió entonces la muerte celular por tinción con Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich). Después de tratamiento durante 48 h con oxaliplatino (OxaPt, 20 y 40 μM), se detectaron células apoptóticas por tinción con Ap02.7. Brevemente, se recolectaron las células, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con digitonina (100 mg/ml, 10 min a 40° C). Se incubaron las células con anticuerpo anti-Ap02.7 y se analizaron las células apoptóticas mediante citometría de flujo usando un citómetro de flujo LSR2 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Actividad chaperona de HSP110

Se evaluó la actividad chaperona de HSP110 usando un ensayo de termolabilidad de proteína. Se calentó a 55 °C durante 1 hora la proteína total (2 mg/ml) de MEF HSF1^{-/-} que se habían transfectado con HSP70 (control positivo), HSP27 (control negativo), HSP110 o HSP110 mutante (Dc Assay Kits, Bio-Rad, Francia). Después de centrifugación para eliminar las proteínas agregadas, se cuantificaron las proteínas nativas restantes en el sobrenadante. La relación entre la cantidad inicial de proteína soluble y la obtenida después del calentamiento permitía la cuantificación de la agregación de proteína.

Extracción de núcleo/citoplasma

Se obtuvieron extractos citoplasmáticos y nucleares después de la lisis de 5-10x10⁶ células durante 10 minutos en hielo en tampón de lisis (Hepes 20 mM pH 7,4, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, 10 % de glicerol) con 0,2 % de NP-40 en

presencia de inhibidores de proteasa. Se centrifugaron los lisados celulares a 14.000 rpm durante 10 min y se recogió cuidadosamente el sobrenadante (fracción citoplasmática). Se lavó el sedimento una vez, se resuspendió en tampón de lisis (Hepes 20 mM pH 7,4, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, 20 % de glicerol, NaCl 350 mM, inhibidores de proteasa) y se obtuvieron las fracciones nucleares después de centrifugación (14000 rpm, 10 min).

5 **Tinción por inmunofluorescencia**

Se fijaron células transfectadas con GFP en PBS-paraformaldehído (al 4 %) durante 15 min y se lavaron entonces con PBS (Cambrex, Emerain Ville, Francia). Se valoró la fluorescencia de GFP usando la estación Cell Observer (Zeiss, Alemania).

Pacientes

- 10 Los pacientes del estudio retrospectivo experimentaron la resección quirúrgica curativa de CCR de Dukes 2 o Dukes 3 histológicamente probadas. El estudio se ha realizado según las recomendaciones de las autoridades institucionales. Se operaron los pacientes en el hospital Saint-Antoine o en el Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan. Los pacientes con CCR de Dukes 3 recibieron quimioterapia complementaria con fármacos, incluyendo FL (fluorouracilo mas leucovorina) y oxaliplatino (FOLFOX4).

15 **Análisis estadístico**

- Se valoraron las diferencias entre variables con la prueba Chi-2 o exacta de Fisher, según fuera apropiado. Se valoraron las comparaciones de la media entre las variables usando la prueba t de Student. El resultado clínico primario era supervivencia libre de enfermedad. Se obtuvieron las curvas de supervivencia usando estimaciones de Kaplan-Meier. Se valoró la diferencia entre las curvas de supervivencia usando la prueba de rangos logarítmicos con un punto final a los 5 años.

EJEMPLO 2: Resultados

Investigación de eventos de corte y empalme aberrantes debidos a MSI en estirpes celulares de CCR y tumores primarios

- 25 Para descubrir un nuevo mutante con un presunto papel en la carcinogénesis impulsada por MSI, se analizó mediante PCR-RT no cuantitativa el patrón de expresión de 45 exones candidatos que se localizan en 3' de un intrón que contiene una secuencia de repetición mononucleotídica de al menos 8 nucleótidos y en la cercanía del sitio aceptor de corte y empalme. Se muestran en la Figura 1 los criterios detallados usados para seleccionar estos genes candidatos. Se emprendió la búsqueda mediante PCR-RT no cuantitativa usando un conjunto de estirpes celulares humanas de CCR con MSI y MSS (N= 21; 14 MSI, 7 MSS). Usando cebadores que coincidían con las secuencias en 5' y 3' de cada exón diana, 43 exhibieron el mismo patrón de expresión en estirpes celulares de cáncer con MSI y MSS. Estas se cortaron y empalmaron de forma alternativa (N= 10) o no (N= 33). En los 2 casos restantes (*MRE11* y *HSP110*), el patrón de expresión era notablemente diferente entre las muestras con MSI y MSS. Esto era debido a la presencia de un producto de PCR adicional que era solo detectable en las estirpes celulares de CCR con MSI y era debido a la omisión del exón 5 en *MRE11* (resultado no mostrado), como ya se ha reseñado por Giannini *et al.*, *Oncogene* **23** (15), 2640 (2004), y a la omisión del exón 9 en *HSP110* (Figura 2 y no mostrado). Se encontró también que la presencia de este producto de PCR-RT de *HSP110* adicional era específica de muestras tumorales primarias con MSI (Figura 2). No se detectó en una serie de estirpes celulares humanas no tumorales como controles competentes de MMR adicionales (estirpes celulares linfoblastoides [LBL], N= 20) (Figura 2). Entre los pacientes de CCR con MSI, se observó que la amplificación del producto de PCR-RT adicional se limitaba a los tejidos tumorales con MSI y no se observaba nunca en muestras de mucosa normal coincidentes (Figura 2).

El microsatélite de ADN intrónico T₁₇ de HSP110 está siempre mutado en estirpes celulares de CCR con MSI y tumores primarios

- 45 A continuación, se determinó el estado mutacional de la repetición de ADN T₁₇ de *HSP110* localizada en 5' y cerca del sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8. Se analizaron los perfiles alélicos de esta repetición no codificante usando genotipado de fluorescencia en el panel de estirpes celulares de CCR con MSI y MSS y tumores primarios, así como en LBL de control para valorar el estado polimórfico de esta secuencia (Tabla 2).

TIPO DE MUESTRA	NOMBRE DE MUESTRA	ESTADO DE MSI/MSS	GENOTIPO DE T17	TAMAÑO DE DELECCIÓN (en pb)*	EXPRESIÓN DE ARNm DE HSP110del9 (en %)
ESTIRPE CELULAR DE CCR	CO115	MSI	139/140	7	29,4
ESTIRPE CELULAR DE CCR	LS174T	MSI	140/142	6	193,9

TIPO DE MUESTRA	NOMBRE DE MUESTRA	ESTADO DE MSI/MSS	GENOTIPO DE T17	TAMAÑO DE DELECIÓN (en pb)*	EXPRESIÓN DE ARNm DE HSP110del9 (en %)
ESTIRPE CELULAR DE CCR	LOVO	MSI	141/141	5	25,7
ESTIRPE CELULAR DE CCR	TC71	MSI	142/146	4	48,1
ESTIRPE CELULAR DE CCR	HCT15	MSI	142/143	4	17,1
ESTIRPE CELULAR DE CCR	HCT116	MSI	143/144	3	14,3
ESTIRPE CELULAR DE CCR	TC7	MSI	141/143	5	90,2
ESTIRPE CELULAR DE CCR	SW48	MSI	141/144	5	14,1
ESTIRPE CELULAR DE CCR	RKO	MSI	139/142	6	14,4
ESTIRPE CELULAR DE CCR	HCT8	MSI	143/145	3	7,3
ESTIRPE CELULAR DE CCR	LS411	MSI	140/141	6	596,9
ESTIRPE CELULAR DE CCR	KM12	MSI	140/141	6	88,4
ESTIRPE CELULAR DE CCR	LIM1215	MSI	142/143	4	12,6
ESTIRPE CELULAR DE CCR	LIM2405	MSI	141/143	5	12,9
ESTIRPE CELULAR DE CCR	ALA	MSS	146	0	8,2
ESTIRPE CELULAR DE CCR	COLO320	MSS	146	0	6,8
ESTIRPE CELULAR DE CCR	EB	MSS	145	0	5,0
ESTIRPE CELULAR DE CCR	FET	MSS	146	0	6,0
ESTIRPE CELULAR DE CCR	FRI	MSS	145	0	4,6
ESTIRPE CELULAR DE CCR	GLY	MSS	145/146	0	9,1
ESTIRPE CELULAR DE CCR	SW480	MSS	146	0	8,4
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-1	MSS	145	0	17,9
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-2	MSS	145/146	0	18,0
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-3	MSS	146	0	14,0
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-4	MSS	145	0	10,6
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-5	MSS	146	0	22,6
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-6	MSS	145/146	0	26,0
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-7	MSS	145/146	0	19,3
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-8	MSS	145	0	19,7
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-9	MSS	145/146	0	24,0
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-10	MSS	145	0	18,9
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-11	MSS	146	0	19,9
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-12	MSS	145/146	0	15,4
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-13	MSS	146	0	16,7

TIPO DE MUESTRA	NOMBRE DE MUESTRA	ESTADO DE MSI/MSS	GENOTIPO DE T17	TAMAÑO DE DELECCIÓN (en pb)*	EXPRESIÓN DE ARNm DE HSP110del9 (en %)
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-14	MSS	145	0	26,8
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-15	MSS	145/146	0	18,3
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-16	MSS	145/146	0	23,7
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-17	MSS	145/146	0	20,8
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-18	MSS	145/146	0	24,3
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-19	MSS	145	0	25,3
ESTIRPE CELULAR DE LBL	LBL-20	MSS	146	0	26,5
CCR PRIMARIO	TMSI1	MSI	141/145	5	46,8
CCR PRIMARIO	TMSI10	MSI	143/146	3	11,7
CCR PRIMARIO	TMSI11	MSI	141/144	5	18,6
CCR PRIMARIO	TMSI12	MSI	140/142/144	6	44,9
CCR PRIMARIO	TMSI13	MSI	140/144	6	38,9
CCR PRIMARIO	TMSI14	MSI	141/142/145/146	5	40,8
CCR PRIMARIO	TMSI15	MSI	141/144/145	5	24,1
CCR PRIMARIO	TMSI16	MSI	140/144	6	24,2
CCR PRIMARIO	TMSI17	MSI	140/143/145	6	26,8
CCR PRIMARIO	TMSI18	MSI	139/144	7	25,9
CCR PRIMARIO	TMSI19	MSI	138/146	8	143,3
CCR PRIMARIO	TMSI2	MSI	142/144	4	18,7
CCR PRIMARIO	TMSI20	MSI	141/144/146	5	31,2
CCR PRIMARIO	TMSI21	MSI	143/145/146	3	15,9
CCR PRIMARIO	TMSI22	MSI	140/142/144	6	39,9
CCR PRIMARIO	TMSI23	MSI	140/142/145	6	46,2
CCR PRIMARIO	TMSI24	MSI	141/143/145	5	49,8
CCR PRIMARIO	TMSI25	MSI	142/146	4	45,5
CCR PRIMARIO	TMSI26	MSI	140/145	6	106,3
CCR PRIMARIO	TMSI27	MSI	139/140/144/145	7	252,7
CCR PRIMARIO	TMSI28	MSI	139/143/146	7	26,7
CCR PRIMARIO	TMSI29	MSI	140/143/146	6	206,4
CCR PRIMARIO	TMSI3	MSI	141/142/145	5	28,5
CCR PRIMARIO	TMSI30	MSI	142/145	4	18,9

TIPO DE MUESTRA	NOMBRE DE MUESTRA	ESTADO DE MSI/MSS	GENOTIPO DE T17	TAMAÑO DE DELECIÓN (en pb)*	EXPRESIÓN DE ARNm DE HSP110del9 (en %)
CCR PRIMARIO	TMSI31	MSI	142/143/145	4	22,4
CCR PRIMARIO	TMSI32	MSI	142/145	4	55,2
CCR PRIMARIO	TMSI33	MSI	140/141/145	6	288,2
CCR PRIMARIO	TMSI34	MSI	140/146	6	314,0
CCR PRIMARIO	TMSI35	MSI	143/145	3	20,8
CCR PRIMARIO	TMSI36	MSI	141/146	5	58,5
CCR PRIMARIO	TMSI37	MSI	138/142/145	8	29,7
CCR PRIMARIO	TMSI38	MSI	141/145/146	5	479,2
CCR PRIMARIO	TMSI39	MSI	141/145	5	319,5
CCR PRIMARIO	TMSI4	MSI	141/142/145	5	76,8
CCR PRIMARIO	TMSI40	MSI	141/144	5	26,2
CCR PRIMARIO	TMSI41	MSI	140/145	6	27,2
CCR PRIMARIO	TMSI42	MSI	143/145	3	21,3
CCR PRIMARIO	TMSI43	MSI	141/144	5	57,5
CCR PRIMARIO	TMSI5	MSI	140/144	6	69,3
CCR PRIMARIO	TMSI6	MSI	141/145	5	73,3
CCR PRIMARIO	TMSI7	MSI	142/143/146	4	25,4
CCR PRIMARIO	TMSI8	MSI	142/146	4	19,1
CCR PRIMARIO	TMSI9	MSI	141/145/146	5	38,3
CCR PRIMARIO	TMSS1	MSS	145	0	12,7
CCR PRIMARIO	TMSS10	MSS	146	0	11,1
CCR PRIMARIO	TMSS11	MSS	146/145	0	6,3
CCR PRIMARIO	TMSS12	MSS	146	0	6,8
CCR PRIMARIO	TMSS13	MSS	145	0	6,9
CCR PRIMARIO	TMSS14	MSS	146/145	0	7,4
CCR PRIMARIO	TMSS15	MSS	146/145	0	6,6
CCR PRIMARIO	TMSS16	MSS	146/145	0	7,8
CCR PRIMARIO	TMSS17	MSS	145	0	7,6
CCR PRIMARIO	TMSS18	MSS	146/145	0	8,7
CCR PRIMARIO	TMSS19	MSS	146	0	6,0
CCR PRIMARIO	TMSS2	MSS	146/145	0	10,8
CCR PRIMARIO	TMSS20	MSS	146	0	8,4

TIPO DE MUESTRA	NOMBRE DE MUESTRA	ESTADO DE MSI/MSS	GENOTIPO DE T17	TAMAÑO DE DELECCIÓN (en pb)*	EXPRESIÓN DE ARNm DE HSP110delE9 (en %)
CCR PRIMARIO	TMSS3	MSS	146	0	18,4
CCR PRIMARIO	TMSS4	MSS	146/145	0	16,3
CCR PRIMARIO	TMSS5	MSS	146/145	0	16,4
CCR PRIMARIO	TMSS6	MSS	146	0	18,7
CCR PRIMARIO	TMSS7	MSS	145	0	18,4
CCR PRIMARIO	TMSS8	MSS	146/145	0	16,0
CCR PRIMARIO	TMSS9	MSS	146	0	16,2

Tabla 2: Perfil alélico de la repetición T17 y nivel de expresión de HSP110delE9 en estirpes celulares con MSI y MSS y tumores primarios y en linfoblastos de control (LBL), * calculado restando el tamaño del alelo de HSP110 más corto a 146 en cada caso, ** respecto a la sobreexpresión de HSP110wt (PCR-RT cuantitativa).

Globalmente, esta secuencia era débilmente polimórfica en muestras competentes de MMR (Figura 4), mientras que estaba sistemáticamente mutada en 14/14 (100 %) de las estirpes celulares de CCR con MSI y en 43/43 (100 %) de los tumores primarios de CCR con MSI. Las deleciones alélicas oscilaban de 3 a 8 pares de bases más allá de la zona polimórfica (Figura 4 y Tabla 2). La mutación de T₁₇ de *HSP110* era más frecuente que todos los microsatélites codificadores reseñados en CCR primario con MSI (Figura 5). Esta mutación se detectaba también en 9/17 (53 %) de los adenomas que exhiben MSI, aunque con deleciones alélicas menores que las observadas con CCR primarios con MSI. La mutación de T₁₇ de *HSP110* era tan frecuente como la que afecta a *TGFR2* en dichas lesiones colónicas premalignas (Figura 5).

Sobreexpresión de ARNm de HSP100 negativo de exón 9 (HSP110delE9) en estirpes celulares de CCR con MSI y tumores primarios

Se confirmó en primer lugar mediante PCR-RT cuantitativa que los dos productos de PCR de *HSP110* observados en estirpes celulares de cáncer con MSI correspondían a ARNm alternativos de *HSP110* que contenían o carecían del exón 9 (Figura 6). Se cuantificaron tanto el ARNm de HSP110 que contiene el exón 9 (HSP110wt) como el ARNm de HSP110 que carece del exón 9 (HSP110delE9) de manera competitiva en estirpes celulares de CCR con MSI y MSS, así como en LBL con MSS (Tabla 2). Se observó que el ARNm de HSP110delE9 se expresaba débilmente en estirpes celulares de CCR con MSS, concretamente 10-20 veces menos que el ARNm de HSP110wt (Figura 7). En contraposición, la expresión de ARNm de HSP110delE9 era mayor en estirpes celulares de CCR con MSI y era significativamente diferente entre los CCR primarios con MSI ($N=43$) y MSS ($N=20$) ($P=8,5 \times 10^{-5}$; Figura 6 y Tabla 2).

La expresión de HSP110delE9 en CCR se correlaciona con el estado alélico de la repetición de ADN T₁₇ de HSP110

Se investigó si la mutación de la repetición de ADN intrónico T₁₇ de *HSP110* podría influir en la expresión de HSP110 en la serie de CCR primarios. Se asoció la longitud de la deleción de T₁₇ con una expresión significativamente aumentada de ARNm de HSP110delE9, en detrimento del transcrito de HSP110wt (Figura 8; $P=1,1 \times 10^{-13}$). Se confirmaron estos resultados a nivel de proteína cuantificando la cantidad de HSP110wt y HSP110delE9 en 10 CCR primarios con MSI que exhibían desplazamientos alélicos variables en la repetición T₁₇ (de 3 a 8 pb). Se observó aquí de nuevo una estrecha relación usando transferencia Western entre el nivel de expresión de HSP110delE9 y la longitud de la deleción microsatelital (Figura 9). Se concluyó que la mutación del microsatélite T₁₇ intrónico de *HSP110* era probablemente el evento causante que conducía a la expresión aberrante de esta chaperona en tumores colorrectales.

HSP110delE9 exhibe funciones chaperonas alteradas

La omisión del exón 9 de HSP110 es desplazamiento de marco y por lo tanto genera un codón de terminación prematura en el exón 10 del ARNm de HSP110delE9. La HSP110delE9 es una proteína truncada que contiene el dominio de unión a ATP N-terminal pero está desprovista del dominio de unión a sustrato (Figura 3). Se efectuaron varios ensayos funcionales para comprender mejor el papel de la expresión aumentada de HSP110delE9 en estirpes celulares de CCR con MSI. Se estudió en primer lugar la actividad chaperona usando un ensayo de termolabilidad de proteína que mide la capacidad *in vitro* de HSP110 de bloquear la agregación de proteína inducida por un choque térmico usando fibroblastos embrionarios de múrido (MEF). Aunque la HSP110wt exhibía una actividad antiagregación comparable a otras HSP tales como HSP70, la HSP110delE9 perdía esta actividad chaperona

(Figura 9). De forma interesante, este efecto era dominante negativo debido a que la actividad antiagregación de HSP110wt se anulaba si se añadía HSP110delE9 al mismo tiempo (Figura 9). Se ha mostrado que HSP110 se asocia con otras chaperonas tales como HSP70, y esto contribuye a la red chaperona celular global. Se ha confirmado aquí en células HCT116 que la HSP110wt interaccionaba eficazmente con HSP70 y con HSP27, pero no con HSP90. En contraposición, la HSP110delE9 perdía la capacidad de asociarse con HSP70 y HSP27, pero se asociaba fuertemente con HSP110wt, en línea con su efecto dominante negativo (Figura 10). Finalmente, la HSP110delE9 exhibía una localización celular alterada en comparación con HSP110wt. Aunque esta última se encontró tanto en núcleo como en citosol, la HSP110delE9 estaba limitada al citosol.

