

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 522**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.12.2013** **E 13197367 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017** **EP 2883962**

54 Título: **Altos niveles de FT de TEM para el diagnóstico del cáncer, en particular de cáncer colorrectal (CCR) y de páncreas (CP)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2018

73 Titular/es:

HUMANITAS MIRASOLE S.P.A. (100.0%)
Via Manzoni, 56
20089 Rozzano (Milano) , IT

72 Inventor/es:

LAGHI, LUIGI y
CELESTI, GIUSEPPE

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 651 522 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

Altos niveles de FT de TEM para el diagnóstico del cáncer, en particular de cáncer colorrectal (CCR) y de páncreas (CP)

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de los marcadores moleculares para el diagnóstico de enfermedades, preferiblemente para el diagnóstico del cáncer. La presente invención está dirigida a detectar y medir los niveles de ARNm de genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal en muestras biológicas, es decir, en muestras de sangre periférica de pacientes con tumores, para determinar la presencia de la enfermedad, su progresión y riesgo de recurrencia.

Antecedentes

10 Las células tumorales circulantes (CTC) son una población heterogénea de células cancerosas que circulan en la sangre periférica que se han desprendido de un tumor primario o su metástasis. Actualmente, el número aproximado y el fenotipo correspondiente de CTC en la sangre completa de pacientes cancerosos tienen relevancia clínica con respecto al diagnóstico de los pacientes. El conjunto de CTC incluye células con características de tipo epitelial, mesenquimal y troncal. Se ha demostrado que la intravasación del cáncer en los seres humanos (Min Yu *et al.*, *Science*, 2013, 339, 580) y los animales está unida a la transición epitelial-mesenquimal (TEM), un proceso impulsado por factores de transcripción (FT; similares, pero que no se limitan a *TWIST1*, *ZEB2*, *SLUG*, *SNAIL*, etc.) y susceptible de reversión (transición mesenquimal-epitelial, TME) en nichos metastásicos. Por lo tanto, se espera que la detección de células TEM en la sangre humana proporcione pistas para efectuar diagnósticos y pronósticos.

20 Celesti *et al.* (*Gastroenterology* 2013, 145, 647) demostraron que los niveles de ARNm de *TWIST1* tenían mayor significación estadística (valor de la mediana) en muestras de sangre de pacientes con cáncer colorrectal (CCR) que en las de los controles. Desafortunadamente, la distribución de niveles de *TWIST1* en pacientes y controles se superpone parcialmente, haciendo que la medición de ARNm de *TWIST1* solamente no sea confiable ni adecuada para el diagnóstico.

25 M. J. Larriba *et al.* (*Carcinogenesis*, vol. 30, Nro. 8, 2009) se refiere a la sobreexpresión de *SLUG* en cáncer colorrectal, pero nada dice acerca de los niveles de expresión en sangre de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*.

Kenoki Ohuchida *et al.* (*International Journal of Cancer*, vol. 120, Nro. 8, 2007) se refiere a la sobreexpresión de ARNm de *TWIST1* en cáncer de páncreas, pero nada dice acerca de los niveles de expresión en sangre de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*.

30 Hung Pham *et al.* (*Pancreas*, vol. 39, Nro. 3, 2010) se refiere a la sobreexpresión de ARNm de *SLUG* en cáncer de páncreas, pero nada dice acerca de los niveles de expresión en sangre de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*.

Y. Imamichi *et al.*, (*Oncogene*, vol. 26, Nro. 16, 2006) se refiere a la sobreexpresión de ARNm de *ZEB2* en cáncer de páncreas, pero nada dice acerca de los niveles de expresión en sangre de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*.

35 El documento WO2012/103025 se refiere a un método para evaluar la progresión del cáncer en un paciente que sufre de cáncer, que comprende determinar el nivel de expresión de ARN de un gen específico de cáncer en una muestra enriquecida en células tumorales circulantes (CTC), donde el marcador de TEM se selecciona del grupo que consiste en: N-cadherina, vimentina, B-catenina (localización nuclear), Snail-1, Snail-2 (Slug), Twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2 y E47.

Descripción de la invención

40 Los métodos convencionales, aprobados por la FDA (por sus siglas en inglés: *Food and Drug Administration* - Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU.) (es decir, "Cell Search" (Veridex), "Adna Test Breast Cancer Select" y "Adna Test Breast Cancer Detect" (AdnaGen AG), "Biocept Onco CEE" (Biocept Laboratories), detectan antígenos epiteliales expresados, entre otros, por las CTC. Por tanto, el valor de diagnóstico y pronóstico de estos ensayos es limitado.

45 Los autores muestran un ensayo de RCP-TR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real) cuantitativa específico para genes de transición epitelial-mesenquimal (TEM) presentes en las células circulantes de pacientes con tumores. A diferencia de lo descrito en la técnica anterior, no es necesaria la separación previa de poblaciones de células circulantes antes de la extracción del ARNm. Esta estrategia permite detectar niveles aumentados de transcritos circulantes de FT de TEM, prescindiendo de cualquier característica celular antigénica o fenotípica.

50 Los autores hallaron que en las células sanguíneas de pacientes CCR están presentes altos niveles de ARNm de *TWIST1* y *SLUG*, mientras que en células sanguíneas de pacientes con cáncer de páncreas (CP) están presentes altos niveles de ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*, lo que permite un diagnóstico más robusto y confiable.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es un método para determinar si un sujeto está afectado por un cáncer que comprende el paso de someter a ensayo una muestra biológica de dicho sujeto para detectar la

presencia de un panel de ARNm que codifican los factores de transcripción implicados en la transición epitelial mesenquimal, en donde:

a) dicho panel comprende al menos los ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*,

5 b) el aumento de los niveles de ARNm, tanto de genes *TWIST1* como *SLUG*, pero no del gen *ZEB2* con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer colorrectal,

c) el aumento de los niveles de ARNm de todos los genes *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer de páncreas, donde dicha muestra biológica es una muestra de células sanguíneas.

10 En una realización preferida de la invención al sujeto no se le administra un tratamiento antitumoral (p. ej., terapia neoadyuvante).

De modo conveniente, la muestra de células sanguíneas es una muestra enriquecida de células tumorales circulantes (CTC), más preferiblemente una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés).

Los autores seleccionaron grados de admisión apropiados como sigue:

15 - ARNm de *TWIST1*: 9,30E-09 si el sujeto está afectado por un cáncer colorrectal, o 2,57E-8 si el sujeto está afectado por un cáncer de páncreas;

- ARNm de *SLUG*: 1,83E-10 si el sujeto está afectado por un cáncer colorrectal, o 5,70E-9 si el sujeto está afectado por un cáncer de páncreas;

20 - *ZEB2* : 4,08E-05 si el sujeto está afectado por un cáncer colorrectal, como indicación luego del tratamiento contra el cáncer de remisión parcial o total de cáncer colorrectal, y/o una variación en la etapa de cáncer colorrectal y/o respuesta al tratamiento, o 26,84E-6 si el sujeto está afectado por cáncer de páncreas.

25 En una realización preferida, los niveles de ARNm se obtienen mediante RCP-TR. Cualquier otro método para detectar ARNm específico en una muestra biológica conocido por el experto en la técnica se encuentra dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos ilustrativos son: Métodos de amplificación de RCP (sistema de RCP Droplet Digital™ QX200™, sondas TaqMan), otros métodos de amplificación; hasta el análisis de expresión génica unicelular (miRGE-nCounter®).

El método de la invención es capaz de detectar transcritos de TEM en muestras de sangre de seres humanos o animales; en un aspecto particular el método comprende los siguientes pasos:

a) separar por gradiente de densidad Ficoll las células mononucleares de sangre periférica (PBMC),

30 b) detectar los niveles de expresión de genes TEM usando RCP-TR,

c) comparar el nivel de los genes TEM del paciente con niveles normales de control,

d) diagnosticar que el paciente tiene un tumor específico si los niveles detectados de los genes TEM difieren con significación estadística (son superiores o inferiores a un valor de grado de admisión predeterminado según el gen seleccionado) del nivel de control.

