

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 629**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.03.2014 PCT/EP2014/056167**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14154809**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.03.2014 E 14712691 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2979096**

54 Título: **Integrina alfa-V-beta 6 para el diagnóstico/pronóstico del carcinoma colorrectal**

30 Prioridad:

**27.03.2013 EP 13161489**

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

**28.09.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÄT ZÜRICH (100.0%)  
Rämistrasse 71  
8006 Zürich, CH**

72 Inventor/es:

**ROGLER, GERHARD y  
SCHARL, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 634 629 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

Integrina alfa-V-beta 6 para el diagnóstico/pronóstico del carcinoma colorrectal

5 El carcinoma colorrectal es el tercer tumor más frecuente en todo el mundo. Aunque el carcinoma colorrectal puede ser tratado suficientemente y con frecuencia incluso se puede curar a condición de que el tumor sea pequeño y se detecte en una etapa temprana, el pronóstico de los pacientes que padecen carcinoma colorrectal metastásico no es satisfactorio, ya que muchos no sobreviven más allá de 5 años.

10 Hasta la fecha, sin embargo, no existen marcadores fiables disponibles, en particular marcadores séricos. Los marcadores tumorales comunes para el carcinoma colorrectal incluyen el antígeno carcinoembrionario (CEA, del inglés *carcinoembryonic antigen*) y CA19-9. Sin embargo, estos marcadores tumorales no son específicos para el carcinoma colorrectal. Además, además no son lo suficientemente sensibles para el diagnóstico definitivo de la enfermedad y pueden servir solo como marcadores de progreso durante el curso de la enfermedad. Pueden ser muy elevados en pacientes sin carcinoma colorrectal e incluso pueden estar en niveles normales en pacientes con carcinoma colorrectal muy avanzado.

20 Teniendo en cuenta la importancia crucial de un diagnóstico precoz para el resultado y el pronóstico de los pacientes con carcinoma colorrectal, existe una necesidad médica considerable de biomarcadores solubles para el diagnóstico no invasivo, económico y de alto rendimiento del carcinoma colorrectal. Dichos biomarcadores pueden ser útiles para i) mejorar la predicción del riesgo y el pronóstico del carcinoma colorrectal, ii) proporcionar un diagnóstico más precoz y más fiable del carcinoma colorrectal y iii) permitir controlar la progresión y la regresión del carcinoma colorrectal en tratamiento.

25 Por tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar biomarcadores para el diagnóstico del carcinoma colorrectal que mejoren el estado de la técnica. Este objetivo se consigue mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes.

30 Mediante el análisis de suero de pacientes, se descubrió sorprendentemente que la integrina alfa(v)beta(6) (integrina  $\alpha v \beta 6$ ) puede servir como un biomarcador del carcinoma colorrectal. Las muestras de suero se obtuvieron de pacientes de control sanos y de pacientes con carcinoma colorrectal. Los niveles de integrina  $\alpha v \beta 6$  se analizaron mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Se descubrieron niveles elevados de integrina  $\alpha v \beta 6$  en el grupo de pacientes con carcinoma colorrectal, lo que demuestra la importancia diagnóstica de la integrina  $\alpha v \beta 6$ .

35 Las secuencias de las subunidades de integrina alfa(v) y beta(6) están definidas por UniProt N.º P06756 y UniProt N.º P18564.

40 Las subunidades de integrina alfa(v) y beta(6) forman el heterodímero integrina alfa(v)beta(6) (integrina  $\alpha v \beta 6$ ).

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para el diagnóstico o el pronóstico del carcinoma colorrectal en un paciente o para la evaluación del riesgo de desarrollar o de haber desarrollado un carcinoma colorrectal en un paciente, comprendiendo dicho método la detección de una proteína indicadora seleccionada entre el grupo compuesto por la subunidad de integrina alfa(v), la subunidad de integrina beta(6) y el heterodímero de integrina alfa(v) beta(6). En algunas realizaciones, el método se realiza *ex vivo* en una muestra obtenida del paciente, en particular una muestra de sangre.

50 Puede usarse cualquier método conocido para la detección de la proteína indicadora (subunidad de integrina alfa(v), subunidad de integrina beta(6) o el heterodímero de integrina alfa(v) beta(6)) en una muestra tal como fluidos corporales. Los métodos que se tienen en consideración son, a modo de ejemplo no limitante, la cromatografía, la espectrometría de masas (y combinaciones de la misma), ensayos enzimáticos, la electroforesis y ensayos basados en anticuerpos (como ELISA, RIA (radioinmunoensayo, por sus siglas en inglés), EIA (inmunoensayo enzimático, por sus siglas en inglés), CLIA (inmunoensayos de quimioluminiscencia, por sus siglas en inglés) (véase Zhou et al., *J Zhejiang Univ Sci B*. Diciembre de 2005; 6(12):1148-1152 y las referencias citadas en el mismo), CEDIA (inmunoensayo de donador de la enzima clonado, por sus siglas en inglés) (véase Hamwi et al., *Am J Clin Pathol*. Octubre de 2000; 114(4):536-43 y las referencias citadas en el mismo), CMIA (inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes, por sus siglas en inglés) (véase Berry et al., *Clin Chem*. Octubre de 1988; 34(10):2087-90 y las referencias citadas en el mismo), MEIA (inmunoensayo enzimático por micropartículas, por sus siglas en inglés) (véase Rodrigues et al., *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Mayo de 2009; 104(3):434-40 y las referencias citadas en el mismo), FPIA (inmunoensayo de polarización de fluorescencia, por sus siglas en inglés) (véase Stricher et al., *Biochem J*. 15 de agosto de 2005; 390 (Parte 1):29-39 y las referencias citadas en el mismo), GLORIA (inmunoensayo rápido de lectura óptica marcado con oro, por sus siglas en inglés) (véase Armenta et al., *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 4, 2008 y las referencias citadas en el mismo), análisis de micromatrices, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos y ensayos de aglutinación de látex).