La HSP110delE9 bloquea la función antiapoptótica de HSP110wt y sensibiliza a las células cancerosas ante oxaliplatino

Una serie de estudios han descrito anteriormente el papel antiapoptótico de HSP110. Por lo tanto, se ha investigado el efecto sobre la apoptosis del truncamiento de HSP110 debido a la omisión del exón 9. Se transfectaron células HCT116 con HSP110wt o HSP110delE9 y se desencadenó la apoptosis usando el factor de muerte celular TRAIL (ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral). Como se esperaba, TRAIL inducía la apoptosis dependiente de la dosis y HSP110wt ejercía un efecto protector, como se demostraba por la aparición de marcadores apoptóticos bien conocidos, incluyendo escisión de caspasa 8, actividad de caspasa 3, escisión de la diana de caspasa 3 PARP, permeación de la membrana mitocondrial y condensación nuclear (Figura 11). En contraposición, la HSP110delE9 no solo carecía de las propiedades protectoras de HSP110wt, sino que era también capaz de bloquear su función antiapoptótica de manera dependiente de la dosis (Figura 12). Probablemente como consecuencia, la sobreexpresión de HSP110delE9 en diversas estirpes celulares de CCR con MSI (HCT116, LoVo), pero también con MSS (SW480), aumentaba su sensibilidad ante agentes anticancerosos tales como oxaliplatino, un fármaco usado comúnmente en el tratamiento complementario de pacientes de CCR (Figura 13).

La HSP110delE9 afecta a la supervivencia del paciente y a la respuesta a la quimioterapia

Se investigó a continuación si la HSP110delE9 era de importancia clínica evaluando la expresión de ARNm de HSP110delE9 respecto al transcrito de HSP110wt en CCR. En total, se incluyeron en este estudio 38 pacientes de CCR con MSI y 58 con MSS con datos clínicos. Se estratificaron los tumores con MSI en dos grupos según el nivel de expresión de HSP110delE9, concretamente tumores MSI-HSP110delE9^{High} (N= 9; 24 %) y MSI-HSP110delE9^{Low} (N= 29; 76 %), en que la relación de ARNm de HSP110delE9/HSP110wt estaba por encima y por debajo del 75 %, respectivamente (Figura 6). Como se esperaba, la supervivencia libre de enfermedad (DFS) de los pacientes estaba asociada positivamente a su estado de MSI tumoral (Figura 14). Además, los pacientes MSI-HSP110delE9^{High} exhibían excelentes DFS y respuesta a la quimioterapia, en contraposición con los pacientes MSS-HSP110delE9^{Neg} que no expresaban HSP110delE9 y con los pacientes MSI-HSP110delE9^{Low} (Figura 15). De forma importante, no se observó una diferencia significativa en las características clinicopatológicas de los pacientes con tumores MSI-HSP110delE9^{High} y MSI-HSP110delE9^{Low}, incluyendo etapa de Dukes, edad y género del paciente, localización del tumor primario y estado de mutación KRAS y BRAF (Tabla 3).

Anotación	Modalidad	Valor de P	Pacientes con CCR MSI-HSP110delE9 ^{High}	Pacientes con CCR MSI-HSP110delE9 ^{Low}
Etapas de Dukes	B	1	6 (11 %)	18 (7 %)
Etapas de Dukes	C	1	3 (22 %)	11 (7 %)
Localización tumoral	Colon izquierdo	0,34	1 (12 %)	9 (32 %)
Localización tumoral	Colon derecho	0,34	7 (88 %)	19 (68 %)
Sexo	F	0,45	5 (56 %)	11 (38 %)
Sexo	M	0,45	4 (44 %)	18 (62 %)
Estado de mutación del gen BRAF	Mutado	1	3 (33 %)	11 (39 %)
Estado de mutación del gen BRAF	Tipo silvestre	1	6 (67 %)	17 (61 %)
Estado de mutación del gen KRAS	Mutado	1	2 (22 %)	6 (21 %)
Estado de mutación del gen KRAS	Tipo silvestre	1	7 (78 %)	22 (79 %)
Estado de mutación del gen PIK3CA	Mutado	1	1 (11 %)	4 (15 %)
Estado de mutación del gen PIK3CA	Tipo silvestre	1	8 (89 %)	22 (85 %)

CIMP	Negativo	1	3 (33 %)	10 (36 %)
CIMP	Positivo	1	6 (67 %)	18 (64 %)
CIN	Bajo	1	7 (100 %)	27 (93 %)
CIN	Alto	1	0 (0 %)	2 (7 %)
Estado de mutación del gen <i>ATR</i> *	Mutado	0,45	6 (67%)	14 (48 %)
Estado de mutación del gen <i>ATR</i> *	Tipo silvestre	0,45	3 (33 %)	15 (52 %)
Estado de mutación del gen <i>BAX</i> *	Mutado	1	5 (56 %)	14 (48 %)
Estado de mutación del gen <i>BAX</i> *	Tipo silvestre	1	4 (44 %)	15 (52 %)
Estado de mutación del gen <i>BLM</i> *	Mutado	0,42	4 (44 %)	8 (28 %)
Estado de mutación del gen <i>BLM</i> *	Tipo silvestre	0,42	5 (56 %)	21 (72 %)
Estado de mutación del gen <i>GRB14</i> *	Mutado	1	4 (44 %)	11 (38 %)
Estado de mutación del gen <i>GRB14</i> *	Tipo silvestre	1	5 (56 %)	18 (62 %)
Estado de mutación del gen <i>GRK4</i> *	Mutado	1	3 (33 %)	8 (28 %)
Estado de mutación del gen <i>GRK4</i> *	Tipo silvestre	1	6 (67 %)	21 (72 %)
Estado de mutación del gen <i>IGF2R</i> *	Mutado	1	4 (44 %)	12 (41 %)
Estado de mutación del gen <i>IGF2R</i> *	Tipo silvestre	1	5 (56 %)	17 (59 %)
Estado de mutación del gen <i>RAD50</i> *	Mutado	0,15	7 (78 %)	14 (48 %)
Estado de mutación del gen <i>RAD50</i> *	Tipo silvestre	0,15	2 (22 %)	15 (52 %)
Estado de mutación del gen <i>RBBP8</i> *	Mutado	0,32	3 (33 %)	4 (14 %)
Estado de mutación del gen <i>RBBP8</i> *	Tipo silvestre	0,32	6 (67 %)	25 (86 %)
Estado de mutación del gen <i>RECQL</i> *	Mutado	0,31	0 (0 %)	5 (17 %)
Estado de mutación del gen <i>RECQL</i> *	Tipo silvestre	0,31	9 (100 %)	24 (83 %)
Estado de mutación del gen <i>TCF4</i> *	Mutado	1	4 (44 %)	13 (45 %)
Estado de mutación del gen <i>TCF4</i> *	Tipo silvestre	1	5 (56 %)	16 (55 %)
Estado de metilación del gen <i>MLH1</i>	Metilado	0,71	6 (67 %)	16 (55 %)
Estado de metilación del gen <i>MLH1</i>	No metilado	0,71	3 (33 %)	13 (45 %)
Estado de metilación del gen <i>MGMT</i>	Metilado	0,45	4 (44 %)	18 (62 %)
Estado de metilación del gen <i>MGMT</i>	No metilado	0,45	5 (56 %)	11 (38 %)

Tabla 3: Asociación entre las variables clinicopatológicas y la expresión de HSP110del9 en CCR con MSI (valores de p de la prueba exacta de Fisher, valores de p de la prueba de t para la edad); NA: no aplicable. *mutaciones en las secuencias de codificación microsatelitales con MSI (genes diana).

EJEMPLO 3: Discusión

- 5 Como otras HSP inducibles por el estrés, la HSP110 protege a la célula frente a condiciones adversas. Sin embargo, la HSP110 proporciona también funciones críticas específicas, puesto que la desactivación del gen *hsp110* tanto el levadura como *Drosophila* es mortal (Trott *et al.*, *Genetics* **170** (3), 1009 (2005)). La HSP110 no solo actúa como factor de intercambio nucleotídico para HSP70 (Andreasson *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** (43), 16519 (2008)), sino que también posee actividad antiagregación
- 10 chaperona. Es aproximadamente 4 veces más eficaz en la unión y estabilización de sustratos proteicos desnaturizados en comparación con HSC70 y HSP70 (Wang *et al.*, *Cancer Research* **63** (10), 2553 (2003)). Debido a su fuerte función chaperona (o mantenedora), la HSP110 es un muy buen portador antigénico y por lo

tanto se usa como proteína extracelular en la formulación de vacunas (Manjili *et al.*, *Cancer Research* **62** (6), 1737 (2002); Manjili *et al.*, *J. Immunol.* **171** (8), 4054 (2003)). La actividad chaperona de HSP110 es independiente del ATP pero requiere el dominio de unión a sustrato de la proteína. La forma de HSP110 truncada (HSP110delE9) debido a la omisión del exón 9 identificada aquí en CCR con MSI carece del dominio de unión a sustrato. Como consecuencia, ha perdido la función chaperona antiagregación de HSP110 y es incapaz de unirse a HSP70, perdiendo así también su función como factor de intercambio nucleotídico para las proteínas HSP70.

Una posible explicación para la sobreexpresión de HSP110 en células de CCR (Kai *et al.*, *Oncology Reports* **10** (6), 1777 (2003)) es que deben reconectar extensamente sus rutas metabólicas y de transducción de señal, volviéndose así dependientes de proteínas que son desechables para la supervivencia de células normales. Las propiedades tumorigénicas de HSP110, aunque no totalmente comprendidas, pueden explicarse en parte por sus propiedades antiapoptóticas (Ceballos *et al.*, *Oncogene* **24** (28), 4559 (2005); Gotoh *et al.*, *FEBS Letters* **560** (1-3), 19 (2004)). Se ha mostrado que la sobreexpresión de HSP110 protege frente a la muerte celular apoptótica en diferentes modelos celulares, incluyendo cáncer de colon. A la inversa, el agotamiento de HSP110 mediado por ARN interferentes pequeños induce la apoptosis de células HCT116 (Hosaka *et al.*, *Cancer Science* **97** (7), 623 (2006)). De forma interesante, se ha mostrado en este trabajo que se conseguía una inducción similar de la apoptosis de células HCT116 mediante la sobreexpresión de HSP110delE9 mutante. Los niveles significativos de expresión de HSP110delE9 estaban limitados a células de cáncer de colon que exhiben MSI, desfavoreciendo así su supervivencia. Es más, la HSP110delE9 no solo ha perdido las propiedades antiapoptóticas de HSP110 normal, sino que también se asocia con HSP110 para bloquear estas funciones protectoras de manera dependiente de la dosis. Además, cuando se sobreexpresa tanto en células de CCR con MSI como MSS, la HSP110delE9 sensibiliza a estas células ante la apoptosis inducida por fármacos quimioterapéuticos. Merece la pena destacar que estos efectos proapoptóticos se observan especialmente cuando la expresión de HSP110delE9 es similar o mayor a la de HSP110wt, como se muestra mediante los experimentos de transfección. Esto es probablemente debido al hecho de que cada molécula de HSP110delE9 forma un complejo con una molécula de HSP110wt, neutralizando por tanto su función de manera dominante.

La razón para la selección y expresión del mutante proapoptótico dominante negativo HSP110delE9 endógeno en CCR con MSI no está clara. Es una posible explicación que las repeticiones mononucleotídicas largas no codificantes tales como T₁₇, localizada en el intrón 8 de *HSP110*, son a menudo puntos clave para mutaciones en tumores con MSI debido a la deficiencia de MMR (Suraweera *et al.*, *Gastroenterology* **123** (6), 1804 (2002); Buhard *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **24** (2), 241 (2006)). Mientras que la mayoría de estos microsatélites son funcionalmente anónimos, unos pocos están dotados de actividad biológica. Aunque dan como resultado un efecto supresor tumoral, puede ocurrir una frecuente mutación de estas secuencias, como se muestra en el actual trabajo, representando por tanto el talón de Aquiles del proceso tumorigénico impulsado por MSI. Todas las muestras tumorales con MSI ensayadas aquí estaban mutadas en la repetición T₁₇ de *HSP110* y exhibían acumulación de HSP110delE9 a niveles variables. Aquellos con altos niveles de expresión de ARNm de HSP110delE9, concretamente por encima del umbral del 75 % de HSP110wt, representaban aproximadamente un 25 % de los tumores de colon con MSI. En línea con los resultados *in vitro*, se asociaban con una excelente supervivencia y con respuesta a la quimioterapia. Por otro lado, los pacientes de CCR con MSI-HSP110delE9^{Low} mostraban una supervivencia intermedia en comparación con pacientes de CCR MSI-HSP110delE9^{High} y con MSS.

Globalmente, estos resultados sugieren en gran medida un efecto clínico dependiente de la dosis de la expresión de HSP110delE9 en CCR. Son necesarios estudios adicionales que usen series mayores de pacientes de CCR para comprender cómo la expresión endógena de este mutante podría afectar tanto a su pronóstico como a la respuesta al tratamiento. Se prevé que la HSP110delE9 debería exhibir también una expresión aberrante en cánceres con MSI de otras localizaciones primarias tales como estómago, endometrio y otros sitios más recientemente reseñados (Duval *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (14), 5002 (2004)). Aparte, la orientación de HSP ha surgido como una estrategia de sensibilización interesante en la terapia de cáncer. Esta está impulsada por el conocimiento de que las HSP pueden tener funciones de tipo oncogénico y mediar la "adicción no oncogénica" de células tumorales estresadas que deben adaptarse a un microentorno hostil. Se están evaluando actualmente diferentes inhibidores de HSP90 (p.ej. 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina, 17AAG), HSP27 (p.ej., el oligonucleótido OGX-427) y HSP70 (p.ej., aptámeros peptídicos de HSP70 (Rerole *et al.*, *Cancer Research* **71** (2), 484 (2011))) en pacientes de cáncer, con algunos ya en ensayos clínicos de fase II/III (Jego *et al.*, *Cancer Letters*). De forma interesante, el presente trabajo es el primer informe de un inhibidor de HSP que se produce endógenamente por la célula. Se están diseñando actualmente péptidos pequeños que imitan la función sensibilizadora de HSP110delE9 y que podrían por lo tanto adaptarse fácilmente para terapia de cáncer.

EJEMPLO 4

El transcrito de HSP110delE9 contiene un codón de terminación prematura (PTC). En consecuencia, se degrada parcialmente por el sistema NMD en las células tumorales. Se han llevado a cabo experimentos y se ha demostrado que el transcrito de HSP110delE9 se degradaba parcialmente por el sistema NMD, como otros PTC + ARNm generados mediante MSI en células de cáncer de colon con MSI. La reexpresión de HSP110delE9 causa en consecuencia la apoptosis de estirpes celulares de tumores de colon con MSI (datos no mostrados). La síntesis de compuestos químicos o biológicos que imitan la actividad de HSP110delE9 en células tumorales, en particular que imitan su efecto antiapoptótico, puede tener un gran interés terapéutico en el tratamiento de CCR. Del mismo modo,

el uso de compuestos susceptibles de promover la expresión de HSP110delE9 en células tumorales sería de gran interés. Es particularmente el caso de compuestos que inhiben el sistema de descomposición de ARNm mediada por mutaciones terminadoras (NMD). Están ahora disponibles diferentes inhibidores farmacológicos de NMD. Pueden usarse para reproducir estos experimentos, tanto *in vitro* en diferentes modelos celulares como en modelos animales (ratones atímicos xenoinjertados con CCR con MSI en primera línea).

EJEMPLO 5

Métodos

Pacientes y especímenes

Se identifican en este estudio 365 pacientes que experimentaron resección quirúrgica de adenocarcinomas colorrectales histológicamente probados que exhibían un fenotipo de MSI no ambiguo en uno de los 6 centros clínicos (Hôpital Saint-Antoine, París, Francia; CHU de Dijon, Dijon, Francia; CHU de Toulouse Purpan, Toulouse, Francia; Centre Antoine Lacassagne, Niza, Francia; St John of God Pathology, Subiaco, Australia; National University Hospital, Singapur). Para estos pacientes, estaban disponibles datos clínicos y podían recuperarse tejidos tumorales de la colección tumoral. Se realizó el estudio según las recomendaciones de las autoridades institucionales. Se trataron los pacientes de CCR con MSI con 5-fluorouracilo más leucovorina, solo o en combinación con otros fármacos tales como oxaliplatino. Se valoró uniformemente la recurrencia, concretamente por examen físico con pruebas biológicas y medidas del nivel de antígeno carcinoembrionario, rayos X pulmonares y ultrasonografía abdominal o tomografía computerizada cada 3 meses durante los primeros 3 años después de la cirugía, y después cada 6 meses durante 2 años y después anualmente. Se definió el seguimiento de pacientes como el tiempo entre la cirugía y el último contacto con el hospital o recurrencia de la enfermedad. En este estudio, se examinó la supervivencia libre de recaída en una cohorte de 282 pacientes de CCR con MSS de edad, género, localización del tumor primario y estado del tumor coincidentes (Tablas 4 a 7).