35 Un objeto adicional de la invención es el uso de un kit de RCP-TR cuantitativa para llevar a cabo el método descrito anteriormente, que incluye:

- elementos de retrotranscripción para obtener ADNc específicos;

- sondas específicas de amplificación para amplificar ADNc específicos;

- elementos de detección para detectar y medir el nivel de ADNc específicos amplificados.

40 En una realización preferida del uso del kit para RCP-TR cuantitativa de la invención, las sondas de amplificación son capaces de amplificar:

- la región nt. 781-835 de *TWIST1*, nro. de entrada: NM_000474.3, (SEQ ID No. 1);

- la región nt. 711-819 de *SLUG*, nro. de entrada: NM_003068.3, (SEQ ID No. 2);

- la región nt. 1262-1352 de *ZEB2*, nro. de entrada: NM_014795.3, (SEQ ID No. 3);

45 - la región nt. 174-244 de *SNAIL*, nro. de entrada: NM_005985.3, (SEQ ID No. 4).

En una realización preferida adicional del uso del kit para RCP-TR cuantitativa de la invención, las sondas de amplificación esencialmente tienen las secuencias:

TWIST1 directo AGCAAGATTCAGACCCTCAAGCT (SEQ ID No. 8);

TWIST1 inverso CCTGGTAGAGGAAGTCGATGTACCT (SEQ ID No. 9);

5 *SLUG* directo TGTTTGCAAGATCTGCGGC (SEQ ID No. 10);

SLUG inverso TGCAGTCAGGGCAAGAAAAA (SEQ ID No. 11);

ZEB2 directo GCTACACGTTTGCCTACCGC (SEQ ID No. 12);

ZEB2 inverso CGATTACCTGCTCCTTGGGTT (SEQ ID No. 13).

Descripción detallada de la invención

10 Se describirá la invención con referencia a ejemplos no limitativos.

Leyendas de las Figuras

Figura 1. Niveles de ARNm de *TWIST1* (A), *SLUG* (B), *ZEB2* (C) y *SNAIL* (D) en sangre de 26 pacientes CCR comparados con 5 pacientes misceláneos y con 16 controles sanos.

15 Figura 2. Curva ROC (característica operativa del receptor, por sus siglas en inglés) para niveles de ARNm de *TWIST1* (A), *SLUG* (B) en 26 pacientes CCR en comparación con 16 controles sanos.

Figura 3. Curva ROC para niveles de ARNm de *ZEB2* en 26 pacientes CCR en comparación con 5 pacientes misceláneos.

Figura 4. Niveles de ARNm de *TWIST1* (A), *SLUG* (B), *ZEB2* (C) y *SNAIL* (D) en sangre de 10 pacientes CP comparados con 16 controles sanos.

20 Figura 5. Curva ROC para niveles de ARNm de *TWIST1* (A), *SLUG* (B) y *ZEB2* (C) en 10 pacientes CP en comparación con 16 controles sanos.

Figura 6. Comparación de niveles en sangre de ARNm de *ZEB2* en CCR y CP (A). Curva ROC para niveles de ARNm de *ZEB2* (B) en 26 pacientes con cáncer colorrectal en comparación con 10 pacientes con CP.

Materiales y métodos

25 Cuantificación de transcritos génicos en muestras sanguíneas no seleccionadas

Se recogió sangre periférica (6mL) en vacutainer revestido con anticoagulantes (EDTA, citrato de sodio, heparina) y se almacenó a 4°C. La sangre periférica se procesó dentro de las 4 horas de recogida y se separó por gradientes de densidad con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Life Science) según las instrucciones del fabricante. En síntesis, se agregaron 15 ml de Ficoll-Paque a un tubo centrífugo y se extendió PBS diluido (6 ml+29 ml de solución salina equilibrada) cuidadosamente en capas sobre la placa de Ficoll. Se centrifugó la solución sin mezclar (400 g durante 40 minutos a 20°C). Se eliminó la capa superior utilizando una pipeta Pasteur limpia dejando intacta la capa de linfocitos en la interfase. A continuación, con el uso de una nueva pipeta Pasteur se transfirió la capa de PBMC que contenía las células tumorales circulantes a un tubo centrífugo limpio y se lavó con al menos 3 volúmenes (18 ml) de solución salina equilibrada. Una vez resuspendidas, las células se centrifugaron (300 g durante 20 minutos a 20°C), y luego se eliminó el sobrenadante. Después de agregar 50 mL de solución salina equilibrada, los sedimentos celulares finalmente se centrifugaron (200 g durante 20 minutos a 20°C). El sobrenadante fue nuevamente eliminado y las células se lisaron con tampón de lisis Qiagen más β-Mercaptoetanol (1:100). Luego se aisló el ARN total usando el mini kit Qiagen Rneasy según las instrucciones del fabricante. A continuación, el ARN total resuspendido en 60 µL de agua tratada con dietilpirocarbonato (agua DEPC) se trató con ADNasa (Ambion, Life Science) para minimizar la contaminación por ADN genómico.

30

35

40

Todos los pasos de preparación y manipulación de ARN tuvieron lugar en una campana de flujo laminar, en condiciones libres de ARN. Las concentraciones de ARN se determinaron por lectura de absorbancia a 260 nm usando nanogotas.

45 Dos µg de ARN tratado se sometieron a transcripción inversa a ADNc usando el kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystem, Life Science).

El ADNc sintetizado se sometió a RCP-TR para detectar y cuantificar los niveles de ARNm del factor de transcripción de TEM.

TWIST1: Nro. de entrada del NCBI (por sus siglas en inglés: *National Center for Biotechnology Information* – Centro

Nacional para la Información Biotecnológica de los EE.UU.) NM_000474.3 (SEQ ID No.1),

SLUG o *SNAI2*: Nro. de entrada del NCBI NM_003068.3 (SEQ ID No.2),

ZEB2 o *SIP1*: Nro. de entrada del NCBI NM_014795.3 (SEQ ID No.3),

SNAIL: Nro. de entrada del NCBI NM_005985.3 (SEQ ID No.4).

- 5 En síntesis, se colocó 1 µl de ADNc (40ng) en 20 µL de volumen de reacción que contenía 12 µl de Fast SyberGreen Master Mix, 3 µl de cebadores constitutivos y diana directos e inversos mezclados en 5 µM y 4 µl de agua DEPC.

Las secuencias de los cebadores específicos fueron:

18s directo CGC CGC TAG AGG TGA AAT TCT (SEQ ID No. 6),

18s inverso CTT TCG CTC TGG TCC GTC TT (SEQ ID No. 7);

- 10 para amplificar la región nt. 1049-1100 de 18s, nro. de entrada: M10098.1, NCBI, (SEQ ID No. 5), como control;

TWIST1 directo AGC AAG ATT CAG ACC CTC AAG CT (SEQ ID No. 8);

TWIST1 inverso CCT GGT AGA GGA AGT CGA TGT ACC T (SEQ ID No. 9);

para amplificar la región nt. 781-835 de *TWIST1*, nro. de entrada: NM_000474.3, (SEQ ID No. 1);

SLUG directo TGT TTG CAA GAT CTG CGG C (SEQ ID No. 10);

- 15 *SLUG* inverso TGC AGT CAG GGC AAG AAA AA (SEQ ID No. 11);

para amplificar la región nt. 711-819 de *SLUG*, nro. de entrada: NM_003068.3, (SEQ ID No. 2);

ZEB2 directo GCT ACA CGT TTG CCT ACC GC (SEQ ID No. 12);

ZEB2 inverso CGA TTA CCT GCT CCT TGG GTT (SEQ ID No. 13);

para amplificar la región nt. 1262-1352 de *ZEB2*, nro. de entrada: NM_014795.3, (SEQ ID No. 3);

- 20 *SNAIL* directo CTT CCA GCA GCC CTA CGA C, (SEQ ID No. 14);

SNAIL inverso CGG TGG GGT TGA GGA TCT (SEQ ID No. 15);

para amplificar la región nt. 174-244 de *SNAIL*, nro. de entrada: NM_005985.3, (SEQ ID No. 4).