65 Los métodos bioanalíticos modernos facilitan la detección y el aislamiento directo de las proteínas, es decir sin la

- 5 unión previa de la proteína a un anticuerpo u otro ligando selectivo. La muestra puede someterse, por ejemplo, a uno o más desarrollos de cromatografía, seguidos de espectroscopia de masas o análisis por espectroscopia de masas multidimensional (HPCL-EM; CL-EMEM) para identificar el componente proteínico pertinente de una muestra cuantitativamente. Pueden preceder al análisis etapas de preparación de la muestra para retirar, por ejemplo, células o componentes sanguíneos no pertinentes.
- 10 En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "cantidad" también se refiere a la concentración. Es evidente que a partir de la cantidad total de un compuesto de interés en una muestra de tamaño conocido, la concentración del compuesto puede calcularse y viceversa.
- 15 En el contexto de la presente invención el término "muestra" se refiere a cualquier componente de la muestra independientemente de la separación de los componentes y abarca el contenido proteínico de una muestra de sangre procesada mediante varias etapas de separación o lavado.
- 20 Se ofrecen diversos métodos de muestreo para poner en práctica la invención. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de sangre, en particular una muestra de sangre periférica. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de suero, en particular obtenida a partir de una muestra de sangre periférica.
- 25 Algunas realizaciones incluyen el uso de uno o más ligandos específicamente reactivos a una proteína indicadora seleccionada entre el grupo compuesto por la subunidad de integrina alfa(v) y la subunidad de integrina beta(6).
- 30 En algunas realizaciones, el método comprende la detección de la proteína indicadora mediante la detección de la presencia de un ligando unido a la proteína indicadora, en el que el ligando es específicamente reactivo a la proteína indicadora.
- 35 Un ligando, en particular un ligando específicamente reactivo a una proteína indicadora, de acuerdo con cualquier aspecto o realización de la invención, puede ser cualquier molécula que se una a la proteína indicadora seleccionada entre el grupo compuesto por la subunidad de integrina alfa(v) y la subunidad de integrina beta(6) con afinidad y especificidad altas.
- 40 Alta afinidad en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la constante de disociación de la unión del ligando a la proteína indicadora, en la que la constante de disociación es de  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  o  $10^{-9}$  mol/l o menos y en la que el ligando no se une a proteínas de control con características estructurales no relacionadas. Son proteínas de control, a modo de ejemplo no limitante, proteínas plasmáticas tales como albúminas, globulinas, lipoproteínas, fibrinógenos, protrombina, proteínas de fase aguda, marcadores tumorales tales como CEA, CA19-9 o AFP y transferrina.
- 45 Alta especificidad en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere a la relación de la proteína indicadora correctamente detectada y la suma de todos los polipéptidos detectados, en la que la relación es del 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 %, el 99 % o el 99,9 %.
- 50 La expresión "ligando unido a la proteína indicadora" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere en particular a un ligando que está unido no covalentemente a la proteína indicadora con afinidad y especificidad altas.
- 55 La expresión "detectar la presencia de un ligando" en el contexto de la presente memoria descriptiva se refiere en particular a la detección de una cantidad del ligando que es igual o superior al límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés).
- 60 En ciertas realizaciones, el ligando es un anticuerpo.
- 65 En ciertas realizaciones, el ligando es una inmunoglobulina gamma.
- En ciertas realizaciones, el ligando es un anticuerpo monoclonal que se une a o que se genera contra la subunidad de integrina alfa(v) o la subunidad de integrina beta(6).
- Un ejemplo no limitante de dicho anticuerpo monoclonal es el anticuerpo contra la subunidad de integrina beta(6) de USCNK Life Sciences Inc., Wuhan, China (Kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas para la integrina  $\beta 6$ , E92099Hu).
- En ciertas realizaciones, se emplea el anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma ATCC HB12382 (documento US 7.150.871) como ligando.
- En ciertas realizaciones, el ligando es un fragmento Fab de un anticuerpo. Un fragmento Fab es el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, específicamente reactivo a la proteína indicadora.
- En otras realizaciones, el ligando es un anticuerpo de dominio único (sdAb o nanocuerpo), por ejemplo un anticuerpo

de fragmento variable monocatenario (scFv) seleccionado por métodos de presentación de fagos, o un anticuerpo de camélido, específicamente reactivo a la proteína indicadora.

5 Como alternativa, un ligando empleado en la práctica de la invención puede ser una molécula obtenida por ingeniería genética o seleccionada para mostrar una especificidad y una afinidad altas por la proteína indicadora. Dicha molécula obtenida por ingeniería genética o seleccionada puede ser un polipéptido similar a anticuerpo o un anticuerpo sintético seleccionado por presentación de fagos (véase Pini et al., *J. Biol. Chem.* (1998) 273, 21769-21776) y las referencias citadas en el mismo o por otros métodos de selección evolutiva). Como alternativa, el ligando puede ser un polinucleótido o Spiegelmer con una alta selectividad para la proteína indicadora (por ejemplo SELEX, véase Ellington y Szostak, *Nature* 346, 818-822 y las referencias citadas en el mismo).

Una molécula similar a anticuerpo puede ser, pero no se limita a, una proteína de repetición, tal como una "proteína de repetición de anquirina diseñada" (Molecular Partners, Zurich).

15 En otras realizaciones de la invención, el ligando es un ligando de la integrina avb6, como LAP-TGF- $\beta$ , osteopontina, fibronectina o miembros de la familia ADAM.

En otras realizaciones de la invención, el ligando es un antagonista de la proteína indicadora, tal como una molécula pequeña o un péptido cíclico (véase el documento EP 1754714 A1).

20 De acuerdo con algunas realizaciones, el método de la invención comprende adicionalmente las etapas de poner en contacto, en una primera etapa de contacto, la muestra con un primer ligando específicamente reactivo a la proteína indicadora, y determinar, en una etapa de cuantificación, la cantidad de proteína indicadora unida al ligando.

25 En algunas realizaciones, el método comprende de este modo las siguientes etapas:

– se pone en contacto sangre u otra muestra de fluido obtenida de un paciente, opcionalmente después de un tratamiento para la retirada de componentes irrelevantes, con una superficie, como consecuencia de lo cual los componentes de la muestra se adhieren a la superficie (por ejemplo, a través de interacciones de carga o interacciones hidrófobas);

– opcionalmente, se añade un reactivo de bloqueo para bloquear cualquier superficie que permanezca sin recubrir por la muestra y de este modo pueda conducir a la unión del anticuerpo posterior u otros ligandos. Son ejemplos de dichos reactivos de bloqueo detergentes (por ejemplo, Triton X-100 o Tween) o proteínas (por ejemplo albúmina de suero bovino, leche en polvo no grasa, caseína o gelatina de pescado).

– un primer ligando específicamente reactivo a la proteína indicadora (subunidad de integrina alfa(v), subunidad de integrina beta(6) o su heterodímero) se une a la proteína indicadora unida a la superficie;

40 – un ligando específicamente reactivo a el primer ligando se pone en contacto con el primer ligando y se determina la cantidad de proteína indicadora unida al primer ligando;

– opcionalmente, se introduce una etapa de lavado entre la primera y la segunda etapa para retirar cualquier componente de la muestra que no interactúe con la superficie. Otra etapa de lavado puede seguir a la segunda etapa de contacto y preceder a la determinación de la proteína indicadora.

En ciertas realizaciones, el ligando específicamente reactivo a el primer ligando es un anticuerpo. Si el primer ligando es un anticuerpo, el ligando específicamente reactivo a el primer ligando puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal específico para el primer anticuerpo o fragmentos del mismo, tales como las regiones Fc o Fab. En ciertas realizaciones, el anticuerpo específicamente reactivo a el primer anticuerpo se fija o es específicamente susceptible de fijarse a una actividad enzimática o un marcador detectable.

En un ELISA clásico el ligando específicamente reactivo a el primer ligando es un anticuerpo específicamente reactivo a la parte Fc de la IgG o IgM humana y lleva a una actividad enzimática o marcador. Normalmente, el anticuerpo específicamente reactivo a el primer anticuerpo está fijado a peroxidasa de rábano picante o a un marcador fluorescente.

En realizaciones en las que el primer ligando es un anticuerpo que está marcado con biotina, el ligando específicamente reactivo a el primer ligando es estreptavidina o avidina que se unen fuertemente a la biotina fijada al primer ligando. En dichas realizaciones, la avidina o la estreptavidina se fijan entonces a una actividad enzimática o a un marcador detectable.

En algunas realizaciones, la detección de la proteína indicadora se realiza en un inmunoensayo homogéneo, tal como EMIT (técnica de inmunoensayo multiplicada por enzima, por sus siglas en inglés) (Beresini et al., *Clin Chem.* Noviembre de 1993; 39 (11 Parte 1):2235-41 y las referencias citadas en el mismo) o un inmunoensayo homogéneo

basado en TERF (Kreisig et al., *Anal Chem.* 1 de junio 2011; 83(11):4281-7 y las referencias citadas en el mismo).