Anotación	Valor	ANÁLISIS UNIVARIADO					
		N	nº eventos	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Etapas (ref= II)	III	587	141	2,4	1,7-3,4	$1,50 \times 10^{-7}$	$5,98 \times 10^{-8}$
Edad (ref <75 a)	≥75 a	587	142	1,6	1,1-2,2	0,0081	0,0076
Quimioterapia (ref= no)	Sí	587	142	1,5	1,1-2,2	0,018	0,017
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	587	142	0,57	0,32-1	0,063	0,060
HNPCC (ninguno)	HNPCC	166	35	0,42	0,16-1,1	0,073	0,064
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	582	140	1,5	0,99-2,4	0,058	0,070
	Recto	582	140	0,42	0,057-3,1	0,4	0,070
Estado de MSI (ref= MSI)	MSS	587	142	1,3	0,92-1,8	0,15	0,15
Género (ref= F)	M	587	142	0,83	0,59-1,2	0,27	0,26
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2	126	41	0,95	0,5-1,8	0,88	0,88

Tabla 4: Análisis univariado en pacientes de CCR con MSI y MSS en etapa II y etapa III

Anotación	Valor	ANÁLISIS MULTIVARIADO				
		N	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Etapa (ref= II)	III	582	2,4	1,6-3,6	$3,90 \times 10^{-5}$	$2,60 \times 10^{-7}$
Edad (ref <75 a)	≥75 a	582	1,4	0,98-2,1	0,062	
Quimioterapia (ref= no)	Sí	582	1,1	0,67-1,7	0,8	
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	582	0,51	0,27-0,97	0,041	
HNPCC (ninguno)	HNPCC					
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	582	1,4	0,87-2,2	0,17	
	Recto	582	0,45	0,06-3,3	0,43	
Estado de MSI (ref= MSI)	MSS	582	1,2	0,81-1,6	0,44	
Género (ref= F)	M	582	0,96	0,67-1,4	0,82	
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2					

Tabla 5: Análisis multivariado en pacientes de CCR con MSI y MSS en etapa II y etapa III

Anotación	Valor	ANÁLISIS UNIVARIADO					
		N	nº eventos	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	171	66	0,17	0,042-0,7	0,014	0,0051
Estado de MSI (ref= MSI)	MSS	171	66	1,5	0,91-2,4	0,11	0,11
Quimioterapia compl. efect.	Sí	171	66	0,7	0,43-1,1	0,15	0,15
Género (ref= F)	M	171	66	0,72	0,43-1,2	0,21	0,21
HNPCC (ninguno)	HNPCC	45	14	0,51	0,12-2,3	0,38	0,38
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2	89	33	0,75	0,37-1,5	0,43	0,42
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	168	65	1,3	0,68-2,3	0,46	0,75
	Recto	168	65	1	0,13-7,7	0,99	0,75
Edad (ref <75 a)	≥75 a	171	66	1	0,64-1,7	0,86	0,86

Tabla 6: Análisis univariado de pacientes de CCR con MSI y MSS en etapa III

Anotación	Valor	ANÁLISIS MULTIVARIADO				
		N	H.R.	I.C. de. 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	168	0,17	0,041-0,73	0,017	0,045
Estado de MSI (ref= MSI)	MSS	168	1,2	0,71-2	0,5	
Quimioterapia comp. efect.	Sí	168	0,61	0,33-1,1	0,1	
Género (ref= F)	M	168	0,71	0,4-1,2	0,22	
HNPCC (ninguno)	HNPCC					
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2					
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	168	1,3	0,67-2,5	0,43	
	Recto	168	1,3	0,16-10	0,81	
Edad (ref <75 a)	≥75 a	168	0,71	0,38-1,3	0,26	

Tabla 7: Análisis multivariado de pacientes de CCR con MSI y MSS en etapa III

Análisis de la inestabilidad microsatelital de la repetición T_{17} en HSP110

Se extrajo ADN tumoral de muestras usando el kit QIAamp DNA Tissue Kit (Qiagen). Para evaluar la MSI o el estado deficiente de MMR, se efectuaron PCR quintuple o tinción con inmunoperoxidasa sobre tejido tumoral fijado con formalina usando anticuerpos primarios de MLH1, MSH2, MSH6 o PMS2, respectivamente. Se evaluó el estado de mutación de T_{17} de HSP110 por PCR y genotipado de fluorescencia en la serie de 365 muestras de CCR con MSI y en la serie de control de 405 muestras de tumor de colon con MSS (incluyendo los 282 CCR que se usaron para examinar la supervivencia libre de recaída en los pacientes de CCR con MSS), como se describe en Dorard *et al.*, *Nature Medicine* 17: 1283-1289 (2011).

Análisis estadístico

Para el análisis de las asociaciones con el resultado clínico de pacientes, se usó la supervivencia libre de recaída y se definió como el tiempo desde la cirugía hasta la primera recurrencia (recaída o muerte). Se obtuvieron las curvas de supervivencia según el método de Kaplan y Meier y se valoraron las diferencias entre las distribuciones de supervivencia mediante la prueba de rangos logarítmicos usando un punto final a los 5 años. Se computerizaron modelos univariados y multivariados usando la regresión de riesgos proporcionales de Cox. Para análisis multivariados, como han de valorarse todas las variables en las mismas muestras para ser comparables, no se incluyeron en el modelo multivariado las variables disponibles solo para un subconjunto de muestras.

Para encontrar el tamaño mínimo de delección de T_{17} en HSP110 que estaba asociado a un resultado clínico, se efectuaron análisis en pacientes en etapa III a partir de la cohorte anteriormente estudiada descrita en Dorard *et al.*, *Nature Medicine* 17: 1283-1289 (2011). Se ensayaron todos los umbrales que definen dos clases de tamaño de delección (de 2 a 5 pares de bases). El umbral seleccionado fue aquel que mostraba la asociación más significativa con el resultado clínico. Por tanto, se clasificaron todos los tumores en dos clases, que representan delección de HSP110 grande (Del^L) y pequeña (Del^S). Se investigó de la misma manera la subdivisión entre la clase de tumores de delección pequeña, pero usando los pacientes en etapa III para todo el conjunto de datos para tener un tamaño de muestra suficiente.

Se ensayaron las diferencias entre los grupos de tamaño de delección de HSP110 y otras anotaciones clínicas para significación estadística usando la prueba exacta de Fisher para variables categóricas, o una prueba de t de Student no emparejada para variables continuas.

Se confirmó el ajuste de la población de CCR con MSS a CCR con MSI en etapa II y III evaluando las diferencias entre el estado de MSI y otras anotaciones clínicas como se describen anteriormente para los dos grupos de tamaño de HSP110.

Para todos los análisis, los valores de P menores de 0,05 se consideraron indicativos de significación estadística.

Resultados

Estado de T_{17} de HSP110 de CCR con MSI y MSS

La población de estudio consistía en una serie consecutiva, multicéntrica y retrospectiva de 365 pacientes con adenocarcinoma colorrectal patológicamente confirmado que exhibían MSI sin ambigüedad usando criterios bien establecidos.

Se evaluó el estado de T_{17} de HSP110 en una serie de control de 405 CCR con MSS (5,2 % en etapa 0, 18,5 % en etapa I, 20,5 % en etapa II, 21,7 % en etapa III, 14,3 % en etapa IV y 19,8 % desconocido). Como se muestra en la Figura 16, las longitudes alélicas eran de T_{16} o T_{17} en todos los casos, dentro de la zona polimórfica reseñada⁶. De los 365 tumores con MSI, 353 (96,7 %) mostraban delecciones de hasta 7 pares de bases que estaban fuera de la zona polimórfica. Se muestran en la Figura 17 la frecuencia y distribución de los diferentes alelos de T_{17} mutantes de HSP110 en CCR con MSI.

Estado de mutación de T_{17} de HSP110 y supervivencia de los pacientes de CCR con MSI

Se investigó la presunta relevancia clínica de las mutaciones de T_{17} de HSP110 en CCR con MSI en etapa II y etapa III. Esto se examinó en primer lugar en una cohorte inicial de 98 tumores en etapa II o etapa III. Se agruparon los pacientes en dos grupos que exhibían delecciones grandes ($\Delta T \geq 5$ pb, que comprende T_{11} , T_{10} y T_9 ; HSP110Del^L) o delecciones pequeñas ($0 \leq \Delta T < 5$, que comprende T_{17} , T_{16} , T_{15} , T_{14} , T_{13} y T_{12} ; HSP110Del^S con MSI). Aunque el número de casos de HSP110Del^L en etapa III era pequeño ($n = 8$), estos pacientes mostraban una excelente supervivencia en comparación con los casos de HSP110Del^S ($P = 0,065$; Figura 18). No resultaba evidente dicha diferencia en la supervivencia para los casos en etapa II (Figura 18). Se obtuvieron resultados similares en una cohorte de validación multicéntrica de 231 pacientes de CCR con MSI en etapa II o III (Figura 19). Cuando se combinaron las dos cohortes, la diferencia en la supervivencia entre los pacientes de CCR HSP110Del^L y HSP110Del^S con MSI en etapa III alcanzó la significación ($P = 0,013$; Figura 20). El uso de otros puntos de corte para clasificar los mutantes ($\Delta T = 2, 3$ o 4 pb) no condujo a grupos de supervivencia significativamente diferentes (Figura 21). En el análisis multivariado, el estado de mutación de T_{17} de HSP110 estaba significativamente asociado a una supervivencia libre de recaída en CCR con MSI en etapa II y III (Tablas 8 a 13).

Variable	Valor	ANÁLISIS UNIVARIADO					
		N	n	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Etapa tumoral (ref= II)	III	329	70	2,1	1,3-3,3	0,0027	0,0022
Edad (ref <75 a)	≥ 57	329	70	1,7	1,1-2,8	0,024	0,022
HPNCC (ninguno)	HPNCC	166	35	2,4	0,92-6,1	0,073	0,064
Localización tumoral (ref= CI)	CD	324	68	1,9	0,96-3,9	0,064	0,13
	Recto	324	68	0,91	0,12-7,2	0,93	
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	329	70	0,63	0,34-1,2	0,14	0,14
Quimioterapia (ref= no)	Sí	329	70	1,2	0,74-2,1	0,41	0,41
Tipo de quimioterapia (Ref= FOLFOX)	LV5FU2	72	17	1,4	0,51-4,1	0,49	0,49
Género (ref= F)	M	329	70	0,86	0,53-1,4	0,56	0,56

Tabla 8: Asociación de anotaciones clínicas y moleculares con el resultado clínico (supervivencia libre de recaída) en análisis de Cox univariado en pacientes de CCR con MSI en etapa II y III. CCR: cáncer colorrectal; MSI: inestabilidad microsatelital; a: años; CI: colon izquierdo; CD: colon derecho; F: mujer; M: hombre; RFS: supervivencia libre de recaída. HPNCC y tipo de quimioterapia no se incluyeron en el análisis multivariado debido a su menor tamaño de muestra.

Variable	Valor	ANÁLISIS MULTIVARIADO				
		N	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Etapas tumorales (ref= II)	III	324	2	1,1-3,5	0,015	0,0036
Edad (ref <75 a)	≥ 57	324	1,6	0,91-2,9	0,097	
HNPCC (ninguno)	HNPCC					
Localización tumoral (ref= CI)	CD	324	1,9	0,91-3,9	0,089	
	Recto	324	0,89	0,11-7,1	0,92	
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	324	0,51	0,26-0,98	0,042	
Quimioterapia (ref= no)	Sí	324	0,51	0,63-2,4	0,54	
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2					
Género (ref= F)	M	324	1	0,61-1,7	0,97	

Tabla 9: Asociación de anotaciones clínicas y moleculares con el resultado clínico (supervivencia libre de recaída) en análisis de Cox multivariado de pacientes de CCR con MSI en etapa II y III. CCR: cáncer colorrectal; MSI: inestabilidad microsatelital; a: años; CI: colon izquierdo; CD: colon derecho; F: mujer; M: hombre; RFS: supervivencia libre de recaída. HNPCC y tipo de quimioterapia no se incluyeron en el análisis multivariado debido a su menor tamaño de muestra.

5

Anotación	Valor	ANÁLISIS MULTIVARIADO					
		N	nº eventos	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	100	31	0,2	0,047-0,83	0,026	0,013
Género (ref= F)	M	100	31	0,58	0,26-1,3	0,19	0,18
Quimioterapia (ref= no)	Sí	100	31	0,71	0,35-1,4	0,35	0,34
HNPCC (ninguno)	HNPCC	45	14	0,51	0,12-2,3	0,38	0,38
Edad (ref <75 a)	≥75 a	100	31	1,2	0,59-2,4	0,63	0,63
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2	48	13	1,3	0,38-4,2	0,7	0,70
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	97	30	1,3	0,53-3,2	0,56	0,84
	Recto	97		1,3	0,16-11	0,81	

Tabla 10: Análisis univariado de pacientes de CCR con MSI en etapa III

Anotación	Valor	ANÁLISIS MULTIVARIADO				
		N	H.R.	I.C. deL 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	97	0,17	0,04-0,73	0,018	0,11
Género (ref= F)	M	97	0,52	0,21-1,3	0,15	
Quimioterapia (ref= no)	Sí	97	0,76	0,26-2,3	0,63	
HNPCC (ningunO)	HNPCC					
Edad (ref <75 a)	≥75 a	97	0,78	0,26-2,3	0,65	
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2					
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	97	1,4	0,54-3,6	0,48	
	Recto	97	1,6	0,18-15	0,66	

Tabla 11: Análisis multivariado de pacientes de CCR con MSI en etapa III

Anotación	Valor	ANÁLISIS UNIVARIADO					
		N	Nº eventos	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	77	20	0,14	0,019-1,1	0,057	0,026
Etapa tumoral (ref= 2)	III	77	20	1,7	0,6-4,6	0,33	0,32
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2	72	17	1,4	0,51-4,1	0,49	0,49
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	77	20	2	0,6-7	0,26	0,51
	Recto	77	20	1,6	0,17-16	0,67	0,51
HNPCC (ninguno)	HNPCC	27	6	1,5	0,31-7,6	0,6	0,60
Género (ref= F)	M	77	20	0,82	0,33-2	0,66	0,66
Edad (ref <75 a)	≥75 a	77	20	1,2	0,34-4	0,81	0,81

Tabla 12: Análisis univariado en pacientes de CCR con MSI bajo quimioterapia

Anotación	Valor	ANÁLISIS MULTIVARIADO				
		N	H.R.	I.C. del 95 %	Valor de p de la modalidad	Valor de p del modelo
Del HSP110 (ref= pequeña)	Grande	72	0,099	0,012-0,78	0,028	0,19
Género (ref= F)	M	72	2	0,62-6,3	0,25	
Quimioterapia (ref= no)	Sí	72	1,3	0,43-3,7	0,67	
HNPCC (ninguno)	HNPCC	72	2,4	0,66-9	0,18	
Edad (ref <75 a)	≥75 a	72	1,6	0,5-16	0,7	
Tipo de quimioterapia (ref= FOLFOX)	LV5FU2					
Localización tumoral (ref= colon izquierdo)	Colon derecho	72	0,73	0,25-2,1	0,55	
	Recto	72	1	0,22-4,9	0,98	

Tabla 13: Análisis multivariado de pacientes de CCR con MSI bajo quimioterapia

Entre los parámetros clínicos, la única asociación positiva observada era entre HSP110Del^L y la localización tumoral proximal ($P=0,027$; Tablas 14 y 15).

5

Anotación	Modalidad	N	Pacientes de CCR con MSI en etapa II y III			
			n	Valor de P	HSP110Del ^S	HSP110Del ^L
Etapa tumoral	II	329	229	0,89	175 (69 %)	54 (71 %)
	III		100		78 (31 %)	22 (29 %)
Localización tumoral	CI	324	70	0,027*	60 (24 %)	10 (13 %)
	CD		246		181 (73 %)	65 (87 %)
	Recto		8		8 (3 %)	0 (0 %)
Género	F	329	197	0,59	149 (59 %)	48 (63 %)
	M		132		104 (41 %)	28 (37 %)
Edad de diagnóstico	NA	329	329	0,14	74	77,5
Evento de RFS	0	329	258	0,2	194 (77 %)	64 (84 %)
	1		71		59 (23 %)	12 (16 %)
Quimioterapia efectuada	LV5FU2	318	42	0,94	31 (13 %)	11 (15 %)
	FOLFOX		30		23 (9 %)	7 (9 %)
	FUFOL		2		2 (1 %)	0 (0 %)
	Ninguna		244		188 (77 %)	56 (76 %)
HNPCC	HNPCC	166	44	1	32 (26 %)	12 (27 %)
	Ninguno		122		89 (74 %)	33 (73 %)

Anotación	Modalidad	N	Pacientes de CCR con MSI en etapa II y III			
			n	Valor de P	HSP110Del ^S	HSP110Del ^L
HPNCC deducido	HPNCC	329	63	1	49 (19 %)	14 (18 %)
	Ninguno		266		204 (81 %)	62 (82 %)
TOTAL		329	-	-	253 (77 %)	76 (23 %)

Tabla 14: Asociación de las anotaciones clínicas con el estado de delección de HSP110 en pacientes de CCR con MSI en etapa II y III. CCR: cáncer colorrectal; MSI: inestabilidad microsatelital; CI: colon izquierdo; CD: colon derecho; F: mujer; M: hombre; RFS: supervivencia libre de recaída; N: número total de pacientes con anotación; n= número de pacientes para la modalidad dada; HPNCC deducido: pacientes jóvenes (< 50 años) con CCR de MSI; valor de P: valor de P de la prueba exacta de Fisher; los valores de *P sin el recto son de 0,039 y 0,088 en pacientes de la etapa 2 y 3 y en pacientes de la etapa 3, respectivamente.

5

Anotación	Modalidad	N	Pacientes de CCR con MSI en etapa III			
			n	Valor de P	HSP110Del ^S	HSP110Del ^L
Etapa tumoral	II	329		0,89		
	III		100		78 (100 %)	22 (100 %)
Localización tumoral	CI	97	22	0,15*	20 (27 %)	2 (9 %)
	CD		72		52 (69 %)	20 (91 %)
	Recto		3		3 (4 %)	0 (0 %)
Género	F	100	64	0,21	47 (60 %)	17 (77 %)
	M		36		31 (40 %)	5 (23 %)
Edad de diagnóstico	NA	100	100	0,54	75,15	75,5
Evento de RFS	0	100	69	0,017	49 (63 %)	20 (91 %)
	1		31		29 (37 %)	2 (9 %)
Quimioterapia efectuada	N	100	49	0,23	41 (53 %)	8 (36 %)
	S		51		37 (47 %)	14 (64 %)
Tipo de quimioterapia	LV5FU2	96	28	0,49	20 (27 %)	8 (36 %)
	FOLFOX		20		14 (19 %)	6 (27 %)
	FUFOL		1		1 (1 %)	0 (0 %)
	Ninguna		47		39 (53 %)	8 (36 %)
HNPCC	HNPCC	45	10	1	8 (23 %)	2 (20 %)
	Ninguno		35		27 (77 %)	8 (80 %)
HPNCC deducido	HPNCC	100	18	0,76	15 (19 %)	3 (14 %)
	Ninguno		82		63 (81 %)	19 (86 %)
TOTAL		100	-	-	78 (78 %)	22 (22 %)

Tabla 15: Asociación de las anotaciones clínicas con el estado de delección de HSP110 en pacientes de CCR con MSI en etapa III. CCR: cáncer colorrectal; MSI: inestabilidad microsatelital; CI: colon izquierdo; CD: colon derecho; F: mujer; M: hombre; RFS: supervivencia libre de recaída; N: número total de pacientes con anotación; n= número de pacientes para la modalidad dada; HNPCC deducido: pacientes jóvenes (<50 años) de CCR con MSI; valor de P: valor de P de la prueba exacta de Fisher. Los valores de P* sin el recto son de 0,039 y 0,088 en pacientes en etapa

10

2 y 3 y en pacientes en etapa 3, respectivamente.

Estado de mutación de T_{17} de *HSP110* y supervivencia de pacientes de CCR con MSI tratados con 5-fluorouracilo

Se ha mostrado que la chaperona mutante HSP110DE9 causaba la sensibilización de las células de cáncer de colon ante agentes quimioterapéuticos, incluyendo 5-fluorouracilo y oxaliplatino, *in vitro*. En el presente estudio, se examinó la supervivencia libre de recaída de pacientes de CCR tratados con quimioterapia complementaria basada en 5-fluorouracilo con relación a su estado de mutación de T_{17} de *HSP110*. En la cohorte global de pacientes, los sujetos de CCR HSP110Del^L con MSI que recibieron quimioterapia complementaria mostraron una supervivencia libre de recaída significativamente mejor en comparación con pacientes HSP110Del^S ($P=0,026$; Figura 22). Los sujetos de CCR HSP110Del^L con MSI exhibían una excelente supervivencia, independientemente del régimen de quimioterapia complementaria usado. Puesto que se ha reseñado que los pacientes de CCR con MSI no se benefician de la quimioterapia complementaria con 5-fluorouracilo solo, se investigó a continuación el estado de mutación de T_{17} de *HSP110* en este grupo particular de pacientes de CCR con MSI. Los pacientes con CCR HSP110Del^L con MSI exhibían una excelente supervivencia en comparación con pacientes de CCR HSP110Del^S con MSI (Figura 23). Los modelos multivariados confirmaron que la supervivencia de los pacientes de CCR con MSI tratados con quimioterapia dependía del estado de mutación de T_{17} de *HSP110* (Tablas 10 a 15).