- 25 La amplificación se realizó en un sistema de RCP en tiempo real ABI 7900 HT (Applied Biosystem) y se utilizó el programa: 95°C durante 10 minutos; 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Todas las muestras se analizaron por triplicado. La cuantificación de los genes diana y los genes de referencia interna 18s se realizó usando la emisión de fluorescencia de SyberGreen. La apropiada contaminación de ADN se evaluó mediante la realización de PCR sobre la porción no inversamente transcrita de cada muestra. Se detectó la fluorescencia de todas las muestras luego de 0-40 ciclos para los genes de control y marcadores en una sola reacción, lo que permite la deducción de los ciclos en el valor umbral (CT, por sus siglas en inglés) para cada producto. Se consideró al valor
- 30 CT como el ciclo de RCP en el que se detecta un aumento significativo en la fluorescencia debido a la acumulación exponencial de productos de RCP bicatenarios. La expresión de los genes diana se normalizó sobre la expresión del gen constitutivo, 18s para obtener la cuantificación absoluta ($2^{-\Delta CT}$), mientras que la cuantificación relativa se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ para comparar los niveles de transcritos de los controles frente a los pacientes (Livak KJ, *Methods*, 2001; 25(4):402-8).

- 35 **Análisis estadístico**

- Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para evaluar las diferencias con significación estadística en los niveles de expresión de los ARNm circulantes de los FT de TEM entre pacientes con cáncer y controles. Para los FT de TEM con niveles significativamente altos en pacientes CCR y CP, se estimó la sensibilidad y especificidad usando los puntos óptimos del grado de admisión determinados mediante el análisis de las curvas ROC. Se consideró que un
- 40 valor $p < 0,05$ tenía significación estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa informático StatDirect (StatsDirect Ltd, Altrincham CHESHIRE, R.U.).

Pacientes y métodos

- 45 El estudio piloto incluyó 31 pacientes con neoplasia colorrectal. De estos, 26 pacientes tenían cáncer colorrectal, 4 pacientes tenían cáncer rectal y se sometieron a radioquimioterapia neoadyuvante antes de la cirugía (lo que resultó en la remisión patológica completa, etapa ypT0N0, según el sistema de etapas del AJCC (por sus siglas en inglés:

American Joint Committee on Cancer - Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer), más un paciente con un adenoma avanzado (que mostraba alto grado de displasia). Otros 10 pacientes tenían cáncer de páncreas, y se usaron 16 sujetos sanos como controles. Todas las muestras se procesaron como se describió anteriormente luego de obtener el consentimiento informado de los pacientes.

5 Resultados

1. En las células sanguíneas de pacientes CCR se encuentran presentes altos niveles de ARNm de *TWIST1* y *SLUG*

En 16 controles sanos se detectó ARNm de *TWIST1*, *ZEB2* y *SNAIL* (16/16, 100%), mientras que se detectó ARNm de *SLUG* en 3 de 16 casos (18,75%). En las muestras de sangre de 31 pacientes con neoplasia colorrectal, los autores detectaron *TWIST1*, *ZEB2* y *SNAIL* en todos los casos (31/31, 100%), y *SLUG* en 30 de 31 casos (96,15%). Como se muestra en la Figura 1, los pacientes CCR tuvieron niveles más altos de *TWIST1* (Fig. 1A, cuantificación absoluta, mediana, controles 9,8E-9 frente a CCR 3,22E-8; $p < 0,01$) y *SLUG* (Fig. 1B, controles 9,09E-13 frente a CCR, 1,76E-08; $p < 0,001$), pero no de *ZEB2* (Fig. 1C, controles 1,35E-06 frente a CRC 7,45E-06; $p = 0,26$) y de *SNAIL* (Fig. 1D, controles 7,61E-08 frente a CCR 5,74E-08; $p = 0,20$). Por consiguiente, los niveles de ARNm de *TWIST1* y *SLUG* en células sanguíneas de pacientes con cáncer fueron en promedio 3 y 4.000 veces más elevados, respectivamente, que en los controles (cuantificación relativa).

El estudio también incluyó un conjunto de muestras de sangre (Misceláneo) de 4 pacientes con cáncer de recto que se sometieron a radioquimioterapia neoadyuvante antes de la cirugía, lo que resultó en la remisión histológica completa de la enfermedad (ypT0N0), y de un paciente con un adenoma avanzado (que mostraba alto grado de displasia). En el conjunto Misceláneo los autores detectaron una expresión significativamente más alta de ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* que en controles sanos. Sin embargo, en este conjunto los niveles de *ZEB2* también fueron significativamente más altos que en pacientes con cáncer (5,13E-05 frente a 7,45E-06 de pacientes CCR, $p = 0,01$, Figura 1C), lo que probablemente proporciona un método para discriminar entre pacientes que están experimentando remisión y aquellos que son proclives a la progresión luego de la radioquimioterapia neoadyuvante.

Valores umbral de *TWIST1* y *SLUG* en células sanguíneas que identifican pacientes CCR.

Luego, los autores determinaron el punto óptimo del grado de admisión para altos niveles de transcritos discriminando pacientes CCR mediante el análisis de la curva ROC (Fig. 2). Mediante esta estrategia, los niveles altos de *TWIST1* (por encima del valor de admisión, 9,30E-09) tuvieron 100% de sensibilidad y 50% de especificidad (Fig. 2A), y los de *SLUG* (por encima del grado de admisión, 1,83E-10) tuvieron 96% de sensibilidad y 81% de especificidad en la discriminación de pacientes con cáncer entre los controles sanos (Fig. 2B). Asimismo, en el conjunto Misceláneo, los niveles de ARNm de *ZEB2* superiores al valor óptimo del valor de admisión de 4,08E-05 permitieron discriminar antes de la cirugía entre pacientes con CCR y aquellos con cáncer rectal que tuvieron respuesta histológica completa después de la terapia neoadyuvante (96% de sensibilidad y 100% de especificidad; Figura 3 y Tabla 2).

Altos niveles combinados de ARNm de *TWIST1* y *SLUG* mejoran la especificidad en la identificación de pacientes con cáncer.

Al discriminar pacientes CCR de individuos sanos mediante la combinación de altos valores de *TWIST1* y *SLUG* (según se determinó por las curvas ROC), no se afectó la sensibilidad (96%), ya que todos los pacientes menos uno tuvieron altos niveles de ambos transcritos, mientras que la especificidad se aumentó hasta 93,3%, ya que solamente en un control estaban presentes altos niveles de ambos transcritos (Tabla1).

Tabla 1. Sensibilidad y especificidad para cáncer colorrectal de niveles circulantes de ARNm de *TWIST1* y *SLUG* por encima de los valores óptimos del grado de admisión determinados por el análisis de la curva ROC.

	FT de TEM		
	<i>TWIST1</i>	<i>SLUG</i>	Combinados*
Pacientes CCR			
TP	26	25	25
FN	0	1	1
<i>Sensibilidad</i>	100%	96%	96%
Controles			
TN	8	13	15

FP	8	3	1
<i>Especificidad</i>	50%	81%	93,3%

*Pacientes que presentan niveles simultáneos por encima de los valores óptimos del grado de admisión de *TWIST1* y *SLUG*. TP = Verdadero positivo FN = Falso negativo

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de niveles circulantes* de ARNm de *ZEB2* para discriminar pacientes con cáncer colorrectal de aquellos con cáncer de recto que experimentaron remisión patológica completa luego de quimioterapia y radioterapia neoadyuvantes.