5 En el inmunoensayo homogéneo basado en TERF, a la muestra se le adiciona una cantidad fija de péptido derivatizado con un fluoróforo fuera del sitio de reconocimiento de anticuerpos (péptido donador). Este péptido tiene una menor afinidad por el sitio de reconocimiento de anticuerpos de la proteína indicadora. Si no hay ninguna proteína indicadora presente, el péptido donador se une al anticuerpo marcado con aceptor, apagando la intensidad de emisión del donador debido a la TERF. Si la proteína indicadora está presente, el péptido donador compete con el analito, dando como resultado una señal más alta debido al péptido donador parcialmente liberado.

10 En algunas realizaciones, el ligando tiene una cualidad fluorescente o luminiscente y la determinación de la cantidad de proteína indicadora se realiza mediante citometría activada por fluorescencia. Una cualidad fluorescente o luminiscente en el sentido de la invención se refiere a la capacidad del primer ligando de emitir luz después de la excitación por la luz (de una longitud de onda más corta que la longitud de onda de excitación).

15 En algunas realizaciones, el método de acuerdo con la invención implicará la comparación de la cantidad determinada de proteína con un patrón. Una medición absoluta puede conseguir la precisión y la validez deseadas, por ejemplo, si puede alcanzarse una determinación reproducible de la unión, como es el caso para los ensayos de resonancia de plasmón superficial (SPR, por sus siglas en inglés) con un dispositivo de SPR correctamente calibrado, o las lecturas espectroscópicas en HPLC, donde la integral del cromatograma es proporcional a la cantidad de analito.

20 En algunas realizaciones, el ligando está fijado a una superficie. Una superficie es la superficie de un pocillo de microtitulación, un dispositivo de laboratorio en un chip (LOC, por sus siglas en inglés, análisis de microfluidos), una micromatriz o el material de la matriz de un inmunoensayo de flujo lateral.

25 Un ligando se fija, en el contexto de la presente invención, si el ligando está unido a la superficie por enlaces covalentes o no covalentes de manera que la fijación resista etapas de lavado repetidas con tampón acuoso de pH 5-8. Un ejemplo de fijación es un enlace covalente, por ejemplo, por enlace éster o amida o puente disulfuro; otro es el enlace estreptavidina-biotina o la adsorción simple de proteínas a superficies poliméricas. Los ligandos pueden fijarse a superficies de oro, por ejemplo, mediante grupos sulfuro.

30 En algunas realizaciones, la superficie es la superficie de un chip de microbalanza de resonancia de plasmón superficial o cuarzo, que permitirá la medición directa de la cantidad de proteína indicadora unida al ligando por medio de los cambios efectuados en las propiedades físicas del chip. La cantidad de proteína indicadora se determina de este modo directamente.

35 De acuerdo con algunas realizaciones, la etapa de cuantificación comprende adicionalmente el uso de un segundo ligando con especificidad por la proteína del indicador fijado. El segundo ligando se une a una sección de superficie diferente de la diana con el fin de permitir que el primer y el segundo ligando sean capaces de unirse de forma conjunta.

40 En algunas realizaciones, el ligando, en particular el primer ligando y/o el segundo ligando lleva una actividad enzimática o marcador, tal como una peroxidasa, para permitir ajustar el método en los formatos de ELISA bien establecidos. Otros marcadores pueden ser, pero no se limitan a, una actividad fosfatasa o luciferasa, o el marcador detectable es un marcador radiactivo o una partícula de oro.

45 En algunas realizaciones, el ligando, en particular el primer ligando y/o el segundo ligando tienen una cualidad ópticamente detectable tal como un marcador de color, una cualidad fluorescente, una fosforescente o una luminiscente.

50 En general, los marcadores adecuados son marcadores cromógenos, es decir, enzimas que pueden usarse para convertir un sustrato en un compuesto coloreado o fluorescente detectable, marcadores espectroscópicos, por ejemplo, marcadores fluorescentes o marcadores que presentan un color visible, marcadores de afinidad que pueden desarrollarse por un compuesto específico adicional para el marcador y que permite la fácil detección y cuantificación o cualquier otro marcador adecuado para formatos de ELISA convencionales. Los ejemplos de marcadores fluorescentes o marcadores que presentan un color visible incluyen, sin estar restringidos a, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, alofocianina (APC), peridinin clorofila (PerCP), ficoeritrina (PE), Alexa Fluors (Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), compuestos fluorescentes DyLight (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) Colorantes ATTO (ATTO-TEC GmbH, Siegen, Alemania), Colorantes BODIPY (colorantes a base de 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) y similares.

55 Un marcador o una actividad enzimática ópticamente detectables pueden detectarse en una superficie.

60 En algunas realizaciones, el método de acuerdo con la invención comprende de este modo las siguientes etapas:

65 – en una primera etapa de contacto, una muestra de sangre u otra muestra de fluido obtenida de un paciente se

pone en contacto, opcionalmente después de un tratamiento para la retirada de componentes irrelevantes, con una superficie sobre la que se fija un primer ligando específicamente reactivo a la proteína indicadora (subunidad de integrina alfa(v), subunidad de integrina beta(6) o su heterodímero);

- 5 – en una segunda etapa de contacto, un segundo ligando se pone en contacto con la superficie y se determina la cantidad del segundo ligando.
- Opcionalmente, se introduce una etapa de lavado entre la primera y la segunda etapa de contacto para retirar cualquier componente de la muestra distinto de la proteína indicadora. De este modo, la muestra se retira junto con cualquier componente previamente contenido en la misma que no se hubiera unido por el primer ligando.

10 Otra etapa de lavado puede seguir a la segunda etapa de contacto y preceder a la determinación del segundo ligando.

De acuerdo con algunas realizaciones, el primer y el segundo ligando se fijan a los respectivos componentes de un sistema que permite determinar una medición cuantitativa de compañeros emparejados por proximidad, tal como el "ensayo homogéneo de proximidad luminiscente amplificado (ALPHA, por sus siglas en inglés)" comercializado por Perkin Elmer, con lo que el oxígeno singlete se transfiere de un compañero donador a un aceptor, dando como resultado la emisión de luz, si los dos compañeros están a 200 nm de distancia. Dicha disposición permite la práctica de la invención en solución.

15 De acuerdo con otras realizaciones, un volumen líquido de muestra se coloca en un área de muestra compuesta de manera que proporcione fuerzas capilares que actúan para transportar al menos una parte de la muestra hacia un área de análisis. Entre el área de muestra y el área de análisis, o como parte del área de muestra, se proporciona un área de conjugado. Se proporcionan primeros ligandos específicos para la proteína indicadora, sin fijación a la matriz, en el área de conjugado, y tras la unión a la proteína indicadora en la muestra, estos primeros ligandos son arrastrados con el flujo capilar al área de análisis. Los primeros ligandos de acuerdo con la presente realización de la invención se conjugan con micropartículas de látex o de oro o con proteínas enzimáticamente activas. Los segundos ligandos se fijan al área de análisis, formando una línea. Tras la unión de las proteínas indicadoras (con primeros ligandos fijados) a los segundos ligandos, los "sándwiches" resultantes de segundo ligando, proteína indicadora y primer ligando forman una línea, que puede ser visible como tal (si las partículas se fijan a los primeros ligandos) o puede volverse visible proporcionando un sustrato para una actividad enzimática fijada al primer ligando. La presente realización se denomina ensayo de flujo lateral.