Discusión

Se presentan en la presente memoria los resultados del análisis de una serie amplia, consecutiva, multicéntrica y retrospectiva de 365 pacientes de CCR con MSI. Se determinaron las deleciones en el microsatélite T_{17} de *HSP110* usando un método de genotipado por PCR-fluorescencia sensible, establecido y altamente reproducible (Buhard *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 24: 241-251, (2006)). Usando este enfoque, y clasificando además los CCR con MSI según el tamaño de la deleción de T_{17} de *HSP110*, se observaron dos grupos de pacientes en etapa III con índices de supervivencia libre de recaída muy diferentes. Los pacientes con deleciones grandes (HSP110Del^L; $\Delta T=5-7$ pb), y que dan cuenta de aproximadamente un 20 % de todos los CCR con MSI en etapa III, mostraban un excelente pronóstico, con solo 2/22 (9 %) recaídas después de 5 años, en comparación con más de un 40 % de los pacientes HSP110Del^S ($\Delta T=0-4$ pb). Por tanto, globalmente estos datos indican que las deleciones grandes en la repetición T_{17} de *HSP110* son un pronóstico de supervivencia mejorada de pacientes de CCR con MSI en etapa III. El uso de otros puntos de corte para clasificar los mutantes no conducía a grupos de supervivencia significativamente diferentes. Sin embargo, cuanto más cercano a 5 es el punto de corte entre las deleciones grandes y pequeñas, más significativa es la diferencia en términos de supervivencia libre de recaída en CCR en etapa III. En cualquier caso, 5 es el único valor de corte que permite la identificación de un grupo libre de recaída de pacientes de CCR con MSI en etapa III.

Otra cuestión importante es si el estado de mutación de T_{17} de *HSP110* proporciona un vínculo mecanístico para la diferente supervivencia observada para pacientes HSP110Del^L y HSP110Del^S con MSI en etapa III. Los pacientes con tumores HSP110Del^L con MSI en etapa II y etapa III mostraban una excelente supervivencia, independientemente de si la quimioterapia complementaria que recibían era 5-fluorouracilo solo o en combinación con otros fármacos. Por ello, la determinación del estado de T_{17} de *HSP110* puede ser un marcador predictivo valioso para los pacientes de CCR con MSI que se beneficiarán de la quimioterapia complementaria. Merece la pena destacar que los pacientes de CCR HSP110Del^L con MSI exhibían una excelente supervivencia cuando se trataban con 5-fluorouracilo solo, y que la diferencia en supervivencia permanecía significativa cuando se comparaba con sujetos de CCR HSP110Del^S con MSI. De forma importante, no había asociación entre el estado de mutación de *HSP110* y la edad o estado de HNPCC del paciente, que se habían sugerido recientemente como criterios que influían en la respuesta a este agente anticanceroso en CCR con MSI. Estos hallazgos pueden tener implicaciones clínicas importantes para el uso de terapia complementaria en pacientes de CCR. Si se confirman mediante análisis adicionales de cohortes de pacientes bien caracterizados o mediante estudios prospectivos, aleatorizados y controlados, indicarían que el estado mutacional de T_{17} de *HSP110* podría usarse para dirigir una quimioterapia complementaria racional en CCR con MSI. En la presente cohorte, los pacientes de CCR HSP110Del^L con MSI exhibían una excelente supervivencia cuando se trataban con FOLFOX, pero la diferencia en supervivencia no alcanzaba significación cuando se comparaba con sujetos de CCR HSP110Del^S con MSI.

Los hallazgos anteriores proporcionan evidencias de una capa adicional de heterogeneidad clínica entre los cánceres de colon con MSI relacionada con el estado mutacional de *HSP110*. Se comparó por lo tanto la supervivencia de pacientes de CCR HSP110Del^S y HSP110Del^L con MSI con la de una cohorte de edad, género, sitio tumoral y etapa coincidentes de 282 pacientes con MSS. La supervivencia de los pacientes HSP110Del^L con MSI era significativamente mejor que la de pacientes HSP110WT con MSS tanto en los grupos de pacientes en etapa III como tratados con terapia complementaria. No se observaron diferencias significativas entre los grupos de pacientes HSP110WT con MSS y HSP110Del^S con MSI. Para los pacientes tratados con 5-fluorouracilo como único agente quimioterapéutico, no se observó una diferencia significativa entre la supervivencia de los grupos con MSI y MSS. Sin embargo, los pacientes HSP110Del^S con MSI exhibían una supervivencia similar a los casos de HSP110WT con MSS tratados con 5-fluorouracilo, mientras que la supervivencia de los pacientes HSP110Del^L con MSI era significativamente mejor. En modelos multivariados que incluyen pacientes de CCR con MSI y MSS, el estado de la mutación de T_{17} de *HSP110* estaba significativamente asociado a la supervivencia libre de recaída en

pacientes de CCR (Tabla 4). Estos últimos resultados sugieren que el estado mutacional de T₁₇ de *HSP110* puede ser superior a la MSI como biomarcador predictivo. Resaltan el problema de la heterogeneidad clínica en CCR y, si se confirma por estudios prospectivos, deberían conducir a la reconsideración del comportamiento clínico de tumores colorrectales con MSI y MSS más genéricamente.

- 5 Los datos presentados aquí indican que el análisis genotípico de la repetición T₁₇ de *HSP110* proporciona nuevos conocimientos de las características clínicas de CCR con MSI. Este método sencillo puede usarse para determinar el estado de mutación de *HSP110* de muestras de ADN tumoral tanto recientes como embebidas en parafina. Podría recomendarse por tanto rutinariamente, junto con la investigación del fenotipo de inestabilidad microsatelital, en estudios prospectivos, aleatorizados y controlados para confirmar que el estado mutacional de T₁₇ de *HSP110* en tumores de colon podría usarse para ayudar a los médicos a seleccionar subconjuntos de pacientes que se beneficiarían lo más probablemente de quimioterapia complementaria citotóxica.
- 10

LISTA DE SECUENCIAS

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

5 <120> MUTANTE DE HSP110 DOMINANTE NEGATIVO Y SU USO EN EL PRONÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DE CÁNCERES

<130> BET12P0248

10 <150> EP11305330.0
<151> 24-03-2011

<160> 23

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 380

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ser Val Val Gly Leu Asp Val Gly Ser Gln Ser Cys Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Phe Ser Asp
20 25 30

Arg Cys Thr Pro Ser Val Ile Ser Phe Gly Ser Lys Asn Arg Thr Ile
35 40 45

Gly Val Ala Ala Lys Asn Gln Gln Ile Thr His Ala Asn Asn Thr Val
50 55 60

Ser Asn Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Asn Asp Pro Phe Ile
65 70 75 80

Gln Lys Glu Lys Glu Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu Lys Asn
85 90 95

Gly Gly Val Gly Ile Lys Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe
100 105 110

Ser Val Glu Gln Ile Thr Ala Met Leu Leu Thr Lys Leu Lys Glu Thr
115 120 125

Ala Glu Asn Ser Leu Lys Lys Pro Val Thr Asp Cys Val Ile Ser Val
130 135 140

Pro Ser Phe Phe Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Leu Asp Ala Ala
145 150 155 160

ES 2 575 980 T3

Gln Ile Val Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Asp Met Thr Ala
165 170 175

Val Ala Leu Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Ser Leu Asp
180 185 190

Glu Lys Pro Arg Ile Val Val Phe Val Asp Met Gly His Ser Ala Phe
195 200 205

Gln Val Ser Ala Cys Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu Gly
210 215 220

Thr Ala Phe Asp Pro Phe Leu Gly Gly Lys Asn Phe Asp Glu Lys Leu
225 230 235 240

Val Glu His Phe Cys Ala Glu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Leu Asp Ala
245 250 255

Lys Ser Lys Ile Arg Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys
260 265 270

Leu Lys Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu Pro Leu Asn Ile
275 280 285

Glu Cys Phe Met Asn Asp Lys Asp Val Ser Gly Lys Met Asn Arg Ser
290 295 300

Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu Leu Gln Lys Ile Glu Val Pro
305 310 315 320

Leu Tyr Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val Glu Asp Val Ser
325 330 335

Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu
340 345 350

Arg Ile Ala Lys Phe Phe Gly Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala
355 360 365

Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys
370 375 380

<210> 2

<211> 858

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 575 980 T3

<400> 2

Met Ser Val Val Gly Leu Asp Val Gly Ser Gln Ser Cys Tyr Ile Ala
1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Gly Gly Ile Glu Thr Ile Ala Asn Glu Phe Ser Asp
20 25 30

Arg Cys Thr Pro Ser Val Ile Ser Phe Gly Ser Lys Asn Arg Thr Ile
35 40 45

Gly Val Ala Ala Lys Asn Gln Gln Ile Thr His Ala Asn Asn Thr Val
50 55 60

Ser Asn Phe Lys Arg Phe His Gly Arg Ala Phe Asn Asp Pro Phe Ile
65 70 75 80

Gln Lys Glu Lys Glu Asn Leu Ser Tyr Asp Leu Val Pro Leu Lys Asn
85 90 95

Gly Gly Val Gly Ile Lys Val Met Tyr Met Gly Glu Glu His Leu Phe
100 105 110

Ser Val Glu Gln Ile Thr Ala Met Leu Leu Thr Lys Leu Lys Glu Thr
115 120 125

Ala Glu Asn Ser Leu Lys Lys Pro Val Thr Asp Cys Val Ile Ser Val
130 135 140

Pro Ser Phe Phe Thr Asp Ala Glu Arg Arg Ser Val Leu Asp Ala Ala
145 150 155 160

Gln Ile Val Gly Leu Asn Cys Leu Arg Leu Met Asn Asp Met Thr Ala
165 170 175

Val Ala Leu Asn Tyr Gly Ile Tyr Lys Gln Asp Leu Pro Ser Leu Asp
180 185 190

Glu Lys Pro Arg Ile Val Val Phe Val Asp Met Gly His Ser Ala Phe
195 200 205

Gln Val Ser Ala Cys Ala Phe Asn Lys Gly Lys Leu Lys Val Leu Gly
210 215 220

Thr Ala Phe Asp Pro Phe Leu Gly Gly Lys Asn Phe Asp Glu Lys Leu
225 230 235 240

Val Glu His Phe Cys Ala Glu Phe Lys Thr Lys Tyr Lys Leu Asp Ala
245 250 255

ES 2 575 980 T3

Lys Ser Lys Ile Arg Ala Leu Leu Arg Leu Tyr Gln Glu Cys Glu Lys
 260 265 270
 Leu Lys Lys Leu Met Ser Ser Asn Ser Thr Asp Leu Pro Leu Asn Ile
 275 280 285
 Glu Cys Phe Met Asn Asp Lys Asp Val Ser Gly Lys Met Asn Arg Ser
 290 295 300
 Gln Phe Glu Glu Leu Cys Ala Glu Leu Leu Gln Lys Ile Glu Val Pro
 305 310 315 320
 Leu Tyr Ser Leu Leu Glu Gln Thr His Leu Lys Val Glu Asp Val Ser
 325 330 335
 Ala Val Glu Ile Val Gly Gly Ala Thr Arg Ile Pro Ala Val Lys Glu
 340 345 350
 Arg Ile Ala Lys Phe Phe Gly Lys Asp Ile Ser Thr Thr Leu Asn Ala
 355 360 365
 Asp Glu Ala Val Ala Arg Gly Cys Ala Leu Gln Cys Ala Ile Leu Ser
 370 375 380
 Pro Ala Phe Lys Val Arg Glu Phe Ser Val Thr Asp Ala Val Pro Phe
 385 390 395 400
 Pro Ile Ser Leu Ile Trp Asn His Asp Ser Glu Asp Thr Glu Gly Val
 405 410 415
 His Glu Val Phe Ser Arg Asn His Ala Ala Pro Phe Ser Lys Val Leu
 420 425 430
 Thr Phe Leu Arg Arg Gly Pro Phe Glu Leu Glu Ala Phe Tyr Ser Asp
 435 440 445
 Pro Gln Gly Val Pro Tyr Pro Glu Ala Lys Ile Gly Arg Phe Val Val
 450 455 460
 Gln Asn Val Ser Ala Gln Lys Asp Gly Glu Lys Ser Arg Val Lys Val
 465 470 475 480
 Lys Val Arg Val Asn Thr His Gly Ile Phe Thr Ile Ser Thr Ala Ser
 485 490 495
 Met Val Glu Lys Val Pro Thr Glu Glu Asn Glu Met Ser Ser Glu Ala

ES 2 575 980 T3

500	505	510
Asp Met Glu Cys Leu Asn Gln Arg Pro Pro Glu Asn Pro Asp Thr Asp 515 520 525		
Lys Asn Val Gln Gln Asp Asn Ser Glu Ala Gly Thr Gln Pro Gln Val 530 535 540		
Gln Thr Asp Ala Gln Gln Thr Ser Gln Ser Pro Pro Ser Pro Glu Leu 545 550 555 560		
Thr Ser Glu Glu Asn Lys Ile Pro Asp Ala Asp Lys Ala Asn Glu Lys 565 570 575		
Lys Val Asp Gln Pro Pro Glu Ala Lys Lys Pro Lys Ile Lys Val Val 580 585 590		
Asn Val Glu Leu Pro Ile Glu Ala Asn Leu Val Trp Gln Leu Gly Lys 595 600 605		
Asp Leu Leu Asn Met Tyr Ile Glu Thr Glu Gly Lys Met Ile Met Gln 610 615 620		
Asp Lys Leu Glu Lys Glu Arg Asn Asp Ala Lys Asn Ala Val Glu Glu 625 630 635 640		
Tyr Val Tyr Glu Phe Arg Asp Lys Leu Cys Gly Pro Tyr Glu Lys Phe 645 650 655		
Ile Cys Glu Gln Asp His Gln Asn Phe Leu Arg Leu Leu Thr Glu Thr 660 665 670		
Glu Asp Trp Leu Tyr Glu Glu Gly Glu Asp Gln Ala Lys Gln Ala Tyr 675 680 685		
Val Asp Lys Leu Glu Glu Leu Met Lys Ile Gly Thr Pro Val Lys Val 690 695 700		
Arg Phe Gln Glu Ala Glu Glu Arg Pro Lys Met Phe Glu Glu Leu Gly 705 710 715 720		
Gln Arg Leu Gln His Tyr Ala Lys Ile Ala Ala Asp Phe Arg Asn Lys 725 730 735		
Asp Glu Lys Tyr Asn His Ile Asp Glu Ser Glu Met Lys Lys Val Glu 740 745 750		

ES 2 575 980 T3

Lys Ser Val Asn Glu Val Met Glu Trp Met Asn Asn Val Met Asn Ala
755 760 765

Gln Ala Lys Lys Ser Leu Asp Gln Asp Pro Val Val Arg Ala Gln Glu
770 775 780

Ile Lys Thr Lys Ile Lys Glu Leu Asn Asn Thr Cys Glu Pro Val Val
785 790 795 800

Thr Gln Pro Lys Pro Lys Ile Glu Ser Pro Lys Leu Glu Arg Thr Pro
805 810 815

Asn Gly Pro Asn Ile Asp Lys Lys Glu Glu Asp Leu Glu Asp Lys Asn
820 825 830

Asn Phe Gly Ala Glu Pro Pro His Gln Asn Gly Glu Cys Tyr Pro Asn
835 840 845

Glu Lys Asn Ser Val Asn Met Asp Leu Asp
850 855

<210> 3
<211> 3573
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
tgagtaaatg cgcgagattc tggaaagtgc tgatcagtgc gatacataag gctgaggaag 60
tgggacctcc ccttttgggt cggtagtcca gcgccggcgc cgggtgtcga gccgcggcag 120
agtgaggcag gcaacccgag gtgcggagcg acctgcggag gctgagcccc gctttctccc 180
agggtttctt atcagccagc cgccgctgtc cccgggggag taggaggctc ctgacaggcc 240
gcggtctgtc gtgtgtcctt ctgagtgtca gaggaacggc cagaccccgcc gggccggagc 300
agaacgcggc cagggcagaa agcggcggca ggagaagcag gcagggggcc ggaggacgca 360
gaccgagacc cgaggcggag gcggaccgcg agccggccat gtcggtggtg gggttggacg 420
tgggctcgca gagctgctac atcgcggtag cccgggcccg gggcatcgag accatcgcca 480
atgagttcag cgaccggtgc acccgtcag tcatatcatt tggatcaaaa aatagaacaa 540
tcggagtgtc agccaaaaat cagcaaatca ctcatgcaaa caatacgggtg tctaacttca 600
aaagatttca tggcgcagca ttcaatgacc ccttcattca aaaggagaag gaaaacttga 660
gttacgattt ggttccattg aaaaatggtg gagttggaat aaaggtaatg tacatgggtg 720
aagaacatct atttagtgtg gagcagataa cagccatggt gttgactaag ctgaaggaaa 780
ctgctgaaaa cagcctcaag aaaccagtaa cagattgtgt tatttcagtc ccctccttct 840
ttacagatgc tgagaggcga totgtgtag atgctgcaca gattgttggc ctaaactgtt 900