5

	<u>FT de TEM</u>
	<u>ZEB2</u>
Pacientes CCR	
TP	25
FP	1
<i>Sensibilidad</i>	96%
Cáncer de recto, remisión completa*	
TN	4
FN	0
<i>Especificidad</i>	100%

*Pacientes con cáncer de recto tratados con terapia neoadyuvante y respuesta histológica completa. TP = Verdadero positivo FN = Falso negativo

2. En las células sanguíneas de pacientes con cáncer de páncreas (CP) se encuentran altos niveles de ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*.

10 Los niveles de ARNm de FT de TEM difieren entre pacientes CP e individuos sanos.

Como se muestra en la Figura 4, en comparación con controles sanos, 10 pacientes CP tuvieron niveles más altos de *TWIST1* (Fig. 4A, cuantificación absoluta, mediana, controles 9,8E-9 frente a CP 4,10E-8; p<0,001) y de *SLUG* (Fig. 4B, controles 9,09E-13 frente a CP, 17,00E-08; p<0,0001), como así también de *ZEB2* (Fig. 4C, controles 1,35E-06 frente a CP 36,96E-06; p<0,001), pero no así de *SNAIL* (Fig. 4D, controles 7,61 E-08 frente a CP 12,00E-08; p=0,12). Por consiguiente, los niveles circulantes de ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* en sangre de pacientes CP fueron en promedio 4, 4.000 y 22 veces más elevados, respectivamente, que en los controles (cuantificación relativa).

15

Valores umbral de FT de TEM en sangre que identifica pacientes CP.

Mediante el análisis de la curva ROC, los niveles altos de *TWIST1* (por encima del grado de admisión, 2,57E-8) tuvieron 90% de sensibilidad y 75% de especificidad (Fig. 5A), y los de *SLUG* (por encima del grado de admisión, 5,70E-9) tuvieron 100% de sensibilidad y 87,5% de especificidad en la discriminación de pacientes con cáncer entre controles sanos (Fig. 5B y Tabla 3). Además, altos niveles de *ZEB2* (por encima del valor del grado de admisión, 26,84E-6) discriminaron entre pacientes con CP y controles con 80% de sensibilidad y 93% de especificidad (Fig. 5C y Tabla 3).

20

Los niveles de ARNm de *ZEB2* son más elevados en las células sanguíneas de pacientes CP que en las de pacientes CCR. Además, al comparar los niveles en sangre de FT de TEM entre pacientes CP y CCR, hallamos que los niveles de *ZEB2* eran significativamente superiores (p<0,001) en CP que en pacientes CCR. Mediante cuantificación relativa, la diferencia en el nivel de transcritos fue de 8 veces (Fig. 6A). Solo los pacientes con cáncer de recto en remisión después de terapia neoadyuvante (grupo Misceláneo) tuvieron niveles de ARNm de *ZEB2* similares a los de pacientes con CP.

25

30

Altos niveles concomitantes de ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* aumentan la especificidad en la identificación de pacientes CP, y en la discriminación de pacientes CP de pacientes CCR. Al discriminar pacientes CP de individuos sanos mediante la combinación de altos valores de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* (según se determinó mediante las curvas ROC), la sensibilidad fue 80%, ya que todos los pacientes menos dos tuvieron altos niveles de los tres transcritos, mientras que la especificidad aumentó hasta 100%, ya que los altos niveles concomitantes de estos tres

35

transcritos nunca fueron detectados en controles (Tabla 3). Asimismo, la especificidad de la marca distintiva del alto nivel de *TWIST1-SLUG-ZEB2* en la discriminación de pacientes con CP de aquellos con CCR fue 88%, ya que solo 3 pacientes CCR tuvieron niveles de *ZEB2* por encima del valor del grado de admisión para CP (Figura 6B).

5 Tabla 3. Sensibilidad y especificidad para cáncer de páncreas de niveles circulantes de ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* por encima de los valores de los grados de admisión óptimos determinadas según el análisis de curvas ROC.

FT de TEM				
	<u><i>TWIST1</i></u>	<u><i>SLUG</i></u>	<u><i>ZEB2</i></u>	<u><i>Concomitante*</i></u>
Pacientes CP				
TP	9	10	8	8
FN	1	-	2	2
<i>Sensibilidad</i>	90%	100%	80%	80%
Controles				
TN	12	14	15	16
FP	4	2	1	-
<i>Especificidad</i>	75%	87,5%	93,7%	100%

*Pacientes que presentan niveles simultáneos por encima de los valores de los grados de admisión óptimos de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*. TP = Verdadero positivo FN = Falso negativo

Lista de secuencias

- 10 <110> Humanitas Mirasole S.p.A.
- <120> Altos niveles de FT de TEM para el diagnóstico del cáncer, en particular de cáncer colorrectal (CCR) y de páncreas (CP)
- 15 <130> BE 121564
- <160> 15
- 20 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 1669
- <212> ADN
- 25 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 651 522 T3

gaggtataag agcctccaag tctgcagctc tcgcccact cccagacacc tcgcgggctc 60
 tgcagcaccg gcaccgtttc caggaggcct ggcgggggtgt gcgtccagcc gttgggcgct 120
 ttctttttgg acctcggggc catccacacc gtcccctccc cctcccgcct ccctccccgc 180
 ctcccccgcg cgcctcccc ggggaggtcc ctcccgctcg tctcctgct ctctcctccg 240
 cgggccgcat cggccgggccc gggcccgccg gcgggggaag ctggcgggct gaggcgcccc 300
 gctcttctcc tctgccccgg gcccgcgagg ccacgcgctg ccgctcgaga gatgatgag 360
 gacgtgtcca gctcgccagt ctcgccggcc gacgacagcc tgagcaacag cgaggaagag 420
 ccagaccggc agcagccgcc gagcggcaag cgcgggggac gcaagcggcg cagcagcagg 480
 cgcagcggcg gcggcggcgc ggggccggcc ggagcccgcg gtgggggctg cggagcggcc 540
 gacgagccgg gcagcccggc ccagggcaag cgcggcaaga agtctgcggg ctgtggcggc 600
 ggcggcggcg cggcggcgcg gggcggcagc agcagcggcg gcgggagctc gcagtcttac 660
 gaggagctgc agacgcagcg ggtcatggcc aacgtgcggg agcggccagcg caccagtcg 720
 ctgaacgagg cgttcgccc gctgcggaag atcatcccca cgctgccctc ggacaagctg 780
 agcaagattc agaccctcaa gctggcggcc aggtacatcg acttcctcta ccaggtcctc 840
 cagagcgacg agctggactc caagatggca agctgcagct atgtggctca cgagcggctc 900
 agctacgcct tctcggctct gaggatggag ggggcctggt ccatgtccgc gtcccactag 960
 caggcggagc cccccacccc ctccagcagg ccggagacct agatgtcatt gttccagag 1020
 aaggagaaaa tggacagtct agagactctg gagctggata actaaaaata aaaatatatg 1080
 ccaaagattt tcttggaat tagaagagca aaatccaaat tcaaagaaac agggcgtggg 1140
 gcgcactttt aaaagagaaa gcgagacagg cccgtggaca gtgattccca gacgggcagc 1200
 ggcaccatcc tcacacctct gcattctgat agaagtctga acagttggtt gtgtttttt 1260
 tttttttttt tttgacgaag aatgttttta tttttatttt tttcatgcat gcattctcaa 1320
 gaggtcgtgc caatcagcca ctgaaaggaa aggcactcact atggactttc tctattttaa 1380
 aatgtaaca atcagaggaa ctataagaac accttagaa ataaaaatac tgggatcaaa 1440
 ctggcctgca aaaccatagt cagttaattc tttttttcat ccttcctctg aggggaaaaa 1500
 caaaaaaaaa cttaaaatac aaaaaacaac attctattta tttattgagg acctatggt 1560
 aatgcaaat agatccggtg tctaaatgca ttcataattt tatgattggt ttgtaaatat 1620
 cttgtatat tttctgcaa taataaata taaaaattt agagaaaaa 1669