20 En algunas realizaciones, el nivel de proteína o proteínas indicadoras de la muestra se compara con los niveles correspondientes de una muestra o muestras de un sujeto o sujetos sanos. Un nivel alterado en comparación con el nivel de la muestra de un sujeto sano es indicativo de una enfermedad o del riesgo de desarrollar la enfermedad.

25 De acuerdo con ciertas realizaciones, los niveles medidos de proteína indicadora (subunidad de integrina alfa(v), subunidad de integrina beta(6) o su heterodímero) indica si un individuo padece carcinoma colorrectal o tiene un riesgo aumentado de desarrollar dicha enfermedad. Las expresiones utilizadas en este contexto, es decir, "nivel no aumentado", "nivel no elevado", "niveles aumentados" y "niveles disminuidos" son conocidas o pueden determinarse por el experto en la materia de acuerdo con, por ejemplo, el procedimiento esbozado en los párrafos siguientes.

30 En algunas realizaciones, el nivel de la proteína indicadora se compara con un umbral definido. En algunas realizaciones, el umbral de la proteína indicadora se define como entre 2 y 10 ng de integrina  $\alpha\beta6$ , subunidad de integrina alfa(v) o subunidad de integrina beta(6)/ml. En algunas realizaciones, el umbral de la proteína indicadora se define como entre 3 y 8 ng de integrina  $\alpha\beta6$ , subunidad de integrina alfa(v) o subunidad de integrina beta(6)/ml. En algunas realizaciones, el umbral de la proteína indicadora se define como 4 ng de integrina  $\alpha\beta6$ , subunidad de integrina alfa(v) o subunidad de integrina beta(6)/ml. Los pacientes con un nivel sérico o plasmático de integrina  $\alpha\beta6$ , subunidad de integrina alfa(v) o subunidad de integrina beta(6) > 2 ng/ml, > 3 ng/ml o > 4 ng/ml muestran un aumento de la probabilidad de padecer la enfermedad metastásica, un tumor indiferenciado, un tumor más avanzado y una menor esperanza de supervivencia más allá de 5 años. Un nivel sérico de integrina  $\alpha\beta6$ , subunidad de integrina alfa(v) o subunidad de integrina beta(6) > 2 ng/ml, 3 ng/ml o > 4 ng/ml puede servir como un indicador de enfermedad avanzada y un marcador pronóstico para la supervivencia más corta de los respectivos pacientes.

35 El experto en la materia es capaz de determinar los valores reales correspondientes al "nivel no aumentado", "nivel no elevado", "nivel aumentado" y "nivel disminuido" para los marcadores bioquímicos relevantes. Por ejemplo, los niveles pueden asignarse de acuerdo con percentiles de los niveles observados en una muestra representativa de individuos aparentemente sanos, normalmente por debajo de una edad de 50 años. La muestra debe ser de un tamaño suficiente para producir resultados estadísticamente significativos (por ejemplo, al menos 100, más preferentemente al menos 500, más preferentemente al menos 1000 individuos). Un nivel no aumentado puede corresponder, a modo de ejemplo, al nivel máximo observado en el percentil 97,5 % de los individuos sanos. Como alternativa, los niveles pueden determinarse como "intervalos normales" como se sabe en el estado de la técnica.

40 Los niveles también pueden determinarse o refinarse adicionalmente mediante estudios realizados en individuos mediante la comparación de niveles de proteína indicadora de individuos aparentemente sanos con individuos que

padecen carcinoma colorrectal. Dichos estudios pueden permitir también adaptar los niveles de acuerdo con el tipo de enfermedad y/o ciertos subgrupos de pacientes, por ejemplo, pacientes de edad avanzada, pacientes sometidos a medicación o pacientes con un cierto estilo de vida.

5 El valor de los niveles considerados como "aumentados" o "disminuidos" también puede elegirse de acuerdo con la sensibilidad o la especificidad (astringencia) de exclusión deseadas. Cuanto mayor es la sensibilidad deseada, menor es la especificidad de exclusión y viceversa. En el ejemplo anterior, cuanto mayor es el percentil elegido para determinar cada nivel, más estricto es el criterio de exclusión, es decir, menos individuos serían considerados "individuos en riesgo".

10 El método de la invención también permite la determinación del riesgo o de la probabilidad de un individuo de padecer carcinoma colorrectal. En el contexto de la presente invención, los términos "riesgo" o "probabilidad" se refieren a la probabilidad de un paciente en particular de desarrollar carcinoma colorrectal. El grado de riesgo puede estar aumentado, no aumentado, aumentado o muy aumentado. "Riesgo no aumentado" o "pequeña probabilidad" significa que al parecer existe muy poco o ningún aumento del riesgo de padecer o desarrollar carcinoma colorrectal en comparación con el riesgo promedio de un individuo sano.

15 El grado de riesgo se asocia al nivel de proteínas indicadoras. Un nivel no alterado de proteínas indicadoras indica un riesgo no aumentado, un nivel alterado de proteínas indicadoras indica un riesgo aumentado y un nivel muy alterado de proteínas indicadoras indica un riesgo muy aumentado.

20 Si se altera el nivel de proteína indicadora (subunidad de integrina alfa(v), subunidad de integrina beta (6) o su heterodímero), podría recomendarse al paciente someterse a procedimientos adicionales de diagnóstico tales como una colonoscopia, o un tratamiento primario o intervenciones secundarias como el inicio de cambios terapéuticos de estilo de vida, terapia farmacológica dependiendo de la constelación de factores de riesgo y revisiones a intervalos regulares. Si el método de diagnóstico de la presente invención indica un riesgo aumentado o muy aumentado, esa información puede utilizarse para recomendar el tratamiento adicional del individuo.

25 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de un dispositivo para el diagnóstico del carcinoma colorrectal, en el que el dispositivo comprende una superficie, y dicha superficie comprende un ligando específicamente reactivo a la proteína indicadora (subunidad de integrina alfa(v), subunidad de integrina beta(6) o su heterodímero).

30 En algunas realizaciones, la superficie es una placa de ELISA, un dispositivo de LOC, un chip de resonancia de plasmón superficial, una superficie de un sensor de microbalanza de cuarzo o el material de la matriz de un inmunoensayo de flujo lateral.

35 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona el uso de un kit de partes para el diagnóstico del carcinoma colorrectal en un paciente o para evaluar el riesgo de desarrollar o de haber desarrollado un carcinoma colorrectal de un paciente, comprendiendo dicho kit un primer ligando y un segundo ligando, siendo ambos ligandos específicamente reactivos a una proteína indicadora seleccionada entre la subunidad de integrina alfa(v), la subunidad de integrina beta(6) y su heterodímero.

40 De acuerdo con ciertas realizaciones del presente aspecto de la invención, el primer ligando se fija a la superficie de una placa de microtitulación y el segundo ligando comprende una actividad enzimática o una actividad luminiscente.

En algunas realizaciones, el ligando es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo de dominio único.

45 El descubrimiento en el que se basa la presente invención proporciona pruebas de que la integrina  $\alpha\beta6$  o su subunidad alfa (v) o beta (6) puede servir como un biomarcador del carcinoma colorrectal. Los niveles séricos de integrina  $\alpha\beta6$ , de la subunidad de integrina alfa (v) o de la subunidad de integrina beta (6) están significativamente elevados en los pacientes que padecen carcinoma colorrectal. Los niveles séricos de integrina  $\alpha\beta6$ , subunidad de integrina alfa (v) o subunidad de integrina beta (6) en los pacientes de control sanos están en o por debajo del nivel de detectabilidad.