ES 2 575 980 T3

taagacttat gaatgacatg acagctgttg ctttgaatta cggaatttat aagcaggatc	960
tcccaagcct ggatgagaaa cctcggatag tggtttttgt tgatatggga cattcagctt	1020
ttcaagtgtc tgcttgtgct tttacaagg gaaaattgaa ggtactggga acagcttttg	1080
atccttttctt aggaggaaaa aacttcgatg aaaagtagt ggaacatttt tgtgcagaat	1140
ttaaaactaa gtacaagttg gatgcaaat ccaaaatacg agcactccta cgtctgtatc	1200
aggaatgtga aaaactgaaa aagtaatga gctctaacag cacagacctt cactgaata	1260
tcgaatgctt tatgaatgat aaagatgttt cgggaaagat gaacaggta caatttgaag	1320
aactctgtgc tgaacttctg caaaagatag aagtaccctt ttattcactg ttggaacaaa	1380
ctcatctcaa agtagaagat gtgagtgcag ttgagattgt tggaggcgct acacgaattc	1440
cagctgtgaa ggaaagaatt gccaaattct ttggaaaaga tattagcaca acactcaatg	1500
cagatgaagc agtagccaga ggatgtgcat tacagtgttc atgaagtctt tagtcgaaac	1560
catgtgtctc ctttctccaa agttctcacc tttctgagaa gggggccttt tgagctagaa	1620
gctttctatt ctgatcccca aggagtcca tatccagaag caaaaatagg ccgctttgta	1680
gttcagaatg tttctgcaca gaaagatgga gaaaaatcta gagtaaaagt caaagtgcga	1740
gtcaaacacc atggcatttt caccatctct acggcatcta tggtaggagaa agtcccaact	1800
gaggagaatg aaatgtcttc tgaagctgac atggagtgtc tgaatcagag accaccagaa	1860
aaccagaca ctgataaaaa tgtccagcaa gacaacagtg aagctggaac acagccccag	1920
gtacaaaactg atgctcaaca aacctcacag tctccccctt cacctgaact tacctcagaa	1980
gaaaaacaaa tccagatgc tgacaaagca aatgaaaaaa aagttgacca gcctccagaa	2040
gctaaaaagc ccaaaataaa ggtggtgaat gttgagctgc ctattgaagc caacttggtc	2100
tggcagttag ggaaagacct tcttaacatg tatattgaga cagagggtaa gatgataatg	2160
caagataaat tggaaaaaga aaggaatgat gctaaaaatg cagttgagga atatgtgtat	2220
gagttcagag acaagctgtg tggaccatat gaaaaattta tatgtgagca ggatcatcaa	2280
aattttttga gactcctcac agaaactgaa gactggctgt atgaagaag agaggaccaa	2340
gctaaacaag catatgttga caagttggaa gaattaatga aaattggcac tccagttaaa	2400
gttcggtttc aggaagctga agaacggcca aaaatgtttg aagaactagg acagaggctg	2460
cagcattatg ccaagatagc agctgacttc agaaataagg atgagaaata caaccatatt	2520
gatgagtctg aaatgaaaa agtgagagaag tctgttaatg aagtgatgga atggatgaat	2580
aatgtcatga atgctcaggc taaaaagagt cttgatcagg atccagttgt acgtgctcag	2640
gaaattaaaa caaaaatcaa ggaattgaac aacacatgtg aaccggttgt aacacaaccg	2700
aaaccaaaaa ttgaatcacc caaactggaa agaactccaa atggcccaa tattgataaa	2760

ES 2 575 980 T3

```

aaggaagaag atttagaaga caaaaacaat tttggtgctg aacctccaca tcagaatggt      2820
gaatgttacc ctaatgagaa aaattctgtt aatatggact tggactagat aaccttaaat      2880
tggcctattc cttcaattaa taaaatattt ttgccatagt atgtgactct acataacata      2940
ctgaaactat ttatatattc ttttttaagg atatttagaa attttgtgta ttatatggaa      3000
aaagaaaaaa agcttaagtc tgtagtcttt atgatcctaa aagggaaaat tgccttggtg      3060
actttcagat tcctgtggaa ttgtgaattc atactaagct ttctgtgcag tctcaccatt      3120
tgcactactg aggatgaaac tgacttttgt cttttggaga aaaaaaactg tactgcttgt      3180
tcaagagggc tgtgattaaa atctttaagc atttggtcct gccaaaggtag ttttcttgca      3240
ttttgctctc cattcagcat gtgtgtgggt gtggatgttt ataaacaaga ctaagtctga      3300
cttcataagg gctttctaaa accatttctg tccaagagaa aatgactttt tgctttgata      3360
ttaaaaaattc aatgagtaaa acaaaagcta gtcaaatgtg ttagcagcat gcagaacaaa      3420
aactttaaac tttctctctc actatacagt atattgtcat gtgaaagtgt ggaatggaag      3480
aaatgtcgat cctgttgtaa ctgattgtga acacttttat gagcttttaa ataaagttca      3540
tcttatggtg tcatttctaa aaaaaaaaaa aaa      3573

```

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 gctacacgaa ttccagctgt ga 22

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gagcagcatg gtttcgacta aa 22

<210> 6
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 atgtgcatta cagtgttc 18

<210> 7
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 tacagtgtgc aatactt 17

<210> 8
 <211> 3680
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

ES 2 575 980 T3

<400> 8

tgagtaaatg ccgcagattc tggaaagttc tgatcagtgc gatacataag gctgaggaag	60
tgggacctcc ccttttgggt cggtagttca gcgcggcgcc cgggtgtgca gccgcggcag	120
agtgaggcag gcaacccgag gtgcggagcg acctgcggag gctgagcccc gctttctccc	180
agggtttctt atcagccagc cgcgcgtgtc cccgggggag taggaggctc ctgacaggcc	240
gcggctgtct gtgtgtcctt ctgagtgtca gaggaacggc cagaccccgcc gggccggagc	300
agaacgcggc cagggcagaa agcggcggca ggagaagcag gcagggggcc ggaggacgca	360
gaccgagacc cgaggcggag gcggaccgcg agccggccat gtcgggtgtg gggttggacg	420
tgggtctgca gagctgctac atcgcggtag cccgggccgg gggcatcgag accatcgcca	480
atgagttcag cgaccgggtc acccgcgcag tcatatcatt tggatcaaaa aatagaacaa	540
tcggagtgtc agccaaaaat cagcaaatca ctcatgcaaa caatacgggtg tctaacttca	600
aaagatttca tggccgagca ttcaatgacc ccttcattca aaaggagaag gaaaacttga	660
gttacgattt ggttccattg aaaaatgggt gagttggaat aaaggtaatg tacatgggtg	720
aagaacatct atttagtgtg gaggagataa cagccatgtt gttgactaag ctgaaggaaa	780
ctgctgaaaa cagcctcaag aaaccagtaa cagatttgtt tatttcagtc ccctcctct	840
ttacagatgc tgagaggcga tctgtgttag atgtgcaca gattgttggc ctaaactgtt	900
taagacttat gaatgacatg acagctgttg ctttgaatta cggaatttat aagcaggatc	960
tcccaagcct ggatgagaaa cctcggatag tggtttttgt tgatatggga cattcagctt	1020
ttcaagtgtc tgcttgtgct tttaacaagg gaaaattgaa ggtactggga acagcttttg	1080
atcctttctt aggaggaaaa aacttcgatg aaaagttagt ggaacatttt tgtgcagaat	1140
ttaaaactaa gtacaagttg gatgcaaaat ccaaaatacg agcactccta cgtctgtatc	1200
aggaatgtga aaaactgaaa aagctaata gctctaacag cacagacctt ccactgaata	1260
tcgaatgctt tatgaatgat aaagatgttt ccggaaagat gaacaggcca caatttgaag	1320
aactctgtgc tgaacttctg caaaagatag aagtaccctt ttattcactg ttggaacaaa	1380
ctcatctcaa agtagaagat gtgagtgcag ttgagattgt tggaggcgct acacgaattc	1440
cagctgtgaa ggaagaatt gccaaattct ttggaaaaga tattagcaca aactcaatg	1500
cagatgaagc agtagccaga ggatgtgcat tacagtgtgc aatactttcc ccggcattta	1560
aagttagaga attttccgtc acagatgcag ttctttttcc aatatctctg atctggaacc	1620
atgattcaga agatactgaa ggtgttcatg aagtctttag tcgaaaccat gctgctcctt	1680

ES 2 575 980 T3

tctccaaagt tctcaccttt ctgagaaggg ggcccttttga gctagaagct ttctattctg	1740
atccccaagg agttccatat ccagaagcaa aaataggccg ctttgtagtt cagaatgttt	1800
ctgcacagaa agatggagaa aaatctagag taaaagtcaa agtgcgagtc aacacccatg	1860
gcattttcac catctctacg gcatctatgg tggagaaagt cccaactgag gagaatgaaa	1920
tgtcttctga agctgacatg gagtgtctga atcagagacc accagaaaac ccagacactg	1980
ataaaaatgt ccagcaagac aacagtgaag ctggaacaca gcccaggtta caaactgatg	2040
ctcaacaaac ctcacagtct ccccttcac ctgaacttac ctcagaagaa aacaaaatcc	2100
cagatgctga caaagcaaat gaaaaaaaaag ttgaccagcc tccagaagct aaaaagccca	2160
aaataaagggt ggtgaatgtt gagctgccta ttgaagccaa cttggtctgg cagttaggga	2220
aagaccttct taacatgtat attgagacag agggtaagat gataatgcaa gataaattgg	2280
aaaaagaaag gaatgatgct aaaaatgcag ttgaggaata tgtgtatgag ttcagagaca	2340
agctgtgtgg accatatgaa aaatttatat gtgagcagga tcatcaaaat tttttgagac	2400
tcctcacaga aactgaagac tggctgtatg aagaaggaga ggaccaagct aaacaagcat	2460
atgttgacaa gttggaagaa ttaatgaaaa ttggcactcc agttaaagtt cggtttcagg	2520
aagctgaaga acggccaaaa atgtttgaag aactaggaca gaggtgcag cattatgcca	2580
agatagcagc tgacttcaga aataaggatg agaaatacaa ccatattgat gagtctgaaa	2640
tgaaaaaagt ggagaagtct gttaatgaag tgatggaatg gatgaataat gtcatgaatg	2700
ctcaggctaa aaagagtctt gatcaggatc cagttgtacg tgctcaggaa attaaaacaa	2760
aatcaagga attgaacaac acatgtgaac ccgttgtaac acaaccgaaa ccaaaaattg	2820
aatcacccaa actggaaaga actccaaatg gcccaaatat tgataaaaag gaagaagatt	2880
tagaagacaa aaacaatttt ggtgctgaac ctccacatca gaatggtgaa tgttacccta	2940
atgagaaaaa ttctgttaat atggacttgg actagataac cttaaattgg cctattcctt	3000
caattaataa aatatttttg ccatagtatg tgactctaca taacatactg aaactattta	3060
tattttcttt ttttaaggata tttagaaatt ttgtgtatta tatggaaaaa gaaaaaaagc	3120
ttaagtctgt agtctttatg atcctaaaag ggaaaattgc cttggtaact ttcagattcc	3180
tgtggaattg tgaattcata ctaagctttc tgtgcagtct caccatttgc atcactgagg	3240
atgaaactga cttttgtctt ttggagaaaa aaaactgtac tgcttgttca agagggtgt	3300
gattaaaatc ttttaagcatt tgttcctgcc aaggtagttt tcttgcatth tgctctccat	3360
tcagcatgtg tgtgggtgtg gatgtttata aacaagacta agtctgactt cataagggt	3420
ttctaaaacc atttctgtcc aagagaaaat gactttttgc tttgatatta aaaattcaat	3480
gagtaaaaca aaagctagtc aaatgtgtta gcagcatgca gaacaaaaac tttaaacttt	3540
ctctctcact atacagtata ttgtcatgtg aaagtgtgga atggaagaaa tgtcgcacct	3600
gttgtaactg attgtgaaca cttttatgag ctttaaaata aagttcatct tatggtgtca	3660
tttctaaaaa aaaaaaaaaa	3680

5

<210> 9
 <211> 164
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

ES 2 575 980 T3

<400> 9
 gaaaaccctg tccatccatt ggaattgagt tttatattaa aagatgactg ggaagtgttc 60
 atgtgtcat gatttttttt ttttttttta agtgtgcaat actttcccct ttccccggca 120
 tttaaagtta gagaattttc cgtcacagat gcagttcctt ttcc 164

5 <210> 10
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <400> 10
 ccctgtccat ccattggaat tga 23
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 15 <213> Homo sapiens

<400> 11
 ggaactgcat ctgtgacgga a 21

20 <210> 12
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Cebador

30 <400> 12
 cgcgcgcgca agatctacat gtcggtggtg ggg 33
 <210> 13
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 13
 cgcgcgcgca agctttcatg aacactgtaa tgcacatcc 39
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 45 <213> Homo sapiens

<400> 14
 ctgcggtaat caagtttta g 21

50 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

55 <400> 15
 aaccattcaa cattttaac cc 22
 <210> 16
 <211> 20
 60 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

	<400> 16	
	gagtcgctgg cacagttcta	20
5	<210> 17	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
10	<400> 17	
	ctggtcactc gcgtttacaa	20
	<210> 18	
	<211> 20	
15	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 18	
	aaccatgctt gcaaaccact	20
20	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<400> 19	
	cgataatact agcaatgacc	20
	<210> 20	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 20	
35	gctgaatttt acctcctgac	20
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
40	<213> Homo sapiens	
	<400> 21	
	attgtgccat tgcattccaa	20
	<210> 22	
45	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 22	
50	taccaggtgg caaaggga	19
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> DNA	
55	<213> Homo sapiens	
	<400> 23	
	tctgcatttt aactatggct c 21	
60		

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de choque térmico 110 (HSP110) mutada, que consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 1.
2. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica la proteína HSP110 mutada de la reivindicación 1.
3. Uso de una HSP110 mutada como se define en la reivindicación 1, un ácido nucleico según la reivindicación 2 y/o una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 como biomarcador para el pronóstico de supervivencia y/o de la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer.
4. Un método *in vitro* para el pronóstico de la supervivencia y/o de la respuesta al tratamiento de un paciente que padece un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) medir la expresión de HSP110 mutada como se define en la reivindicación 1 en una muestra biológica de dicho paciente; y/o
 - b) determinar la longitud de la repetición de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110;
 - c) y correlacionar el nivel de expresión medido en la etapa a) y/o la longitud de la delección de timidina identificada en la etapa b) con el pronóstico de dicho paciente, deduciendo así el pronóstico de dicho paciente.
5. El método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que dicho método comprende las etapas de:
 - a) determinar la longitud de la delección de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110;
 - b) y correlacionar la longitud de la repetición de timidina identificada en la etapa a) con el pronóstico de dicho paciente, deduciendo así el pronóstico de dicho paciente,en el que una delección de al menos 5 timidinas en la repetición es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.
6. El método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que dicho método comprende las etapas de:
 - a) medir la expresión de una HSP110 mutada como se define en la reivindicación 1 en una muestra biológica de dicho paciente;
 - b) medir la expresión de una HSP110 mutada como se define en la reivindicación 1 en una muestra de control negativo;en el que una expresión significativamente mayor de HSP mutada medida en la etapa a) en comparación con la expresión medida en la etapa b) es indicativa de un buen pronóstico de supervivencia y/o de respuesta al tratamiento.
7. El método *in vitro* según la reivindicación 4, en el que dicho método comprende las etapas de:
 - a) medir la expresión de una HSP110 mutada como se define en la reivindicación 1 en una muestra biológica de dicho paciente;
 - b) medir la expresión de HSP100 de tipo silvestre en dicha muestra biológica;
 - c) comparar la expresión medida en las etapas a) y b), deduciendo así el pronóstico de dicho paciente.
8. Un método *in vitro* para diagnosticar el fenotipo de MSI de un cáncer, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - a) genotipar o secuenciar la repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110 en una muestra biológica de un paciente que es probable que esté afectado por un cáncer con fenotipo de MSI;
 - b) detectar la presencia o ausencia de inestabilidad en dicha repetición microsatelital,

en el que la detección de inestabilidad en dicha repetición microsatelital en la muestra biológica del paciente indica que el paciente padece un cáncer con fenotipo de MSI.

9. Un método *in vitro* para determinar un régimen terapéutico adecuado para tratar un sujeto que padece un cáncer propenso a tener un fenotipo de MSI, en el que dicho método comprende las etapas de:

- 5
 - a) determinar la longitud de la repetición de timidina de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica la proteína de choque térmico 110 (HSP110) en una muestra biológica de dicho paciente, y
 - b) deducir un régimen terapéutico adecuado para el sujeto basándose en la longitud de dicha repetición de timidina.
- 10
 10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en el que el cáncer se selecciona del grupo consistente en cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer endométrico, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de ovario, cáncer de próstata, linfomas, leucemias, glioblastoma, astrocitoma y neuroblastoma.
 11. El método de la reivindicación 10, en el que el cáncer es cáncer colorrectal.
 12. Un kit que comprende o consiste en:
 - 15
 - medios para detectar específicamente la presencia de HSP110 mutada como se define en la reivindicación 1, y/o
 - medios para detectar específicamente la longitud de una repetición microsatelital de 17 nucleótidos de timidina localizada en el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 8 del gen que codifica HSP110.