5 <210> 2
 <211> 2101
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 651 522 T3

agttcgtaaa ggagccgggt gacttcagag gcgccggccc gtccgtctgc cgcacctgag 60
 cacggcccct gcccgagcct ggcccggcgc gatgctgtag ggaccgccgt gtcctccgc 120
 cggaccgtta tccgcgccgg gcgcccggca gaccgctgg caagatgccg cgctccttc 180
 tggtaagaa gcatttcaac gcctccaaa agccaaacta cagcgaactg gacacacata 240
 cagtgattat ttcccogtat ctctatgaga gttactccat gcctgtcata ccacaaccag 300
 agatcctcag ctccaggagca tacagcccca tcaactgtgtg gactaccgct gtcctattcc 360
 acgccagct acccaatggc ctctctctc tttccggata ctctcatct ttggggcgag 420
 tgagtcccc tctccatct gacacctct ccaaggacca cagtggctca gaaagcccca 480
 ttagtgatga agaggaaaga ctacagtcca agctttcaga ccccatgcc attgaagctg 540
 aaaagttca gtgcaattta tgcaataaga cctattcaac tttttctggg ctggccaaac 600
 ataagcagct gcactgcgat gccagctca gaaaatcttt cagctgtaa tactgtgaca 660
 aggaatatgt gagcctgggc gccctgaaga tgcatattcg gaccacaca ttacctgtg 720
 tttgcaagat ctgcggcaag gcgttttcca gacctgggt gcttcaagga cacattagaa 780
 ctcacacggg ggagaagcct ttttcttgcc ctcaactgaa cagagcattt gcagacaggt 840
 caaatctgag ggctcatctg cagaccatt ctgatgtaa gaaataccag tgcaaaaact 900
 gctccaaac cttctccaga atgtctctcc tgcacaaaca tgaggaatct ggctgctgtg 960
 tagcacactg agtgacgcaa tcaatgttta ctgaaacaga atgcatttct tcaactccgaa 1020
 gccaaatgac aaataaagtc caaaggcatt ttctcctgtg ctgaccaacc aaataatatg 1080
 tatagacaca cacacatatg cacacacaca cacacacacc cacagagaga gagctgcaag 1140
 agcatggaat tcactgtgtt aaagataatc ctttccatgt gaagtttaa attactatat 1200
 atttgctgat ggctagattg agagaataaa agacagtaac ctttctctc aaagataaaa 1260
 tgaaaagcac attgcatctt ttcttctaa aaaaatgcaa agatttacet tgctgccaaa 1320
 tcatttcaac tgaagaagac agtattgctt tgtaatatag tctgtaatat gatttccat 1380
 aggaagagat ctgccagacg cgaactcagg tgccctaaaa agtattccaa gtttactcca 1440
 ttacatgtcg gttgtctggt tgccattggt gaactaaagc ctttttttga ttacctgtag 1500
 tgctttaaag tatattttta aaagggagga aaaaaataac aagaacaaa cacaggagaa 1560
 tgtattaaaa gtatttttgt tttgtttgt ttttgccaat taacagtatg tgccttgggg 1620
 gaggagggaa agattagctt tgaacattcc tggcgcagtc tccattgtct tactatttta 1680
 aacatttta ataatttttg aaaattaatt aaagatggga ataagtcaa aagaggattc 1740
 ttacaaattc attaatgtac ttaaactatt tcaaatgcat accacaaatg caataatata 1800
 atacccttc caagtgcctt tttaaattgt atagttgatg agtcaatgta aatttgtgtt 1860
 tatttttata tgattgaatg agttctgtat gaaactgaga tgttgtctat agctatgtct 1920
 ataaacaacc tgaagacttg tgaatcaat gtttctttt taaaaaaca ttttcaagtt 1980
 ttttttcaa taaacagttt tgatttaaaa tctcgtttgt atactatttt cagagacttt 2040
 acttgcttca tgattagtac caaacactg tacaagaat tgtttgttaa caagaaaaa 2100
 a 2101

ES 2 651 522 T3

<210> 3
 <211> 9243
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

atctcatttc	ttccactaaa	gcgtttgccg	agacttcaag	gtataatcta	tcccagatcc	60
tttcccagag	agaaacttgg	cgatcacggt	ttcacatgat	gctcacgctc	agggcgcttc	120
aattatccct	ccccacaaag	ataggtggcg	cgtgtttcag	ggtctctcgt	ctctctccta	180
cagaaaagaa	aaagaaaaaa	atgtcattag	aagaggcgta	acacgtcagt	ccgtccccag	240
gtttgtgttt	cctggagtgg	ccgaaagaga	tcagttctaa	cctgctctgc	aggaataacg	300
gtcctgcctc	ccgacactct	tggcgaggtt	tttgtacagt	ttgctccggg	agctgtttct	360
tcgcttccac	ctttttctcc	cccacacttc	gcggttctt	catgcttttt	cttctcacca	420
tttctggcca	aaactacaaa	caagacttcg	cagatcgagc	ctgctgctg	ccgaagcagg	480
gcgccgagtc	catgcgaact	gccatctgat	ccgctcttat	caatgaagca	gccgatcatg	540
gcggatggcc	cccggtgcaa	gagggcгаа	caagccaatc	ccaggaggaa	aaacgtggtg	600
aactatgaca	atgtagtgga	cacaggttct	gaaacagatg	aggaagacaa	gcttcatatt	660
gctgaggatg	acggtattgc	caaccctctg	gaccaggaga	cgagtccagc	tagtgtgcc	720
aaccatgagt	cctccccaca	cgtagccaa	gctctgttgc	caagagagga	agaggaagat	780
gaaataaggg	aggggtggagt	ggaacacccc	tggcacaaca	acgagattct	acaagcctct	840