50 En principio, los biomarcadores que indican la aparición del carcinoma colorrectal serían buenos indicadores de enfermedad. En comparación con los predictores de riesgo convencionales un marcador de enfermedad existente de este tipo también debería permitir una predicción del riesgo absoluto más reproducible en diferentes poblaciones que los factores de riesgo cuya penetrancia está fuertemente influenciada por factores ambientales.

55 En ciertas realizaciones, el método de la invención se usa para el control de la progresión y la regresión del carcinoma colorrectal tras el tratamiento. Hasta el momento la progresión y la regresión del carcinoma colorrectal solo podían evaluarse mediante técnicas de imagen. En ciertas realizaciones, el método de la invención se usa para controlar el éxito del tratamiento mediante el análisis de sangre simple. La disponibilidad de dicho control de sangre es ventajosa no solo para el tratamiento clínico de los pacientes, sino también para el desarrollo de fármacos

novedosos, debido a que dicho biomarcador puede usarse como marcador sustituto en ensayos de fase 3 sin criterios de valoración.

5 En ciertas realizaciones, el método de la invención se usa en el diagnóstico y la estrategia de tratamiento agudos del carcinoma colorrectal. Hasta el momento este diagnóstico era posible ya sea mediante formación de imágenes radiológicas, tales como la exploración por tomografía axial computarizada o la exploración por resonancia magnética o mediante endoscopia. Sin embargo, estos procedimientos pueden tener efectos secundarios graves, por ejemplo debido a la radiación o el riesgo de perforación o lesiones intestinales.

10 En ciertas realizaciones, el método de la invención se usa para predecir el estadio del tumor de acuerdo con la clasificación TNM, así como para el pronóstico de los pacientes que padecen carcinoma colorrectal. Hasta el momento, no existía un marcador disponible que fuera capaz de predecir el estadio del tumor, así como el pronóstico y la supervivencia de pacientes con carcinoma colorrectal adecuadamente. Sin embargo, dicha información sería de gran ayuda en el tratamiento de pacientes con carcinoma colorrectal.

15 En ciertas realizaciones, el método de la invención se usa para predecir si hay presentes ciertas mutaciones asociadas al carcinoma colorrectal en el tejido tumoral de los pacientes, a saber, mutaciones en el gen que codifica el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el gen K-Ras y el gen B-Raf. Hasta el momento estos diagnósticos eran posibles solamente mediante la evaluación histopatológica y/o genética molecular de la muestra de tejido tumoral tomada por endoscopia o cirugía. Sin embargo, estos procedimientos pueden tener efectos secundarios graves, por ejemplo debido al riesgo de perforación o lesiones intestinales y además son muy caros.

20 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la progresión del carcinoma colorrectal, en el que el método comprende el método para el diagnóstico o pronóstico del carcinoma colorrectal, o para evaluar el riesgo de un paciente de desarrollar o haber desarrollado un carcinoma colorrectal de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que la progresión del carcinoma colorrectal se determina mediante la detección o cuantificación (determinación de la cantidad de) la proteína indicadora.

25 En algunas realizaciones, la proteína indicadora se mide en el momento del diagnóstico en la sangre o el suero del paciente respectivo para determinar o evaluar la progresión del carcinoma colorrectal y la medición se repite sistemáticamente, en particular cada tres meses.

30 En algunas realizaciones, un aumento en el nivel sanguíneo o sérico de la proteína indicadora en cualquier punto temporal después de la medición inicial es indicativo de la progresión del carcinoma colorrectal.

35 De acuerdo con otro aspecto más de la invención, se proporciona un método para la determinación de la eficacia de una terapia para un carcinoma colorrectal, en el que el método comprende el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que se determina la remisión o la progresión del carcinoma colorrectal mediante la detección o cuantificación de la proteína indicadora.

40 En algunas realizaciones, con el fin de determinar la eficacia de una terapia del carcinoma colorrectal, la proteína indicadora se mide en el momento del diagnóstico y antes de un tratamiento antineoplásico, tal como la cirugía, la radiación o la quimioterapia, en la sangre o el suero del paciente respectivo, en particular antes del primer tratamiento antineoplásico y se repite sistemáticamente, en particular cada tres meses.

45 En algunas realizaciones, una disminución en el nivel sanguíneo o sérico de la proteína indicadora en cualquier punto temporal después del tratamiento antineoplásico (por ejemplo en caso de cirugía o radiación), en particular después de tres meses o durante el tratamiento antineoplásico (por ejemplo en caso de quimioterapia) es indicativa de la eficacia de la terapia respectiva para el carcinoma colorrectal, en el que ninguna disminución en el nivel sanguíneo o sérico de la proteína indicadora indica una eficacia insuficiente o inexistente de la terapia antineoplásica respectiva.

50 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la estadificación de un carcinoma colorrectal, en el que el método comprende el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en el que el carcinoma colorrectal es estadifica mediante la detección o cuantificación de la proteína indicadora.

55 En algunas realizaciones, un nivel sanguíneo o sérico de la proteína indicadora por encima de 4 ng/ml indica un carcinoma colorrectal que se caracteriza por un estadio tumoral de al menos T2, M1 y/o G2 de acuerdo con el sistema de estadificación TNM (desarrollado y mantenido por la Unión para el control Internacional del cáncer).

60 La medición de la presencia de integrina  $\alpha\beta 6$ , la subunidad de integrina alfa ( $\alpha$ ) o la subunidad de integrina  $\beta 6$  (ITGB6) en la sangre, en particular en el suero, es una alternativa barata, rápida y no invasiva. Los biomarcadores que están disponibles actualmente y que se asocian a la aparición del carcinoma colorrectal, tal como el antígeno carcinoembrionario (CEA) o CA19-9, no son suficientemente específicos ni sensibles para los fines descritos anteriormente. Por tanto, la presente invención no solo es útil para identificar pacientes en riesgo, sino también para controlar las intervenciones y para obtener información que desempeña un papel crítico para el tratamiento adicional

de los pacientes.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos y las figuras, de los que pueden derivar más ventajas y realizaciones de las invenciones:

- 5
- Breve descripción de las figuras**
- 10
- 15
- Fig. 1 Los niveles séricos de integrina  $\alpha\beta6$  están aumentados en los pacientes con carcinoma colorrectal. Los niveles séricos de integrina  $\alpha\beta6$  son más altos en los pacientes con carcinoma colorrectal que en los pacientes con enfermedad inflamatoria activa, en los pacientes con enfermedad de Crohn fistulizante o en los pacientes de control sanos. El análisis por ELISA usando muestras de suero de 10 pacientes de control sanos, 20 pacientes con enfermedad de Crohn que presentan un tipo de enfermedad inflamatoria y 20 pacientes con EC que presentan un curso de la enfermedad fistulizante. Adicionalmente, se detectaron niveles séricos de ITGB6 en una cohorte no seleccionada de 80 pacientes con cáncer colorrectal (CoCa) (cualquier estado T, cualquier estado N, cualquier estado M).
- 20
- Fig. 2 Los niveles séricos de ITGB6 > 4 ng/ml son un factor pronóstico de supervivencia. Los pacientes que presentan un nivel sérico de ITGB6 > 4 ng/ml muestran una tasa de supervivencia más corta que los pacientes con un nivel sérico de ITGB6 < 4 ng/ml.
- 25
- Fig. 3 Los niveles séricos de ITGB6 > 4 ng/ml son un factor pronóstico del estadio del tumor. Los pacientes que presentan un nivel sérico de ITGB6 > 4 ng/ml muestran un mayor estado T que los pacientes con un nivel sérico de ITGB6 < 4 ng/ml.
- 30
- Fig. 4 Los niveles séricos de ITGB6 > 4 ng/ml son un factor de pronóstico para la metástasis tumoral. Los pacientes que presentan un nivel sérico de ITGB6 > 4 ng/ml muestran siempre metástasis a diferencia de los pacientes con un nivel sérico de ITGB6 < 4 ng/ml.
- Fig. 5 Los niveles séricos de ITGB6 > 4 ng/ml son un factor pronóstico para la diferenciación del tejido tumoral. Los pacientes que presentan un nivel sérico de ITGB6 > 4 ng/ml muestran mayores grados G que los pacientes con un nivel sérico de ITGB6 < 4 ng/ml.