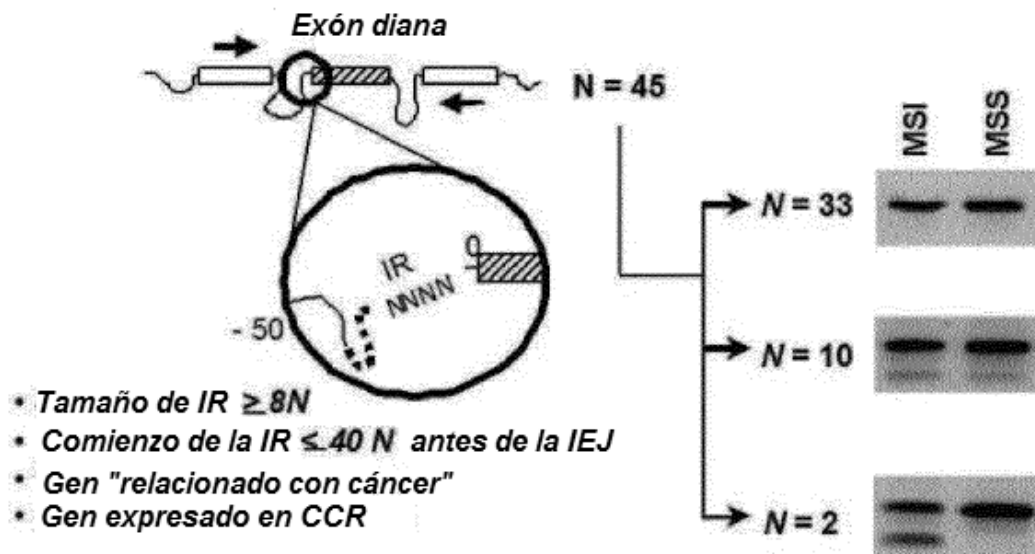


FIG.1

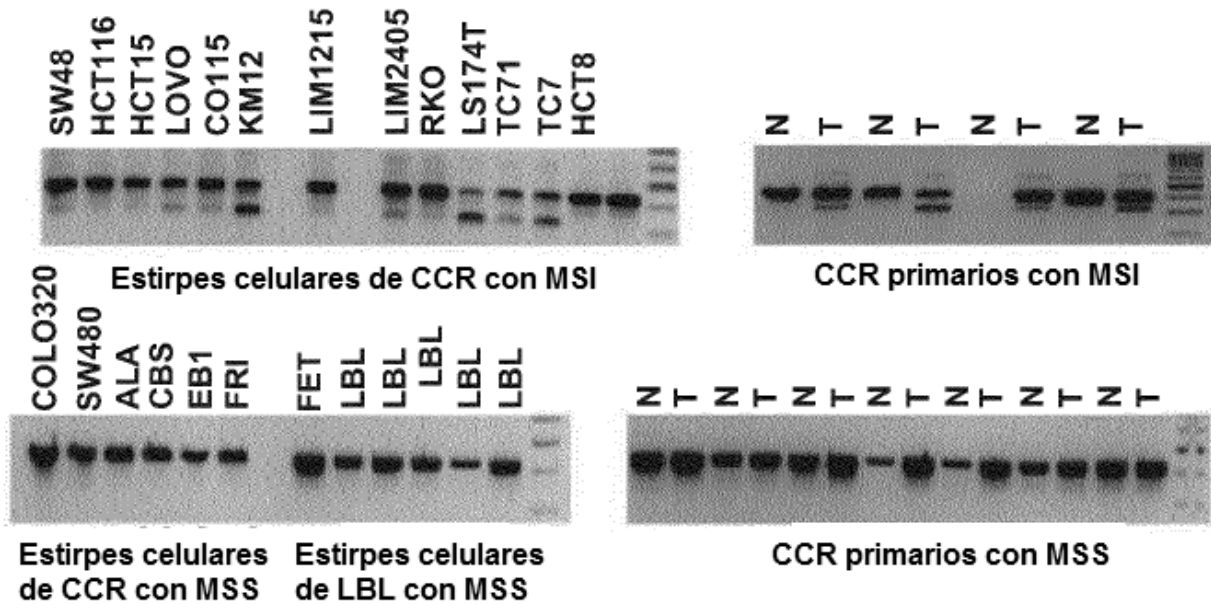


FIG.2

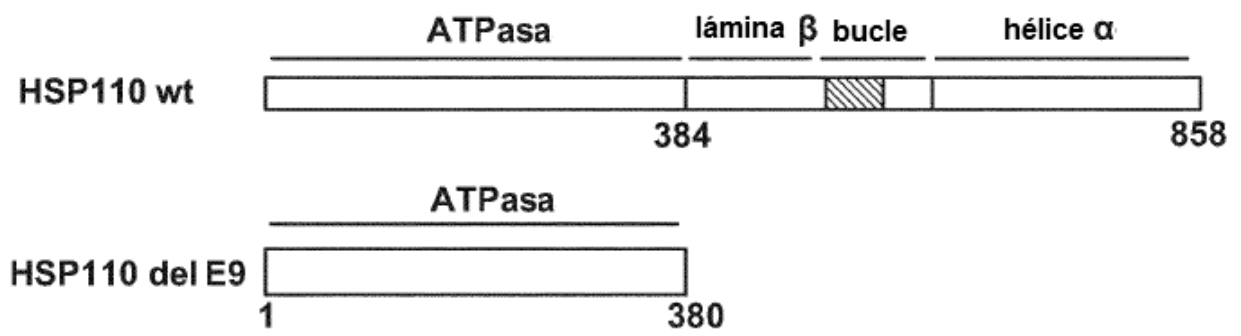


FIG.3

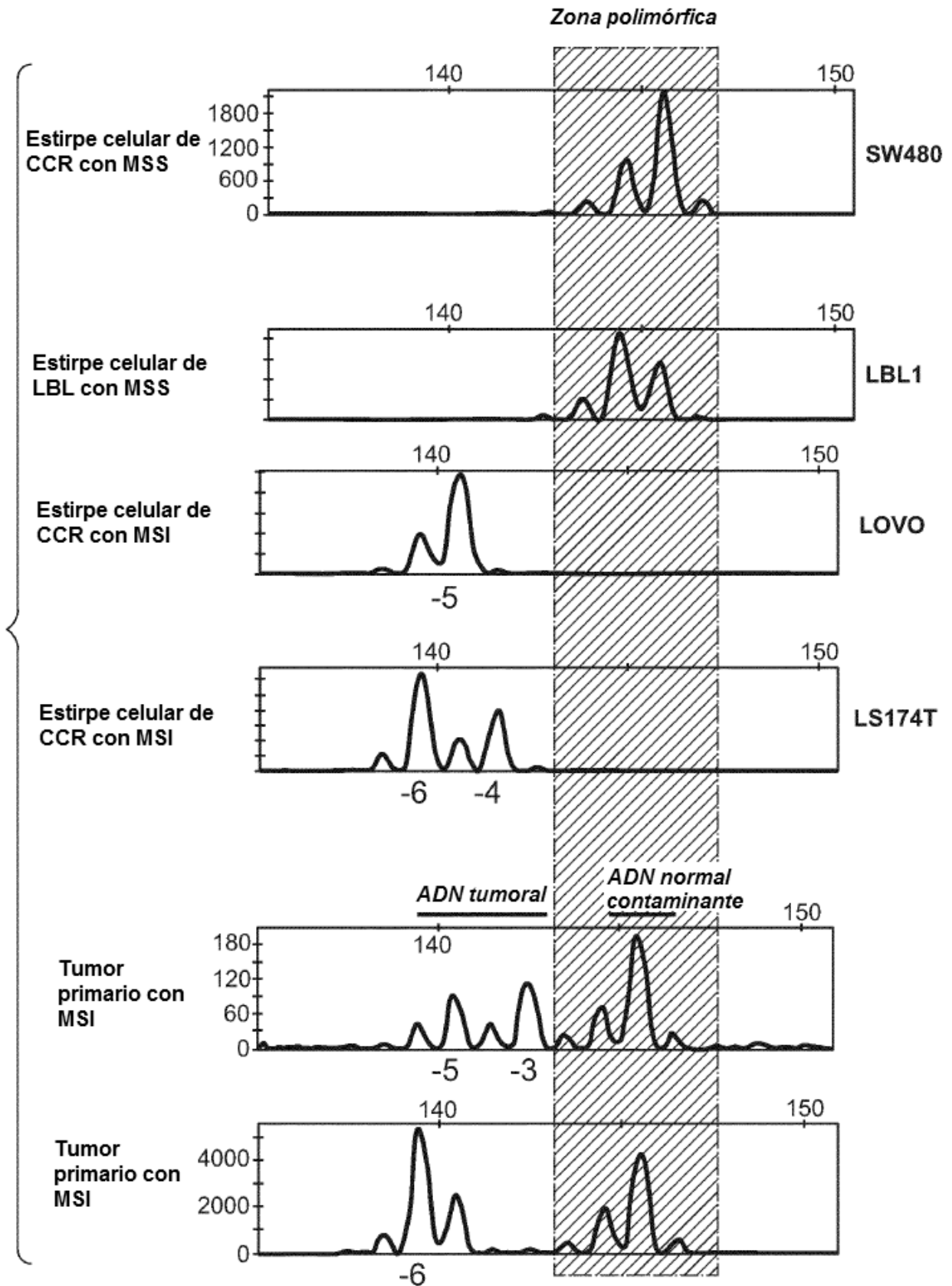


FIG.4

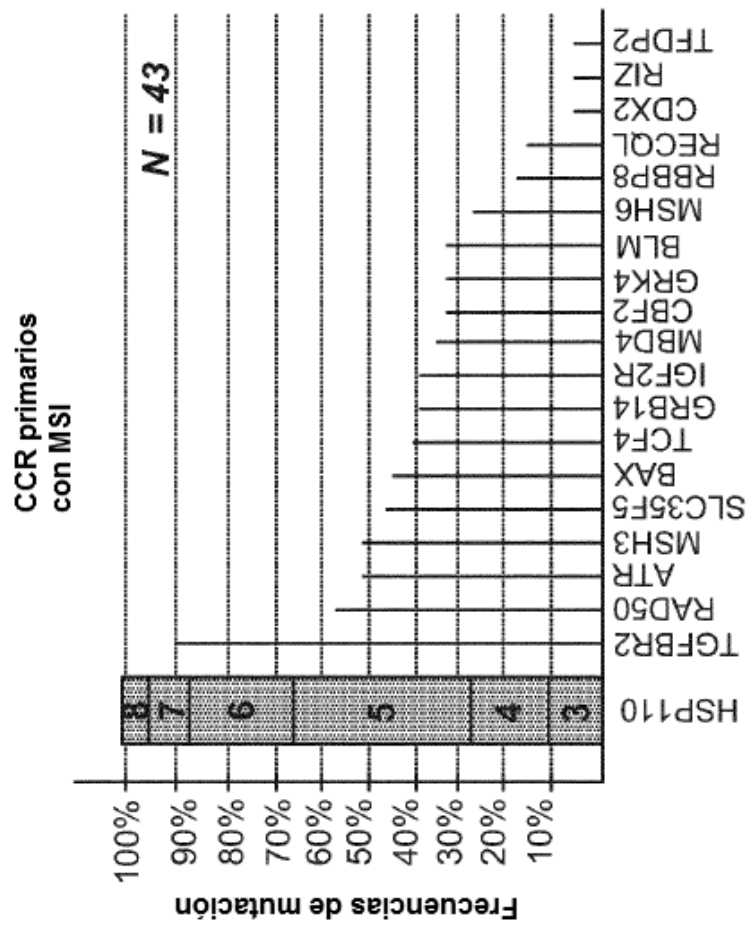
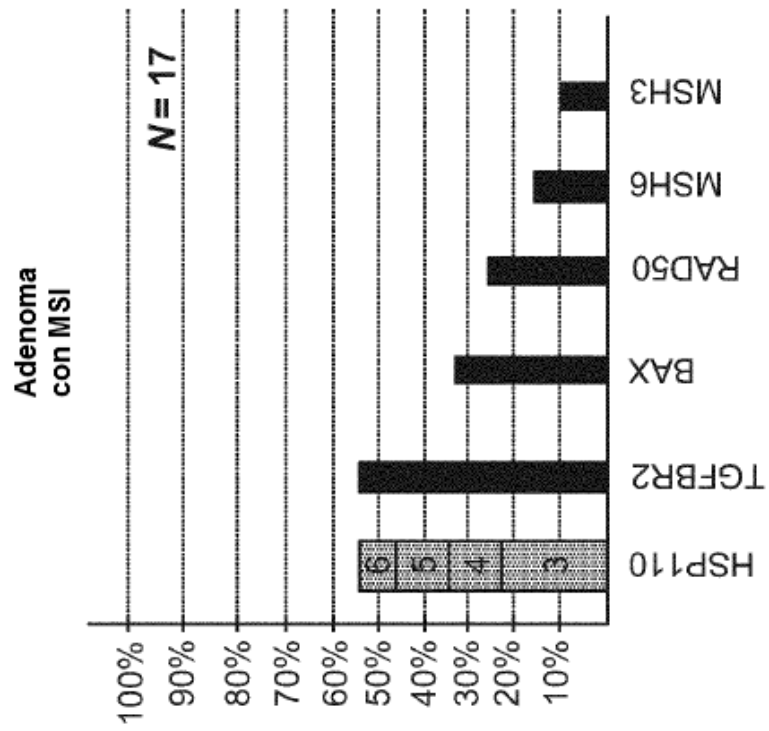