ES 2 651 522 T3

gtagatggtc cagaagaaat gaaggaagac tatgacacta tggggccaga agccacgatc 900
 cagaccgcaa ttaacaatgg tacagtgaag aatgcaaatt gcacatcaga ttttgaggaa 960
 tactttgcca aaagaaaact ggaggaacgc gatggtcatg cagtcagcat cgaggagtac 1020
 cttcagcgca gtgacacagc cattatttac ccagaagccc ctgaggagct gtctcgcctt 1080
 ggcacgcccag aggccaatgg gcaagaagaa aatgacctgc cacctggaac tccagatgct 1140
 tttgcccaac tgctgacctg cccctactgc gaccggggct acaagcgctt gacatcactg 1200
 aaggagcaca tcaagtaccg ccacgagaag aatgaagaga acttttctctg ccctctctgt 1260
 agctacacgt ttgcttaccg caccagctc gagcggcata tggtgacaca caagccaggg 1320
 acagatcagc accaaaatgct aaccaagga gcaggtaatc gcaagttcaa atgcacagag 1380
 tgtgcaagg ccttcaaata taaacaccat ctgaaagaac acctgcgaat tcacagtgg 1440
 gaaaaacctt acgagtgcc aaactgcaag aaacgtttct cccattctgg ttctacagt 1500
 tcgcacatca gcagcaagaa atgtattgggt ttaatctctg taaatggccg aatgagaac 1560
 aatatcaaga cgggttcttc ccctaattct gtttcttctt ctctactaa ttcagccatt 1620
 acccagttaa gaaacaagtt ggagaatgga aaaccactta gtatgtctga acagacaggc 1680
 ttacttaaaa ttaaaacaga accactagac ttcaatgact ataaagtctt tatggctaca 1740
 cacgggttta gtggcactag tccctttatg aatgggtggc ttggagccac cagccctta 1800
 ggagttcatc catctgctca gagtccaatg cagcacttag gtgtaggat ggaagcccct 1860
 ttacttgggt ttcccaccat gaatagtaat ttaagtgagg tacaaaagggt tctacagatt 1920
 gtggacaata ctgtttccag gcaaaaaatg gactgcaagg ctgaagaaat ttcaaagttg 1980
 aaagttatc acatgaagga tccatgctct caacctgagg aacaaggagt tacttctcct 2040
 aatattccgc ctgtcggctc tccggtagtg agtcataatg gtgccactaa aagtattatt 2100
 gactatacgt tggaaaaagt caatgaagcc aaagcttgc tccagagctt gactactgac 2160
 tcaaggagac agatcagtaa tataaagaaa gagaagctac gtactttaat agatttggtc 2220
 actgatgaca aaatgattga gaaccacaac atatccactc cattttcatg ccagttctgt 2280
 aaagaaagtt ttctggccc catcccttg catcagcatg aacgttacct ttgtaagatg 2340
 aatgaagaga tcaaggcgggt cctgcagcct catgaaaaa tagtcccaa caaagccgga 2400
 gttttgttg ataataaagc cctctcttg tcatctgtac tttctgagaa aggaatgaca 2460
 agccccatca acccatacaa ggaccacatg tctgtactca aagcatacta tgctatgaac 2520
 atggagccca actccgatga actgctgaaa atttccattg ctgtgggcct tcctcaggaa 2580
 tttgtgaagg aatggtttga acaacgaaaa gtctaccagt actcaaattc caggtccca 2640
 tcctggaaa gaagctccaa gccgttagct cccaacagta accctcccac aaaagactct 2700
 ttattacca ggtctcctgt aaaacctatg gactccataa catcaccatc tatagcagaa 2760

ES 2 651 522 T3

ctccacaaca	gtgttacgaa	ttgtgatcct	cctctcaggc	taacaaaacc	ttcccatttt	2820
accaatatta	aaccagttga	aaaattggac	cactccagga	gtaatactcc	ttctccctta	2880
aatctttcct	ccacatcttc	taaaaactcc	cacagtagtt	catacactcc	aaacagcttc	2940
tcttctgagg	agctccaggc	tgagccttta	gacttgtcat	taccaaaca	aatgaaagaa	3000
cccaaaagta	ttatagccac	aaagaacaaa	acaaaagcta	gtagcatcag	tttagatcat	3060
aacagtgttt	cttcctcctc	tgaaaactca	gatgagcctc	tgaacttgac	ttttatcaag	3120
aaggaatfff	caaattcaaa	taatctggac	aacaaaagca	ctaaccaggt	gttcagcatg	3180
aaccatttta	gtgccaaaacc	tttatacaca	gctcttcacc	ctcaaagcgc	atttccccct	3240
gctactttca	tgccaccagt	ccagaccagt	attcctgggc	tacgaccata	cccaggactg	3300
gatcagatga	gcttcctacc	acatatggcc	tacacctacc	caactggagc	agctactttt	3360
gctgatatgc	agcaaaggag	aaagtaccag	cggaaacaag	gatttcaggg	agaattgctt	3420
gatggagcac	aagactacat	gtcaggccta	gatgatatga	cagactccga	ctcctgtctg	3480
tctcgcacaa	agatcaagaa	gacagagagt	ggcatgtatg	catgtgactt	atgtgacaag	3540
acattccaga	aaagcagttc	ccttctgcga	cataaatcag	aacacacagc	aaaaagacca	3600
catcagtgtc	agattttgtaa	gaaagcgttt	aaacacaagc	accaccttat	cgagcactca	3660
aggcttcact	cgggcgagaa	gccctatcag	tgtgataaat	gtggcaagcg	cttctcacac	3720
tgggctcgt	actcgcagca	catgaatcac	aggtattcct	actgcaagcg	ggaggcggag	3780
gagcgggaag	cggcggagcg	cgaggcgcgc	gagaaagggc	acttggaaacc	caccgagctg	3840
ctgatgaacc	gggcttactt	gcagagcatt	accctcagc	ggtactctga	ctcggaggag	3900
agggagagta	tgccgagggga	tggcgagagc	gagaaggagc	acgagaaaga	aggcgaggat	3960
ggctacggga	agctgggcag	acaggatggc	gacgaggagt	tcgaggagga	agaggaagaa	4020
agtgaaaata	aaagtatgga	tacggatccc	gaaacgatac	gagatgaaga	agagactgga	4080
gatcactcca	tggacgatag	ttcggaggat	gggaaaatgg	aaaccaaatac	agaccacgag	4140
gaagacaata	tggaagatgg	catgtaataa	actactgcat	ttaagcttc	ctatfttttt	4200
ttccagtagt	attgttacct	gcttgaaaac	actgctgtgt	taagctgttc	atgcacgtgc	4260
ctgacgcttc	caggaagctg	tagagagggga	cagaaggggc	ggttcagcca	agacagatgt	4320
agacggagtt	ggagctgggt	attgttaaaa	actgcattat	gcaaaaattt	tgtacagtgt	4380
taaggcctaa	aaactgtgtg	gttcagagac	taattcctgt	gtttaatagc	atttatactt	4440
taagcacaac	tagaaaattg	taagaattgc	actctactta	tgtatcacta	caaactttaa	4500
aaaactatgt	ctaatttata	ttaatacatt	ttaaaaaggt	gcccgacta	ccatacatca	4560
gtatftttat	tattattatt	gttattcctt	ttaatttaa	tgtgctcgca	ctacaatgca	4620

ES 2 651 522 T3

tcagtattat gattcctctg tactttcctt tcgctattca tcaatttccc attttttttt 4680
 tcagcttaag taaccacaca attttaggcc tcaatttttt tttttttctg tgaaggaact 4740
 tgaagtgatg catgtgtgaa ttttaagatac cgaagtctta aagtgacctg gacgtgaagg 4800
 aaaaagtaag atgagaaata aagaaagcct ttgtaagggt gttttaaag cettatatgc 4860
 aaacctttta atctgtgttt ctgcaagtgc catccttgta cagtgttaag agggtaacat 4920
 gggttacctt tgcaccagct tcagtgttaa gctcacctg ttctttgaag caccatgctc 4980
 agtattagaa gaataggcag cagttcctta gtttacatat gtttgtgcaa ttattttctg 5040
 tacttttttg ttcattaatt ttgtcagtat tacaccaaac tgtttttgca acaaaaaaat 5100
 tttttttgca ttcatttaatt tttaggctca ataacatttt atttatgtgg ctcattttat 5160
 atttcctaatt tttatttatt tcatactgta gtgtacagta ttatagtctt tcaatatata 5220
 gatataatgt agtaaaaaag gaacatgacg ttgatcattt gggcaaattt tacgtaaaga 5280
 gaagagcatt tattgtgttt tggaacatta attgtgagat gggatttttc aattttatta 5340
 ttttattttt gtttttttcc aattactgga aattccaaat ttgggaactt ttgatacgat 5400
 cttgtgaaaa cactgtattt tcgactgaaa attccacttt ctcatcttg ttttttagct 5460
 aaaaagaggg actgttaaat acaatgtatg ataccatgac aaaaatcttt cctgaattgt 5520
 ctttgtaaaa gtattattga attttcaatt tgtaatttct tttgaaaatg accatgctcg 5580
 aataaaaatg tagccaaact aagaatgtag ttaatgagtt ctgtactttt agagagtttt 5640
 ccttcaatga ccattaacat gtaacatgct ttatgcttat aataatgcta attatgtttt 5700
 tttcatataa ttttagttta gcaataattt tgactggtac caataactgt tttttaaatt 5760
 tccataccta tgtacagcaa ttttacagct tttctcaact gatcctgatt ccagattgtg 5820
 tatttttatg tgaggttata ttattcaaat ttagtctatt tactttacag acatttctac 5880
 ttttgcatga cgagtattta gagattatgt gttaaaaatt cacttctctg tccaaggggt 5940
 ctttgtgatt tattcaaaaa aaagtctaat ttcaaaaaga cagctattat tcagtgttat 6000
 ttataaatg taaccttttt taaaggattg ggatagttaa tctcactttt tgaaatgcag 6060
 acagtagttt accgtttatc tgaaactaga aggcgtgggt gggagaggaa aagctaaaag 6120
 caaatgctaa caaaaataac cgtgattttc taagacagtt tttcagtttt tacaagatga 6180
 ccctaataat cagaatatga atgtattcgt aggttttaca taatgacttt tatcaagaaa 6240
 ctgattctg cttcttaaat ctaattgcc aagtgaagaat aacagaaaa acagattacc 6300
 ttatcaaatt tacagctctt gaatatacag aactataata tagtagctgt ccatgtattt 6360
 tttctacttt agaatcaaag aagaaaagca tcattttgct attaaatttg ctaaaatttt 6420
 gagtatgata tttccagttg gcaagaacaa catatttata tttattcctt agccataata 6480
 ccactttcct aaatttcaca aaagtcattc tttgcaactt gaaactcaat agaaagtgtg 6540