Ejemplo 1: ELISA

35

Se analizaron muestras de suero de pacientes de control sanos (controles, n = 10), pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria aguda (EII activa, n = 20), pacientes con enfermedad de Crohn fistulizante (n = 20) y carcinoma colorrectal (CoCa, n = 80) mediante ELISA. Como se muestra en la figura 1, el valor medio de ITGB6 en el suero de pacientes de control sanos es de casi cero, lo que significa que no es detectable en esta población. Un resultado similar puede observarse en los pacientes con EII que presentan un fenotipo de enfermedad inflamatoria.

40

En este grupo, el valor medio de las muestras de suero analizadas también es de casi cero. Por el contrario, en pacientes con carcinoma colorrectal, la integrina  $\alpha\beta6$  puede detectarse en el suero, indicada por el valor medio claramente elevado de integrina  $\alpha\beta6$  en este grupo.

Ejemplo 2: Inmunohistoquímica

45

Métodos: Se examinaron la expresión de ITGB6 y la colocalización con la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP9) y la fibronectina en la metástasis en el hígado (n = 13) y en los tumores primarios (n = 10) de pacientes con carcinoma colorrectal (CCR) mediante inmunohistoquímica (IHQ). Se evaluaron los niveles séricos de integrina alfa(v)beta6 (ITGB6) en pacientes con CCR bien caracterizados (n = 64) mediante ELISA. Se analizó la correlación con características clínicas y patológicas. Se evaluaron los niveles de mRNA por TI-PCR en tiempo real en células epiteliales intestinales HT29 (CEI).

50

Resultados: Por IHQ, se descubrió una considerable tinción de ITGB6 a lo largo del frente de invasión del tejido de CCR primario y de la metástasis de CCR en el hígado. La IHQ reveló la coexpresión de células con ITGB6 teñida con MMP9, que se activa por ITGB6, así como con fibronectina, el ligando de ITGB6, en el frente de invasión. Adicionalmente, se pudieron descubrir niveles considerablemente más altos de ITGB6 en muestras de tejido teñidas de forma inmunohistoquímica de tumores de colon primario así como en metástasis hepáticas de pacientes con un nivel de ITGB6 sérica por encima de 4 ng/ml en comparación con muestras de pacientes con un nivel sérico de ITGB6 por debajo del valor de corte de 4 ng/ml.

55

60

La ITGB6 fue detectable en el suero de pacientes con CCR que mostraron un valor de corte claro de ITGB6 4 ng/ml. Los niveles séricos más altos se asociaron a una peor supervivencia ( $2,51 \pm 1,44$  frente a  $4,43 \pm 3,71$  años). Todos los pacientes con niveles superiores a ITGB6 4 ng/ml revelaron estadio T  $\geq 2$ , estadio G  $\geq 2$ , indicativo de tumores infiltrantes y desdiferenciados, así como el 100 % de enfermedad metastásica (M).

65

Basándose en los datos del paciente, en el momento del diagnóstico, el nivel sérico de la proteína indicadora por

encima del punto de corte de 4 ng/ml indica que el estadio tumoral de acuerdo con las clasificaciones aceptadas internacionalmente es al menos T2, M1, G2, lo que sugiere un carcinoma colorrectal avanzado.

5 Todos los resultados indicados anteriormente, en particular, la importancia del valor de corte de 4 ng/ml se han confirmado en dos cohortes independientes. Una cohorte comprendía 16 pacientes con cáncer colorrectal del Departamento de Cirugía del Hospital Universitario de Zurich y la otra cohorte contenía 20 pacientes con cáncer colorrectal de los EE.UU. Para evaluar cómo se regula la expresión de ITGB6, se trataron CEI HT29 con factor de necrosis tumoral (TNF, 48 h), un mediador conocido de la TEM, y/o factor de crecimiento epidérmico (EGF; 24 h). El tratamiento con TNF dio como resultado niveles aumentados de mRNA de ITGB6 ( $p < 0,01$ ), receptor del EGF (EGFR;  $p < 0,05$ ), factor de transcripción Ets-1, el regulador sugerido de ITGB6 ( $p < 0,01$ ), así como vimentina elevada ( $p < 0,01$ ) pero E-cadherina disminuida ( $p < 0,001$ ), lo que indica TEM. La estimulación con EGF dio como resultado niveles disminuidos de ARNm de ITGB6 ( $p < 0,05$ ) y E-cadherina ( $p < 0,05$ ), pero niveles aumentados de ARNm de EGFR ( $p < 0,05$ ) y de vimentina ( $p < 0,001$ ). El tratamiento con EGF de las células pretratadas con TNF alteró el aumento inducido por TNF en el nivel de ARNm de ITGB6 ( $p < 0,01$ ) y Ets-1 ( $p < 0,05$ ), pero potenció el nivel de ARNm de EGFR ( $p < 0,001$ ).

20 Conclusiones: En resumen, la ITGB6 se expresa fuertemente en el frente de invasión de tumores primarios y metástasis de CCR lo que señala un papel crucial de la ITGB6 en la progresión del CCR. Los niveles séricos elevados de ITGB6 se relacionan con una supervivencia mala y un estadio TNM avanzado, lo que indica una enfermedad avanzada y demuestra la utilidad de la ITGB6 como un nuevo marcador tumoral sérico del CCR en la práctica clínica.

#### Materiales y métodos

##### 25 Muestras de suero

30 Se obtuvieron muestras de suero de pacientes de control sanos (KO,  $n = 10$ ), pacientes con EII inflamatoria activa (B1,  $n = 20$ ), pacientes con enfermedad de Crohn fistulizante (B3;  $n = 20$ ) y carcinoma colorrectal (CoCa,  $n = 80$ ) que presentan cualquier estado T, cualquier estado N y cualquier estado M. Las muestras de suero se recogieron de pacientes masculinos y femeninos. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito antes de la recogida de muestras y los estudios fueron aprobados por el comité de ética local.

##### Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

35 Se congelaron muestras de suero inmediatamente después del muestreo y se almacenaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso posterior. Se obtuvo un Kit ELISA de detección de integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  humana (USCNK Life Sciences Inc., ELISA para integrina  $\beta\text{6}$ , E92099Hu) de Chemie Brunschwig AG, Basilea, Suiza. Se realizaron los ensayos de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando un volumen de muestra de  $50\text{ }\mu\text{l}$ . Se detectó la absorbancia a  $450\text{ nm}$  en un lector de microplacas de fluorescencia SpectraMax M2 usando el Software SoftMax Pro v5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

##### Análisis estadístico

45 Los datos se presentan como las medias  $\pm$  E.T.M. para una serie de  $n$  experimentos. El análisis de datos se realizó usando el software de estadística SPSS.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico del carcinoma colorrectal en un paciente, que comprende detectar, en una muestra de sangre obtenida de dicho paciente, una proteína indicadora seleccionada entre el grupo compuesto por la subunidad de integrina alfa(v), la subunidad de integrina beta(6) y un heterodímero que comprende las subunidades de integrina alfa(v) y beta(6).
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende detectar dicha proteína indicadora mediante la detección de la presencia de un ligando unido a dicha proteína indicadora, en donde dicho ligando es específicamente reactivo a dicha proteína indicadora.
3. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, que comprende determinar una cantidad de dicha proteína indicadora.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende adicionalmente la comparación de dicha cantidad con un patrón.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas de:
- poner en contacto, en una primera etapa de contacto, dicha muestra de sangre con un primer ligando específicamente reactivo a dicha proteína indicadora;
  - determinar, en una etapa de cuantificación, dicha cantidad de dicha proteína indicadora unida a dicho primer ligando.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho primer ligando se fija a una superficie.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el que dicha etapa de cuantificación comprende las etapas de poner en contacto, en una segunda etapa de contacto, dicha proteína indicadora con un segundo ligando específicamente reactivo a dicha proteína indicadora y determinar una cantidad de dicho segundo ligando unido a dicha proteína indicadora.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 2 a 7, en el que dicho ligando, en particular dicho primer ligando y/o dicho segundo ligando, se fija o puede fijarse específicamente a una actividad enzimática o un marcador detectable.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de suero.
10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una cantidad de dicha proteína indicadora por encima de 4 ng/ml se asigna a una alta probabilidad de que dicho paciente desarrolle o haya desarrollado un carcinoma colorrectal metastásico, un tumor indiferenciado o un carcinoma colorrectal avanzado.
11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de una cantidad de dicha proteína indicadora por encima de 4 ng/ml indica que dicho paciente desarrollará o ha desarrollado un carcinoma colorrectal metastásico, un tumor indiferenciado o un carcinoma colorrectal avanzado.
12. El uso de un dispositivo que comprende una superficie, comprendiendo dicha superficie un ligando específicamente reactivo a una proteína indicadora seleccionada entre el grupo compuesto por la subunidad de integrina alfa(v), la subunidad de integrina beta(6) y un heterodímero que comprende las subunidades de integrina alfa(v) y beta(6) fijadas a dicha superficie, para el diagnóstico del carcinoma colorrectal.
13. Un método para determinar la progresión del carcinoma colorrectal, que comprende un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicha progresión se determina mediante la detección o la cuantificación de dicha proteína indicadora.
14. Un método para determinar la eficacia de una terapia para un carcinoma colorrectal, que comprende un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la remisión o la progresión de dicho carcinoma colorrectal se determina mediante la detección o la cuantificación de dicha proteína indicadora.
15. Un método para la estadificación de un carcinoma colorrectal, que comprende un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho carcinoma colorrectal se estadifica mediante la detección o la cuantificación de dicha proteína indicadora.