FIG.5

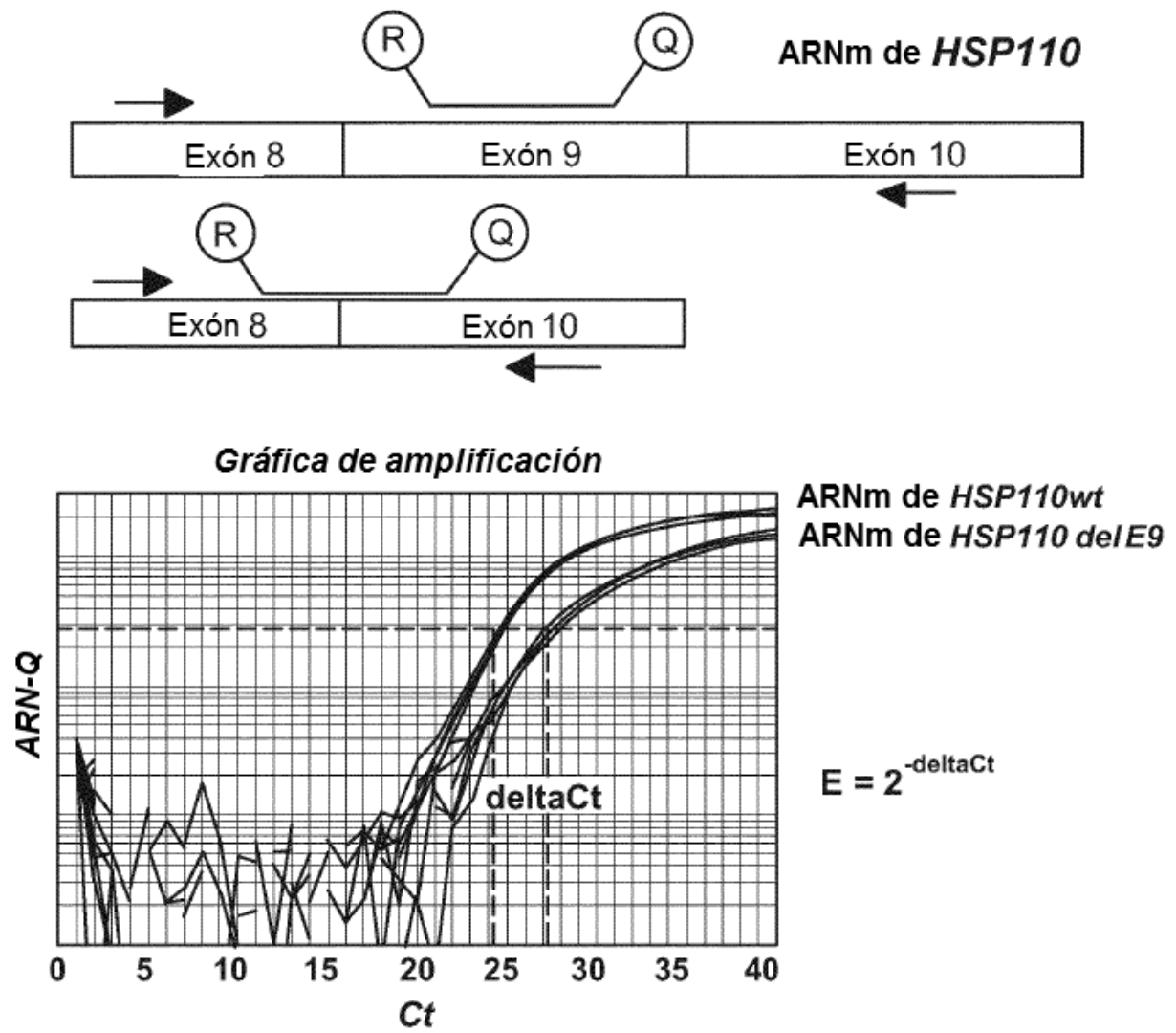


FIG.6

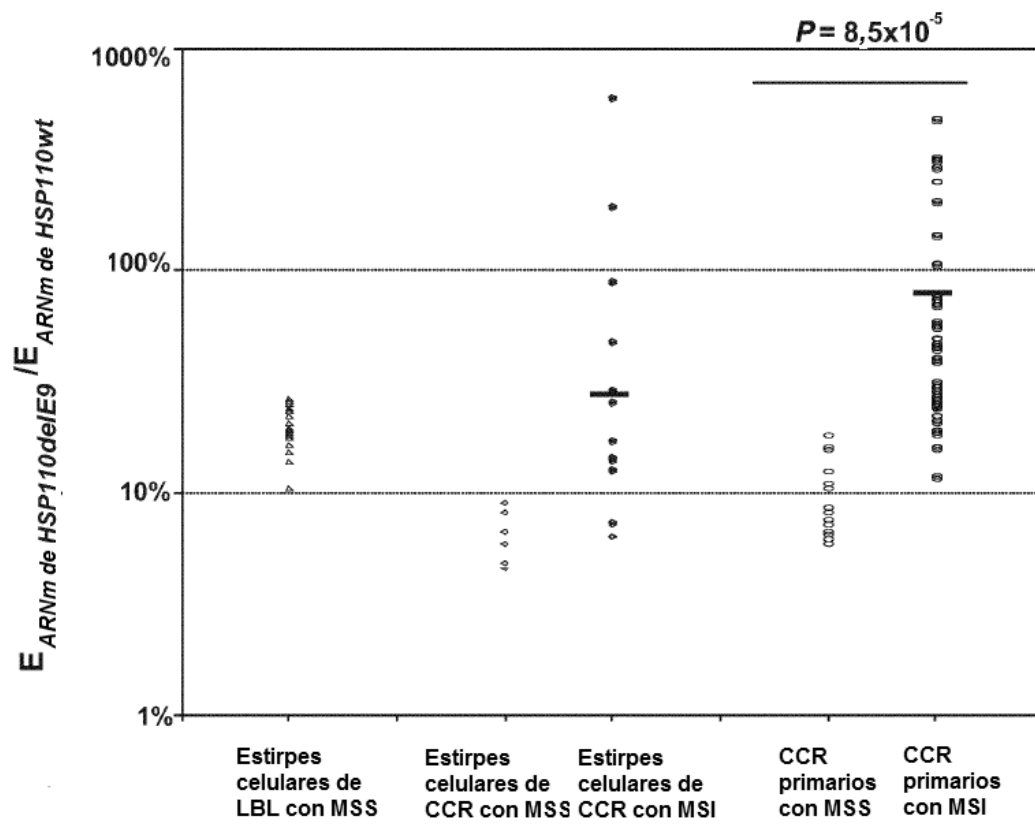


FIG.7

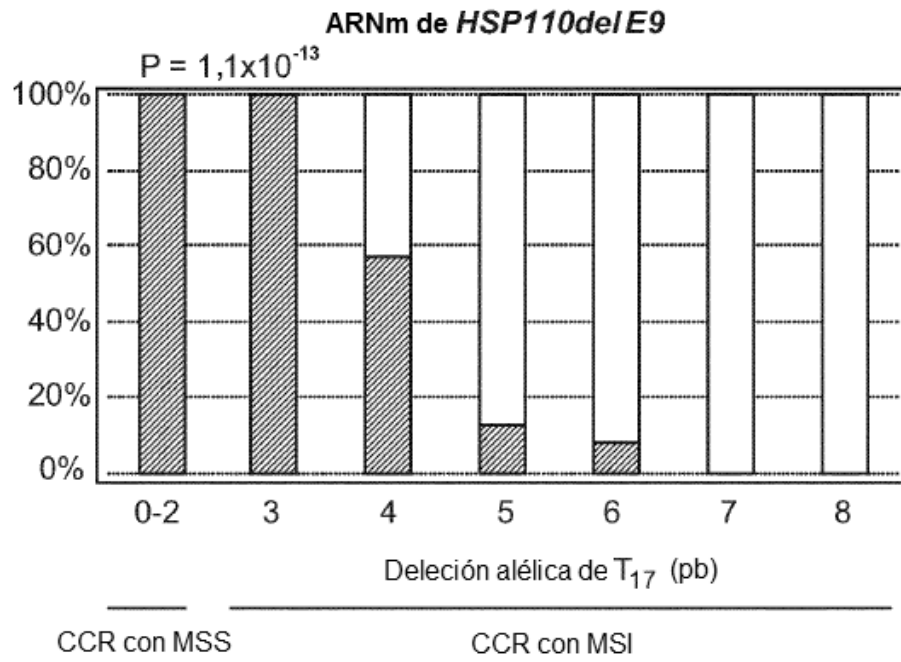


FIG.8

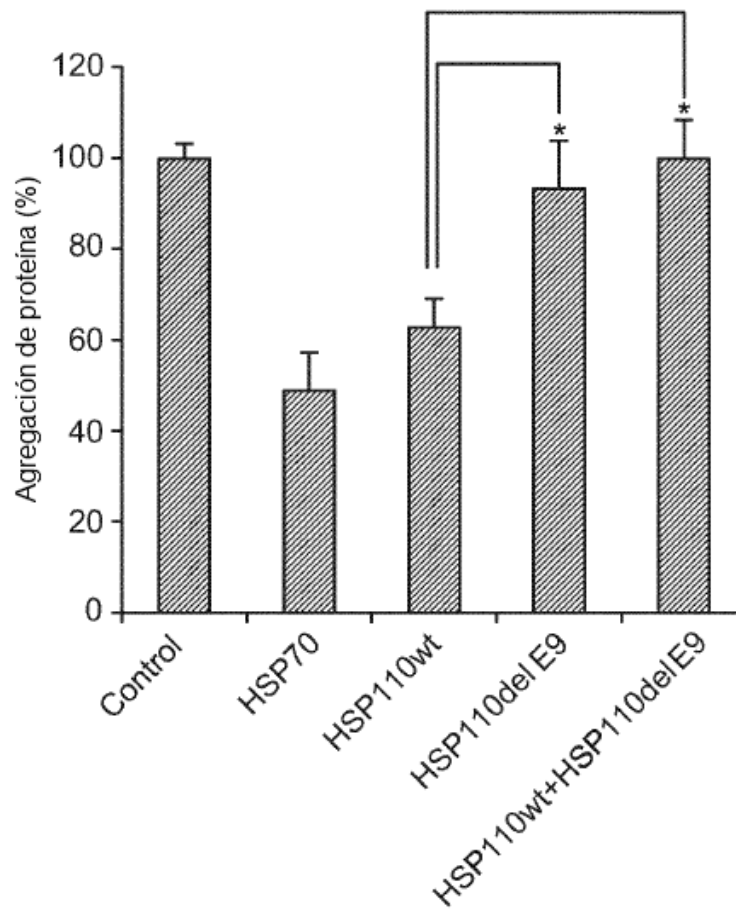
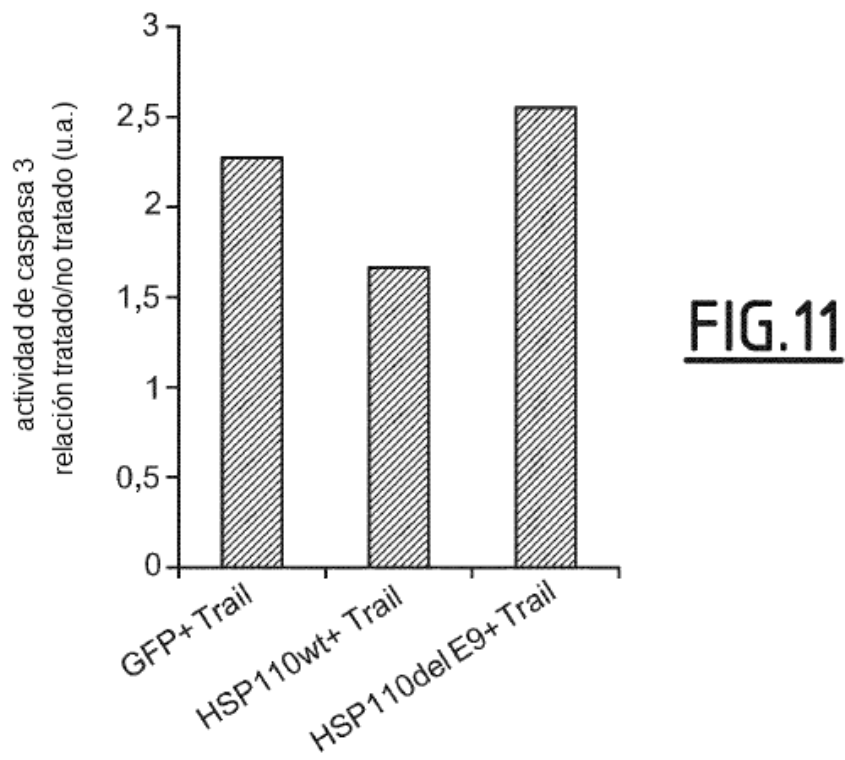
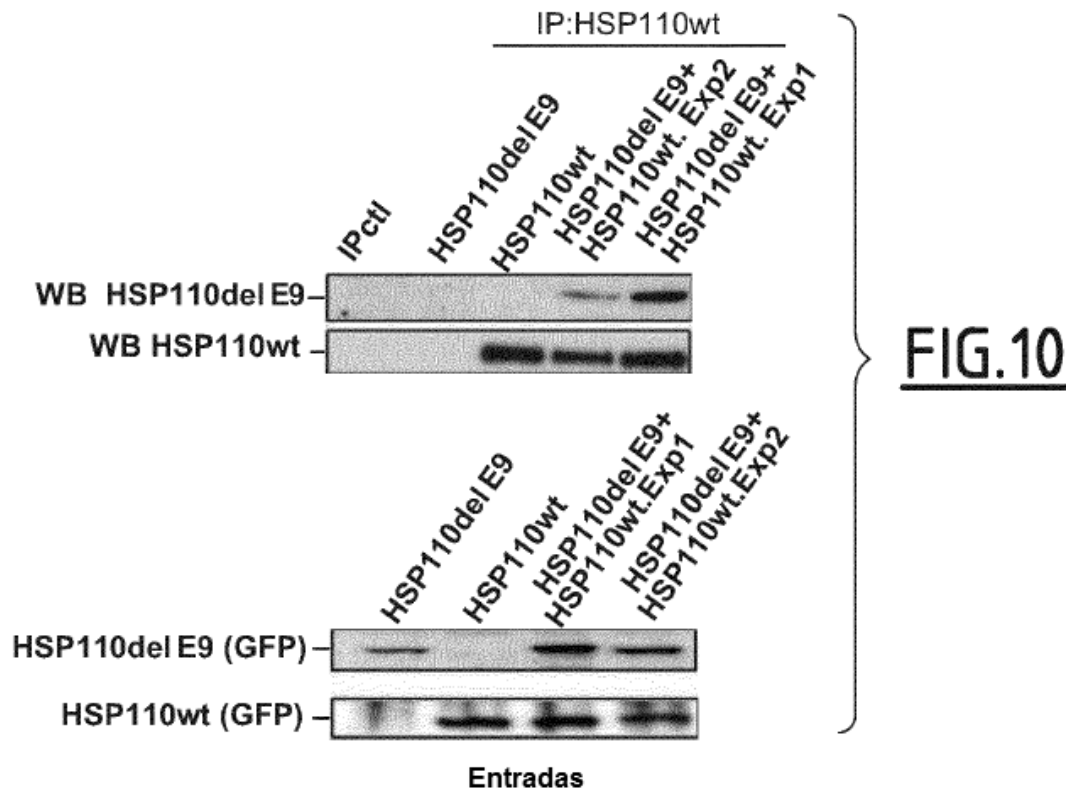