ES 2 651 522 T3

tatgtgtgtg	tgtgtatata	tatatatata	tacacacaca	cacatacaca	gaaaggatgt	6600
aatgaagata	cagtaatagt	tgagcagacc	tttttagaaa	aacatgtttt	tagctctatc	6660
ttcaaacttt	ctggcagagg	gggtgggggg	ggcaggggga	ggagtggcat	caaaatgcta	6720
tgcctcctgt	tatccacagc	ctagagtttt	tatatttggga	aagttagaa	aattctatcc	6780
tcgtttctcc	ttctttgaat	ggcacaaata	aatacactac	ataaattttt	ctggtttgaa	6840
aggctctagg	cgataacttt	attaattcaa	cctgaaaata	tcaagccatt	aaattttgtc	6900
cgggtagaat	aaatccctgt	ggcctctttt	aaagcaatgt	aggtctctgt	tgcccatggg	6960
gcatactctgt	gtcccaatcc	acaagagata	ggaccaacaa	acaatgaatg	tgcaacctaa	7020
ctctttctcc	ttggaaagaa	gaaagtgtgc	acgaagtaga	ggaggggtggg	cagaccctgc	7080
cttggccctc	ctgttaccct	cttctctgtc	atgtgttctc	aactccattt	cataggcagg	7140
ctcagaatac	ctgagtctga	aaatatcagg	ataacacttg	tgaattgtga	caatcactac	7200
aatgtcccat	atctgaggag	ttttttttaa	tgctatttat	ccgctggaca	cgattgcaca	7260
ttagggctgc	ataatcctct	aactctaggg	aaaaataaaa	acttttgatt	tgtcttaaga	7320
ttcttctcca	aggtcgcaaa	caagaaattc	ccctccacaa	ccaagagatg	tgcattttag	7380
taacatcaga	tgtgttcttc	tgttttatca	actacttact	cttcccacac	gcttagttct	7440
aaatctaacc	tttccccctc	cgaatagggg	gcaggggagg	atgaggaaac	actggaacaa	7500
ctgaacaccc	ctgcccattt	tctccaagag	ccttttgtat	tctagcatat	ctgtgcaatc	7560
ttttcttttt	tcttcacatg	acactgtaag	cttaggcctg	aaataactgg	gaagagagat	7620
gcgtatcaga	atcttctccg	aagagctaaa	caaaacatac	atcttcttta	gcatgaattg	7680
gactgggggc	ggagtgggag	ggcttggagg	aaaggggaaa	gaagggacta	tatttgaata	7740
aatatgaata	aatgtattag	atacttttca	caatcagata	acttttaaaa	aggtcatttt	7800
ttatctttct	aataatgtaa	gccttaataa	aagcaaatct	tagtcacaaa	tttgaggaga	7860
ctgccaata	ataagtttac	atgtatttga	actgaaaaat	tgtaaccat	gcttttgctc	7920
caagatgtgt	gaggccattc	aggggctgta	gggccctgga	tatacacaca	aacaagtgtg	7980
tgtatatctg	gagccccaca	cattgtaata	aacacagctg	catttatttg	actatgtgat	8040
cccatgtaca	tgtaaaaaaca	ttcaaacaaa	cacactcagc	ggatttattt	attgtgcaat	8100
ggggcaatta	ttcaaataaa	catgctcaat	gcaattattt	gaatctcaca	ttgcatgttc	8160
atcaatcata	gcactaaaaa	aagaggggga	aaaaacacca	aagaattcac	atggggaaaa	8220
aatatatata	tgaaaaccac	cttattatag	atthttatagg	gcagctgagg	ttatggctcc	8280
cttcttaact	gtaactcaac	tattctgtat	tcaatgacat	ttgtttctaa	tgattaattg	8340
gttcactcac	ttgatcatat	aatagcaaac	tttataaacc	tgtattgtgt	agagatgtga	8400

ES 2 651 522 T3

aatctctata tttcaagagc agaagagttc tttctagaca cottacatca agggacactg 8460
 gtccaattat tategcttat ataagcactc ctataaattc tgaaaaattt tatacatgca 8520
 acaaaacatt cctacatttg aagacattaa gaaaaatcac aggtgactca tctgatcatt 8580
 ctatatatta ataaatatta tgacatatat gtgaacacat cacaaatcat attggtgtac 8640
 caagaggcaa tttatgcctc tcttaagtat gtactgacat aacctaatat actaaaatgg 8700
 gaaggggctt ttagtcaactg aaatatgcat cgtgtaacaa agatgaagaa aatacatggc 8760
 ttgtgcccac cataaaaaaa gattcagact gaagccttag ctttggtttt ttcaattaaa 8820
 ttgttaaact gtgcacagtg attttttttt agaacttgag acatttgtga tgttgctgtg 8880
 ttaaactctt gttaccttgc ctgtgaattg aaattgtaca tatttagtaa atcatgcaga 8940
 caaaacaaac tttttagaca atatttttat tggagagttt tcttttcctg tatccatggt 9000
 aaaaaaaaaa aagacctcct ttoccaaaat aaaaatgtca atactaaatt taaagaagta 9060
 taaaggaatg attgcttcct ttagagcaaa atatttaaat aaacatggag ataattggca 9120
 acatgttctt tttgggctag taggctgtgt ccaatttttt gggctctgatg tttcagaggg 9180
 cctctgtttc agggttgaag atgatattat aatctcggaa ttaacaaat gctattaat 9240
 aac 9243

<210> 4
 <211> 1722
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

attcattgcg ccgcggcacg gcctagcgag tggttcttct gcgctactgc tgcggaatc 60
 ggcgacccca gtgcctcgac cactatgccg cgctctttcc togtcaggaa gccctccgac 120
 cccaatcgga agcctaacta cagcgagctg caggactcta atccagagtt taccttccag 180
 cagccctacg accaggccca cctgctggca gccatcccac ctccggagat cctcaacccc 240
 accgcctcgc tgccaatgct catctgggac tctgtcctgg cgcccaagc ccagccaatt 300
 gcctgggctt cccttcggct ccaggagagt cccagggtgg cagagctgac ctccctgtca 360
 gatgaggaca gtgggaaagg ctcccagccc cccagcccac cctcaccggc tccttcgtcc 420
 ttctctcta cttcagtctc ttocctggag gccgaggcct atgctgcctt ccagagcttg 480
 ggccaagtgc ccaagcagct ggcccagctc tctgaggcca aggatctcca ggctcgaag 540
 gccttcaact gcaaatactg caacaaggaa tacctcagcc tgggtgccct caagatgcac 600
 atccgaagcc acacgctgcc ctgctgtctc ggaacctgcg ggaaggcctt ctctaggccc 660
 tggtgctac aaggccatgt ccggaccac actggcgaga agcccttctc ctgtccccac 720
 tgcagccgtg ccttcgctga ccgctccaac ctgcggggcc acctccagac ccaactcagat 780