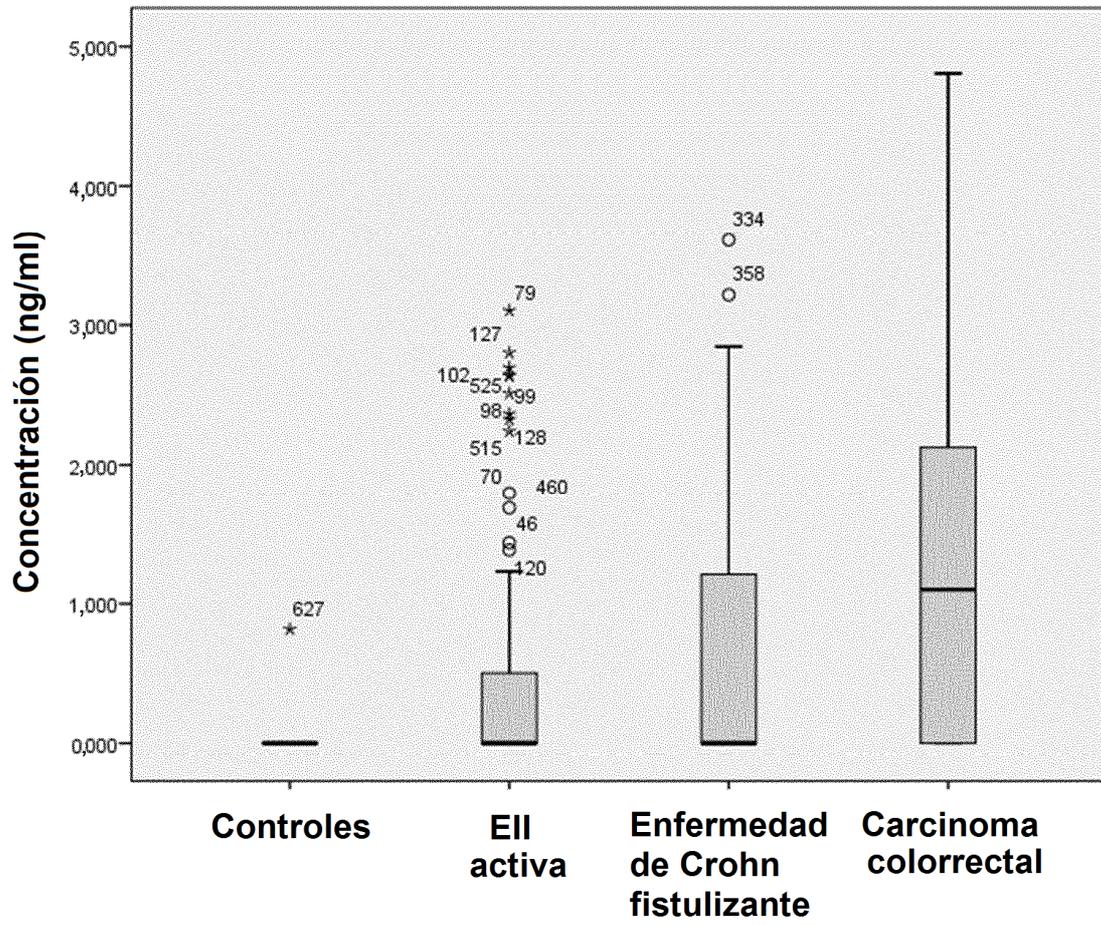


Figura 1

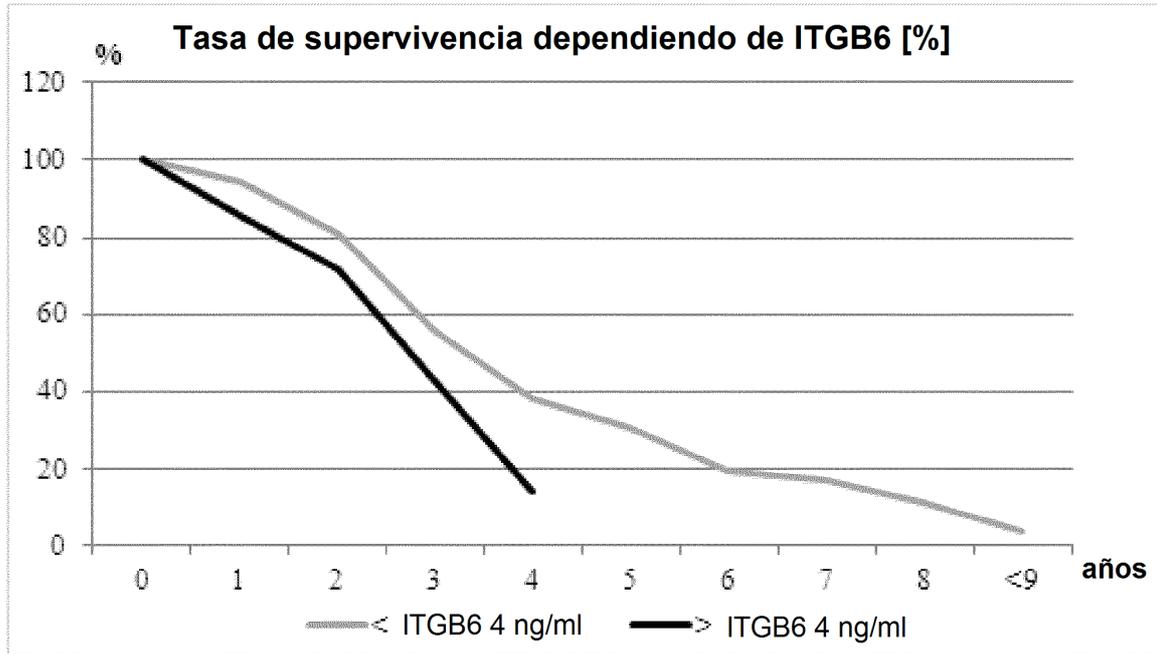


Figura 2

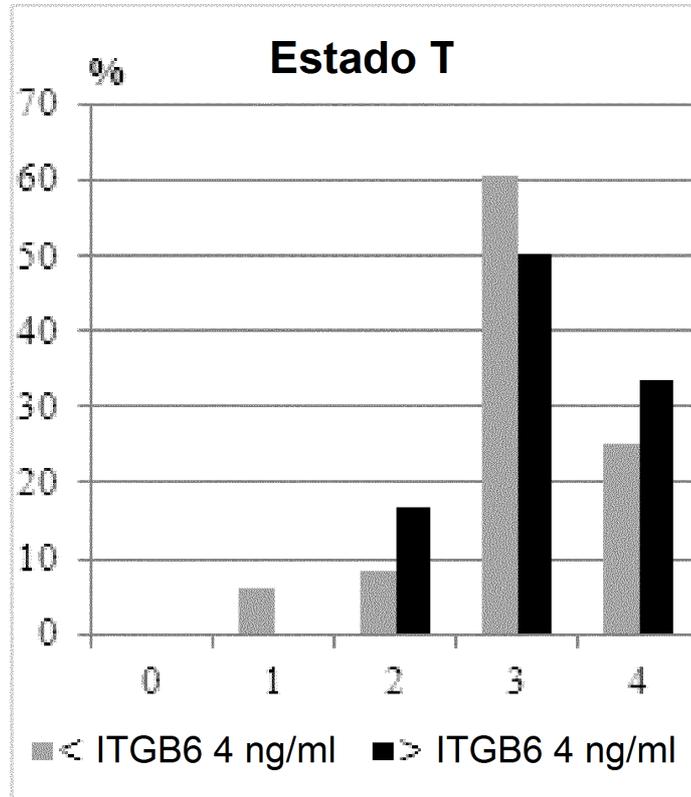


Figura 3

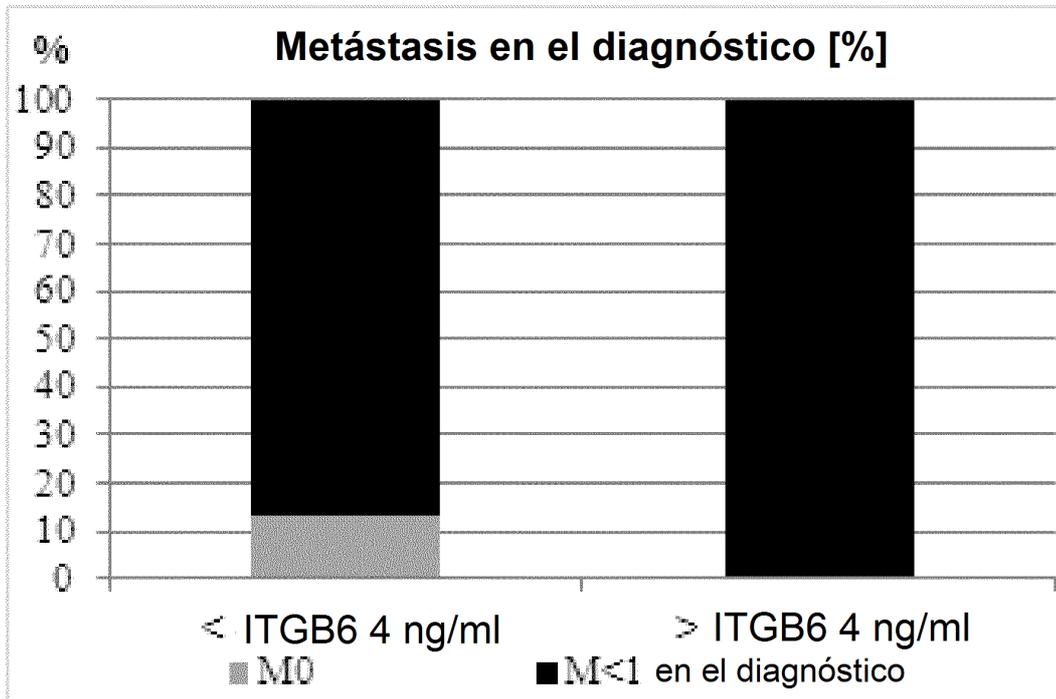
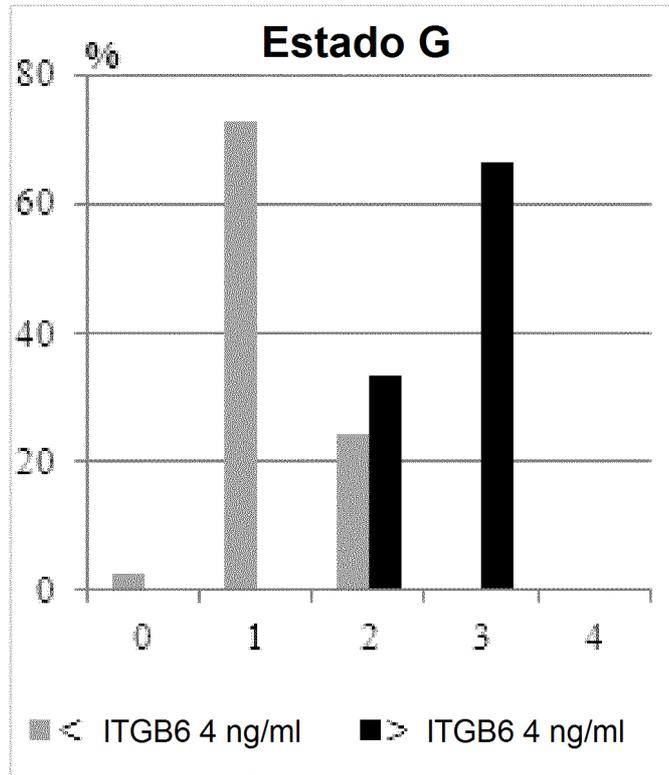


Figura 4



**Figura 5**