FIG.9



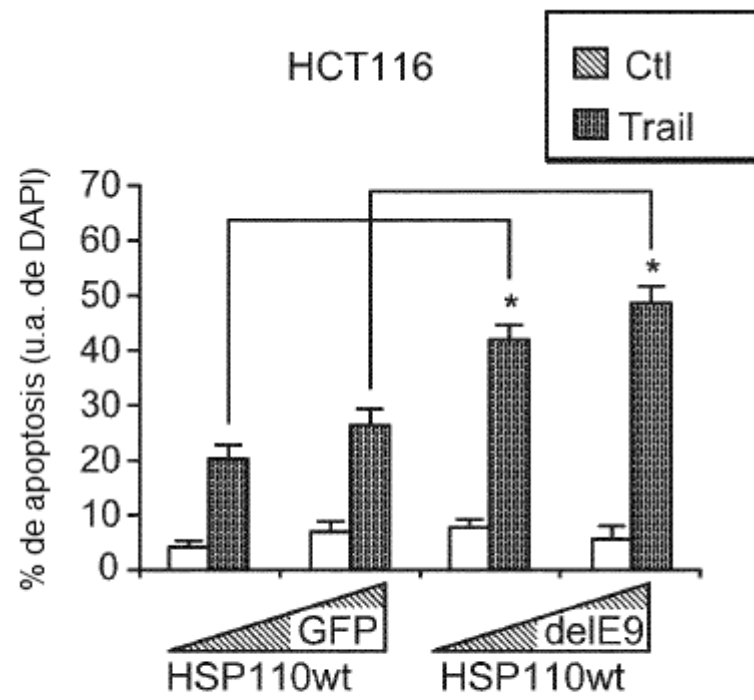


FIG.12

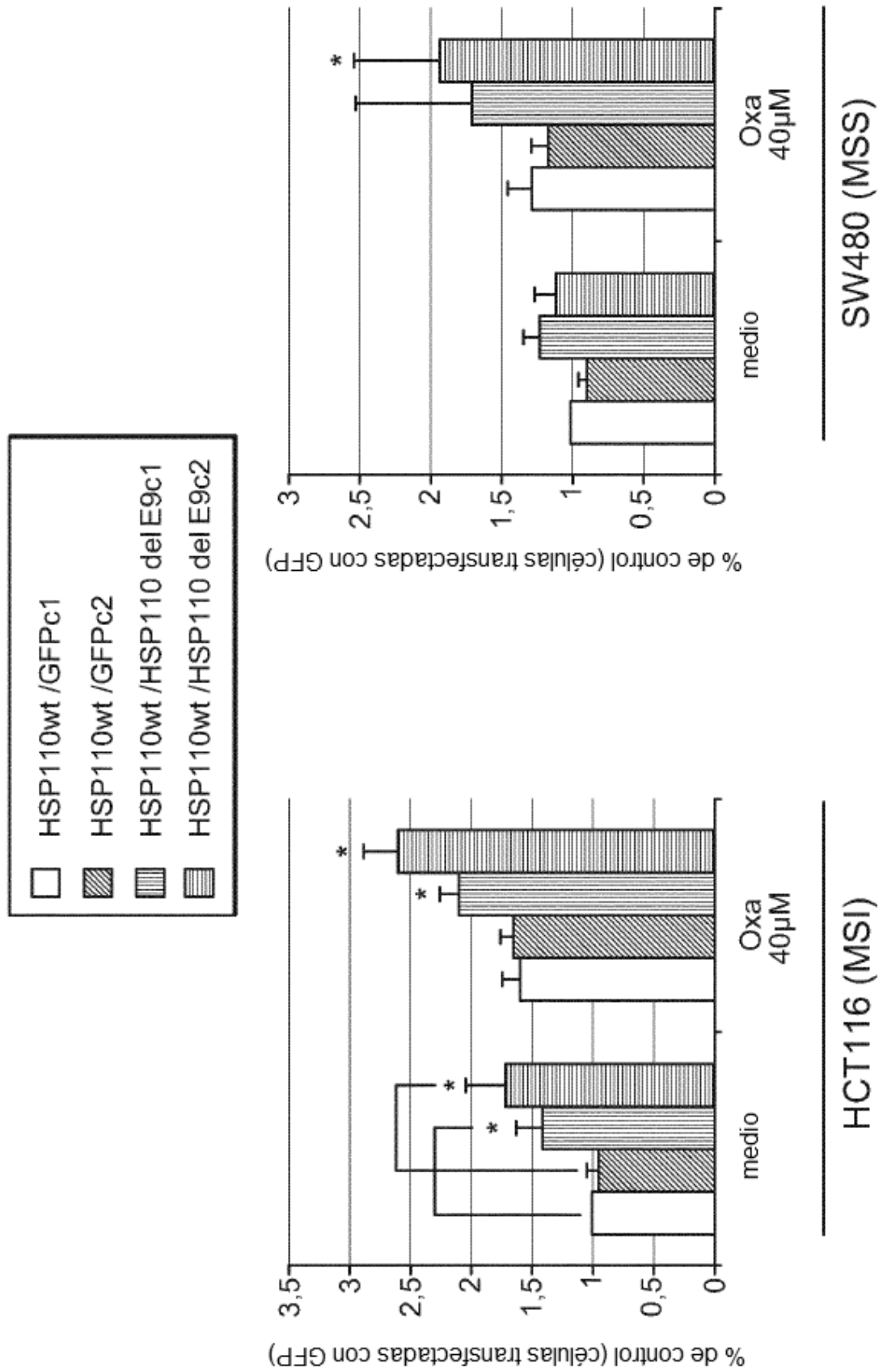


FIG.13

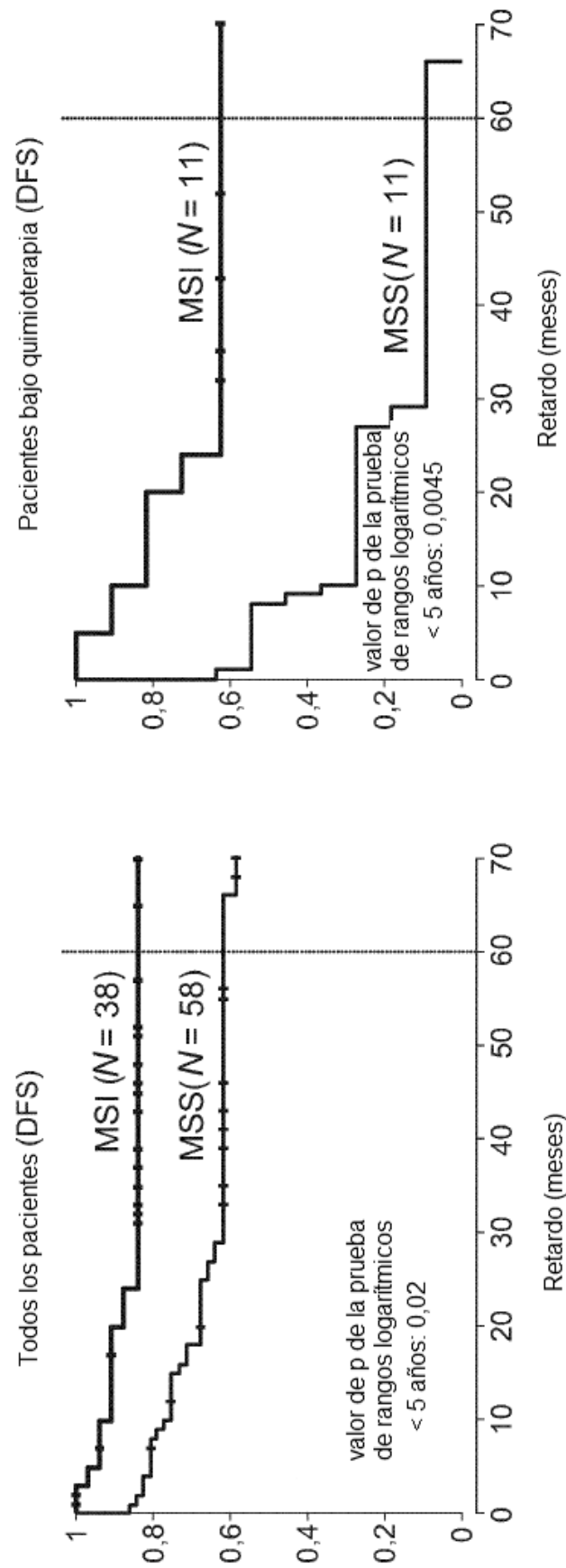


FIG.14

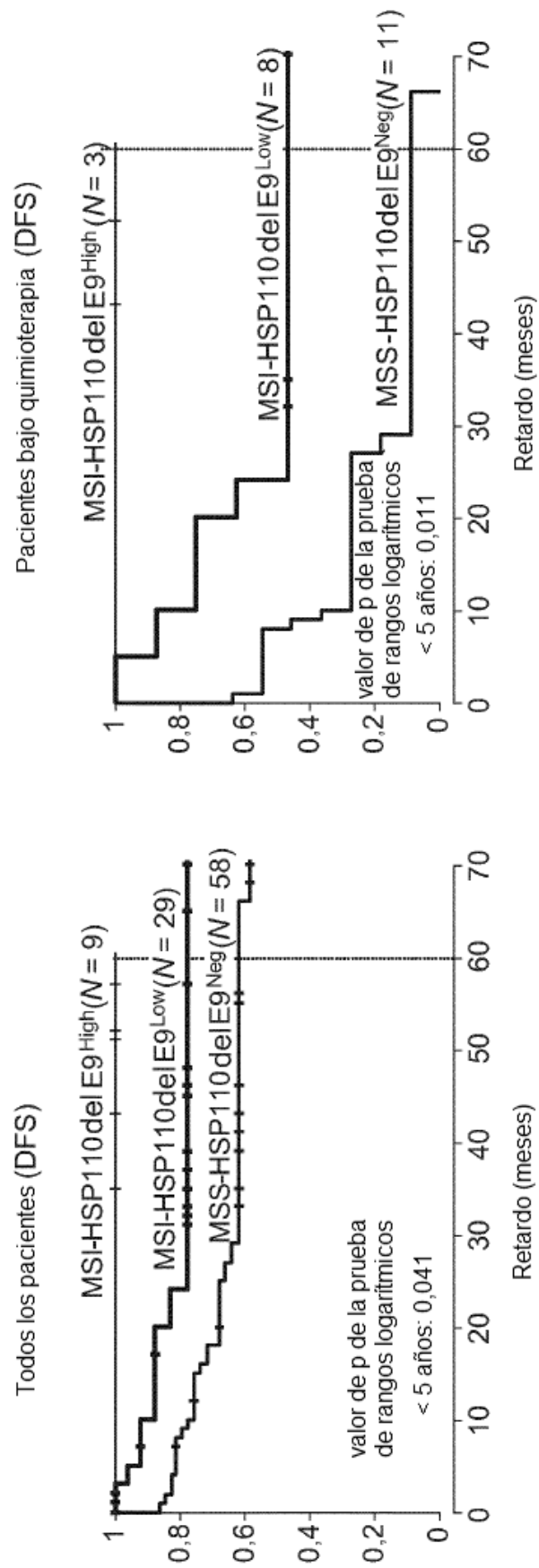
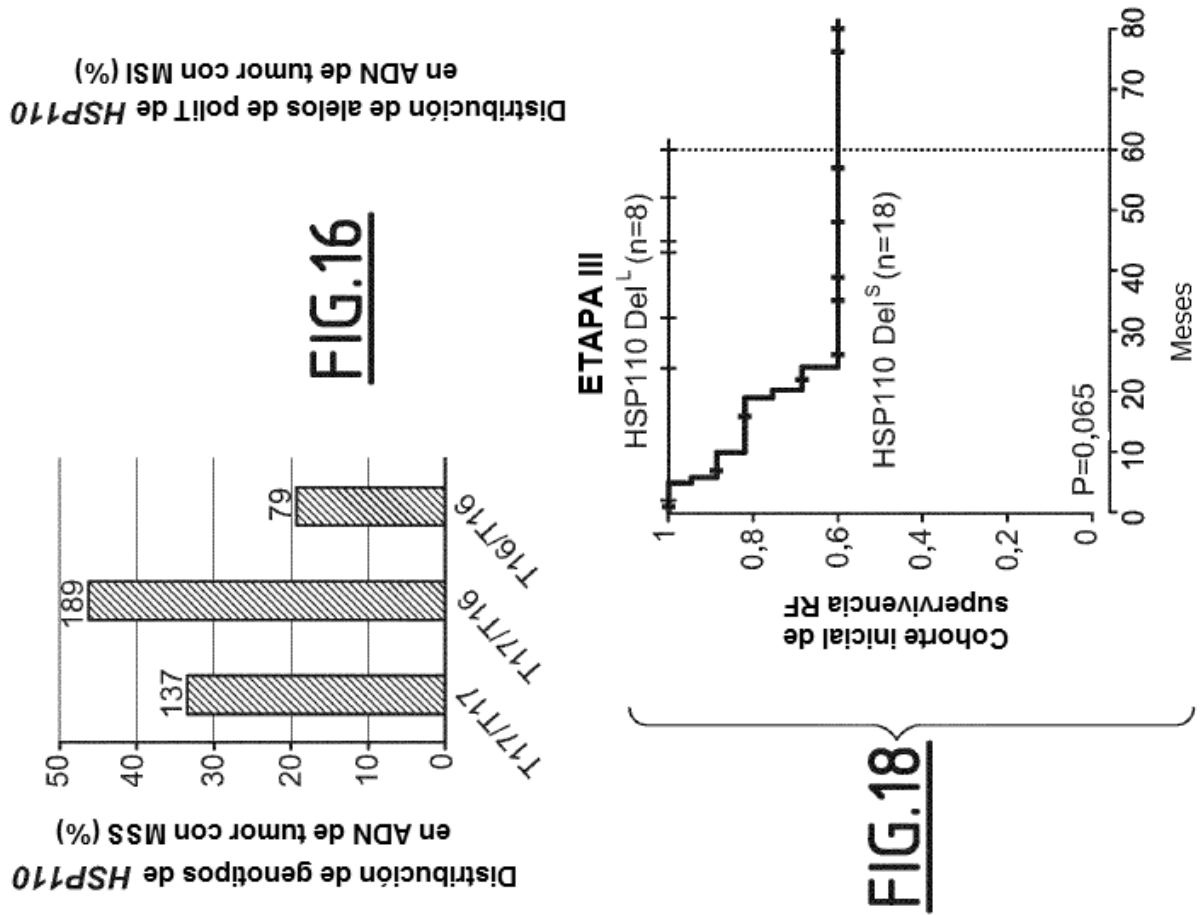
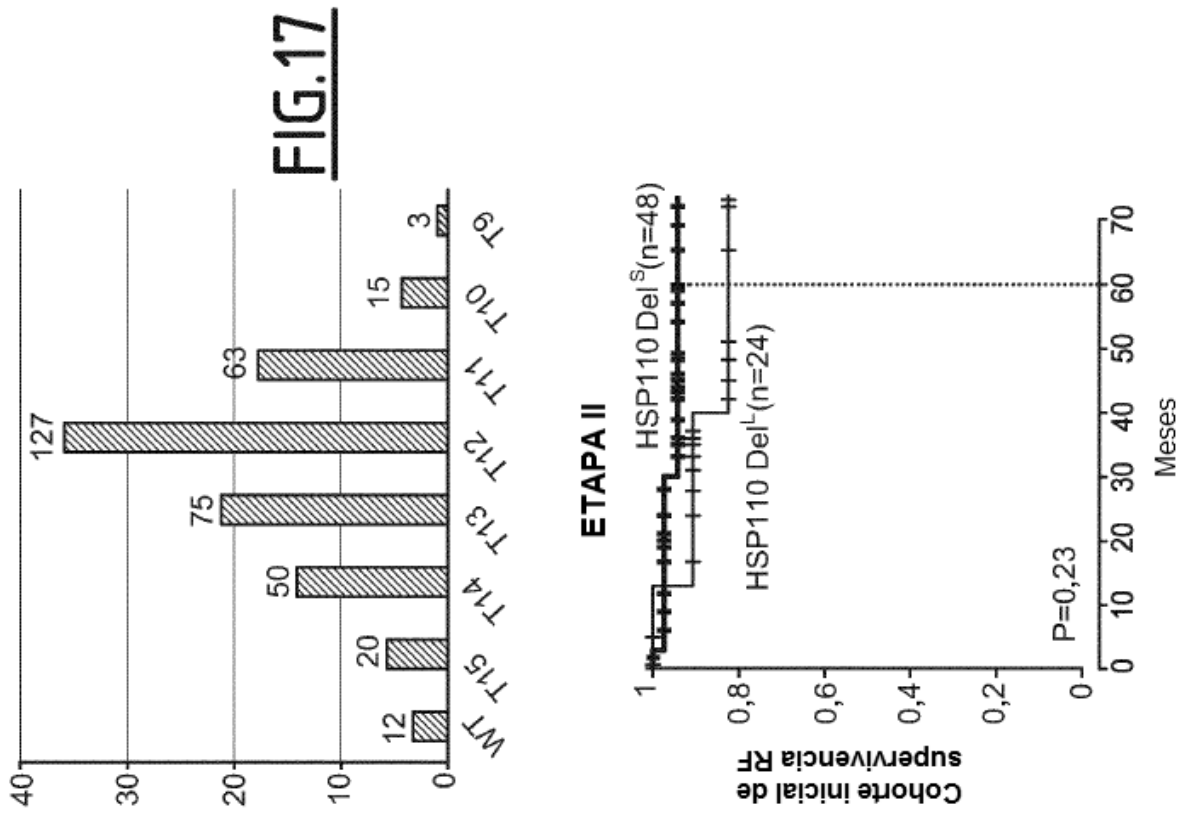
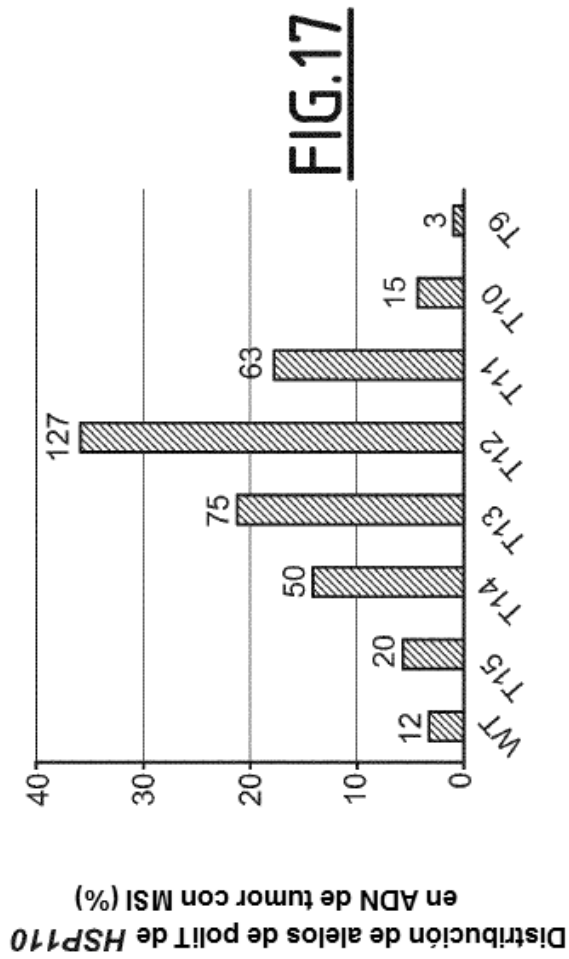


FIG.15



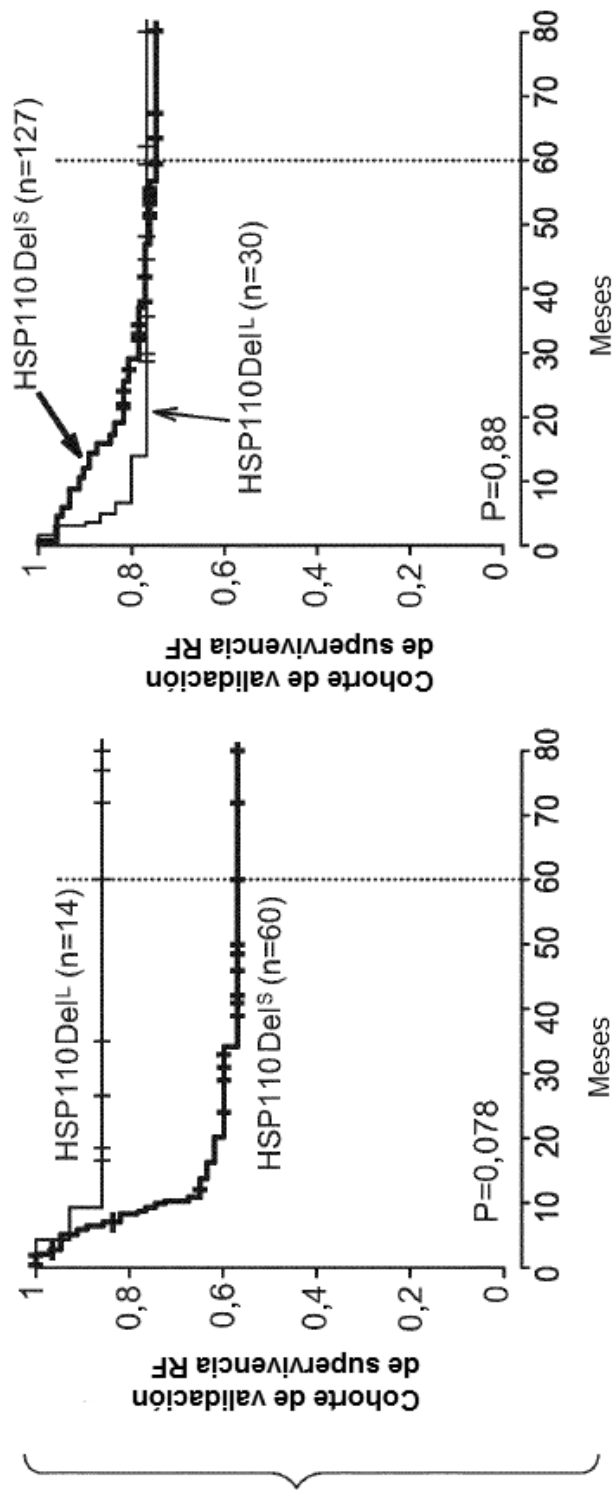


FIG.19

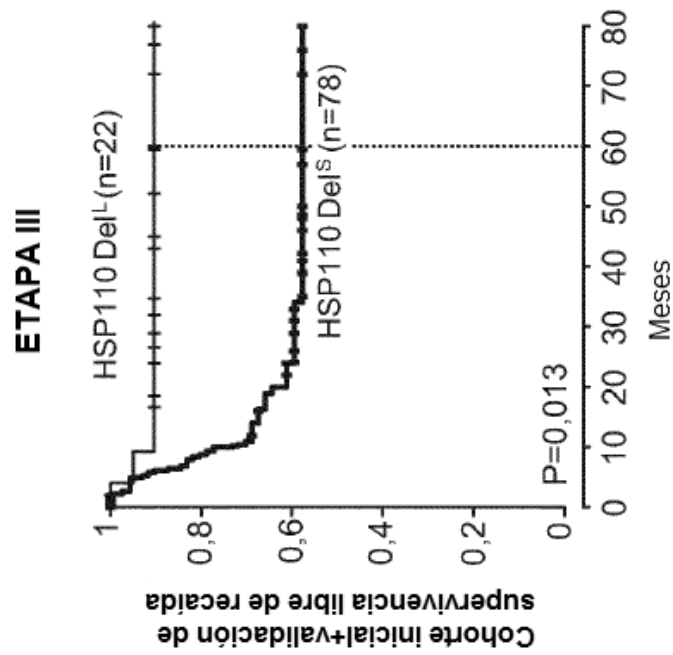
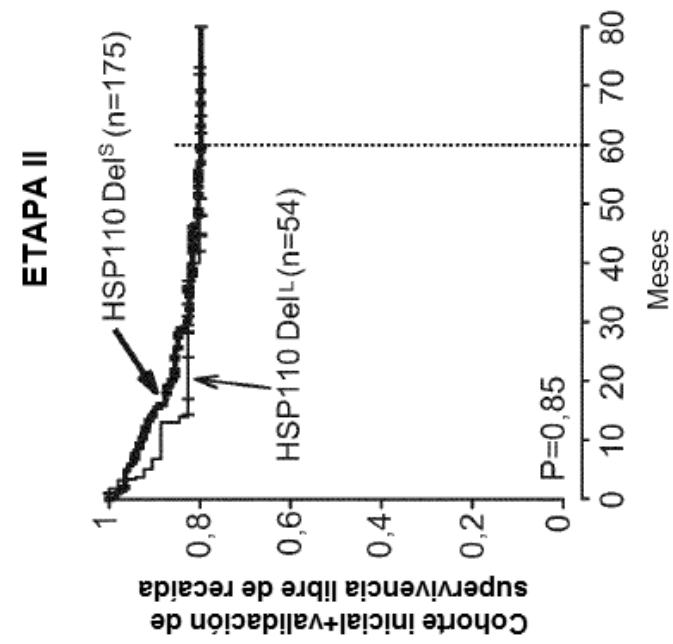


FIG.20

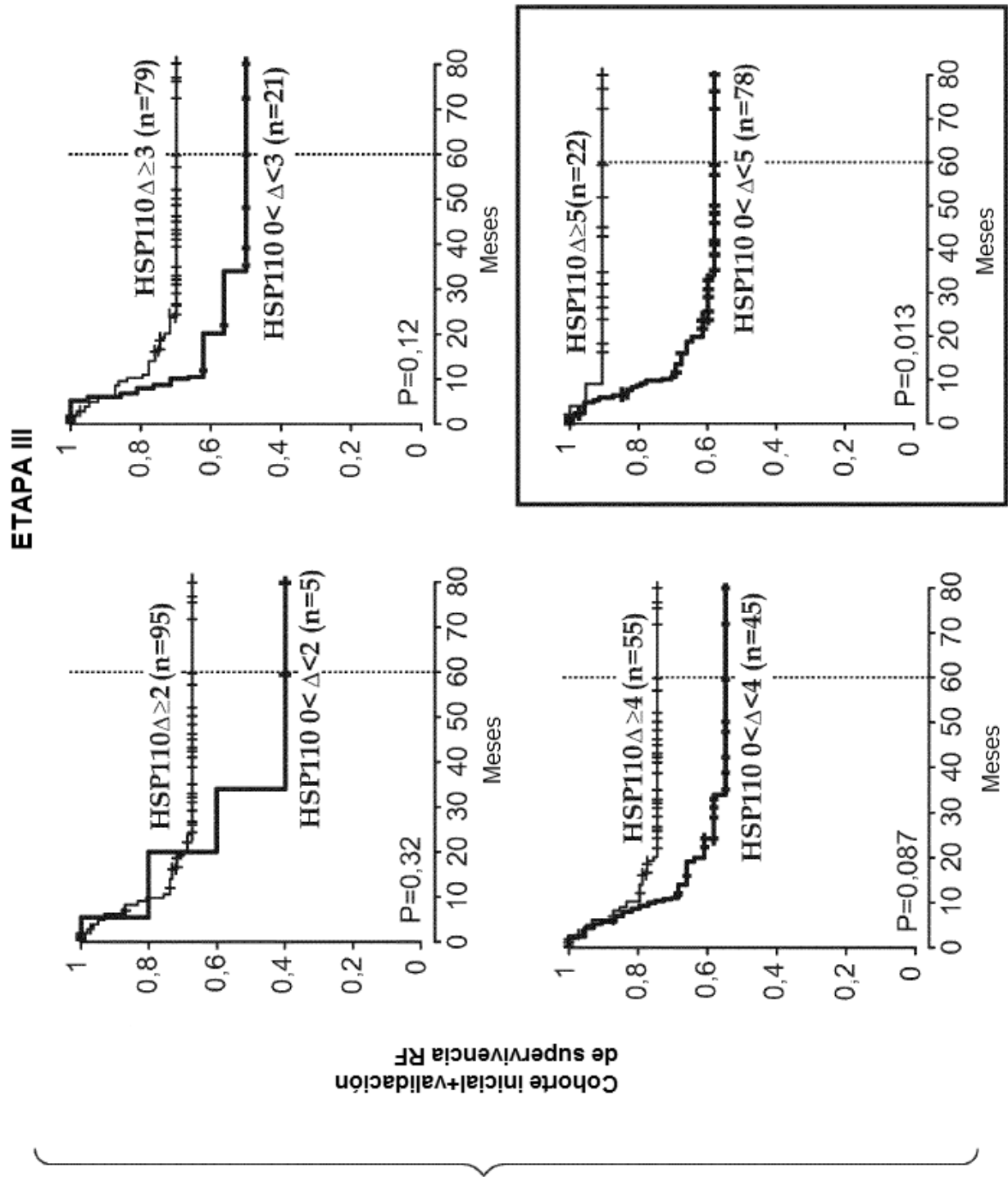


FIG.21

ETAPA II y III
bajo quimioterapia

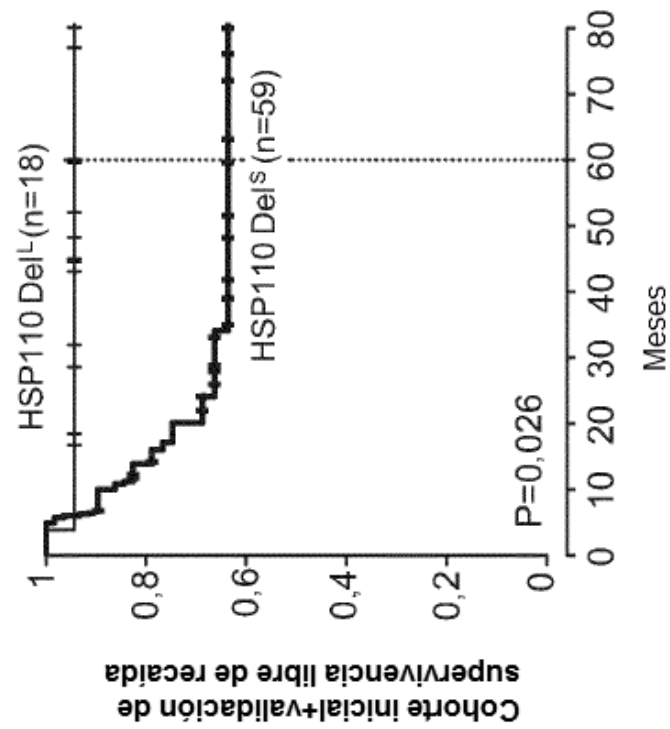


FIG.22

ETAPA II y III
bajo 5-fluorouracilo solo

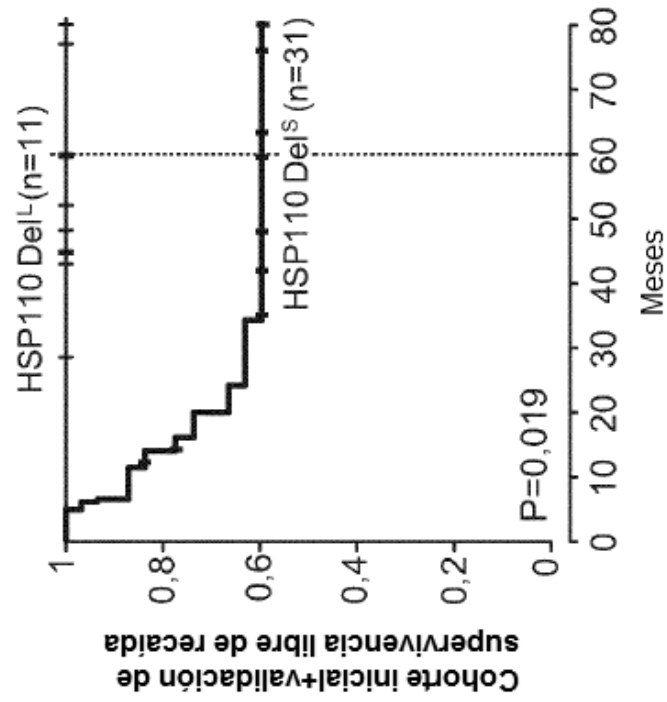


FIG.23