10

ES 2 651 522 T3

gtcaagaagt accagtgccca ggcgtgtgct cggaccttct cccgaatgtc cctgctccac 840
aagcaccaag agtccggctg ctcaggatgt ccccgtgac cctcgaggct ccctcttct 900
ctccatacct gcccctgcct gacagccttc cccagctcca gcaggaagga ccccacatcc 960
ttctcactgc catggaattc cctcctgagt gcccacttc tggccacatc agccccacag 1020
gactttgatg aagaccattt tctggttctg tgtcctctgc ctgggctctg gaagaggcct 1080
tcccattggc atttctgtgg agggagggca gctggcccc agccctgggg gattcctgag 1140
ctggcctgtc tgcgtgggtt tttgtatcca gagctgtttg gatacagctg ctttgagcta 1200
caggacaaag gctgacagac tcaactggaa gctcccacc cactcagggg accccactcc 1260
cctcacacac accccccac aaggaaccct caggccacc tccacgagggt gtgactaact 1320
atgcaataat ccacccccag gtgcagcccc agggcctgcg gaggcggtgg cagactagag 1380
tctgagatgc cccagaccca ggcagctatt tcagcctcct gtttgggtgg gtggcacctg 1440
tttcccgggc aatttaacaa tgtctgaaaa gggactgtga gtaatggctg tcacttgtcg 1500
ggggcccaag tgggtgctc tggctgacc gatgtgtctc ccagaactat tctgggggcc 1560
cgacaggtgg gctggggagg aagatgttta catttttaa ggtacactgg tatttatatt 1620
tcaaacattt tgtatcaagg aaacgttttg tatagttata tgtacagttt attgatattc 1680
aataaagcag ttaatttata tattaaaaa aaaaaaaaa aa 1722

<210> 5
<211> 1969
5 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> característica_misc
<222> (57)..(61)
<223> n e s a , c , g , o t

<400> 5

ccgtccgtcc gtcgtcctcc tcgcttgccg ggcgccgggc ccgtcctcga gccccnnnn 60
nccgtccggc cgcgtcgggg cctcgccgcg ctctacctac ctacctggtt gatcctgcca 120
gtagcatatg cttgtctcaa agattaagcc atgcatgtct aagtacgcac ggccggtaca 180
gtgaaactgc gaatggctca ttaaatacagt tatggttctt ttggctcgtc gtcctctcc 240
tacttgata actgtggtaa ttctagagct aatacatgcc gacgggcgct gacccccttc 300
gcggggggga tgcgtgcatt tatcagatca aaaccaacc ggtcagcccc tctccggccc 360
cggccggggg gcgggccgcg gcggctttgg tgactctaga taacctcggg ccgatcgcac 420
gccccccgtg gcggcgacga cccattcga cgtctgcct atcaactttc gatggtagtc 480
15 gccgtgccta ccatggtgac cacgggtgac ggggaatcag ggttcgattc cggagagggg 540

ES 2 651 522 T3

gcctgagaaa cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatta cccactcccg 600
 acccggggag gtagtgacga aaaataacaa tacaggactc tttcgaggcc ctgtaattgg 660
 aatgagtcca ctttaaatcc tttaacgagg atccattgga gggcaagtct ggtgccagca 720
 gccgcggtaa ttcagactcc aatagcgtat attaaagtgt ctgcagttaa aaagctcgt 780
 gttgatctt gggagcgggc gggcgggtccg ccgcgagggc agccaccgcc cgtccccgcc 840
 ccttgctctc cggcgcccc tggatgctct tagctgagtg tcccgcgggg cccgaagcgt 900
 ttactttgaa aaaattagag tgttcaaagc aggcccgagc cgcctggata ccgcagctag 960
 gaataatgga ataggaccgc ggttctatct tgttggtttt cggaaactgag gccatgatta 1020
 agaggacggc ccgggggcat tcgtattgct ccgctagagg tgaattctt ggaccggcgc 1080
 aagacggacc agagcgaaag catttgcaa gaatgtttc attaatcaag aacgaaagtc 1140
 ggaggttcga agacgatcag ataccgtcgt agttccgacc ataaacgatg ccgaccggcg 1200
 atgcggcggc gttattccca tgaccgcgcg ggcagcttcc gggaaaccaa agtctttggg 1260
 ttccgggggg agtatggtt caaagctgaa acttaaagga attgacggaa gggcaccacc 1320
 aggagtggag cctgcggctt aatttgactc aacacgggaa acctcaccgc gcccgacac 1380
 ggacaggatt gacagattga tagctcttcc tcgattccgt ggggtggtgt gcatggcgt 1440
 tcttagttgg tggagcgatt tgtctggtta attccgataa cgaacgagac tctggcatgc 1500
 taactagtta cgcgaccccc gagcggtcg cgtcccccaa cttcttagag ggacaagtgg 1560
 cgttcagcca ccgagattg agcaataaca ggtctgtgat gcccttagat gtccggggct 1620
 gcacgcgcgc tacactgact ggctcagcgt gtgcctacc tacgcggca ggcgcgggta 1680
 acccgttgaa cccattcgt gatggggatc ggggattgca attattcccc atgaacgagg 1740
 aattcccagt aagtgcgggt cataagcttg cgttgattaa gtccctgcc tttgtacaca 1800
 ccgccgtcg ctactaccga ttggatggt tagtgaggcc ctggatcgg ccccgccggg 1860
 gtcggccac gccctggcgg agcgtgaga agacggtcga acttgactat ctagaggaag 1920
 taaaagtcgt aacaaggttt ccgtaggtga acctgcggaa ggatcatta 1969

5 <210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 6

cgccgctaga ggtgaaattc t 21

15 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador sintético
 <400> 7

ctttcgctct ggtccgtctt 20

5 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 8

agcaagattc agaccctcaa gct 23

15 <210> 9
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 9

25 cctggtagag gaagtcgatg tacct 25

30 <210> 10
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

35 <400> 10

tgtttgaag atctgcggc 19

40 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> cebador sintético

<400> 11

50 tgcagtcagg gcaagaaaaa 20

55 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador sintético

<400> 12

60 gctacacgtt tgctaccgc 20

65 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 651 522 T3

<220>
<223> cebador sintético

5 <400> 13
cgattacctg ctccctgggt t 21

10 <210> 14
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> cebador sintético
<400> 14

20 ctccagcag ccctacgac 19
<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> cebador sintético
<400> 15

30 cggtggggtt gaggatct 18

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto está afectado por un cáncer que comprende el paso de someter a ensayo un muestra biológica de dicho sujeto para determinar la presencia de un panel de ARNm que codifican para factores de transcripción involucrados en la transición epitelial mesenquimal, en donde:
- 5 a) dicho panel comprende al menos los ARNm de *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2*,
- b) el aumento de los niveles de ARNm, tanto de genes *TWIST1* como *SLUG*, pero no del gen *ZEB2* con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer colorrectal,
- c) el aumento de los niveles de ARNm de todos los genes *TWIST1*, *SLUG* y *ZEB2* con respecto a las muestras de control es indicativo de un cáncer de páncreas,
- 10 donde dicha muestra biológica es una muestra de células sanguíneas.
2. El método para determinar si un sujeto está afectado por un cáncer según la reivindicación 1, en donde al sujeto no se le administra un tratamiento antitumoral.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 donde dicha muestra de células sanguíneas es una muestra enriquecida de células tumorales circulantes (CTC).
- 15 4. El método según la reivindicación 3, en donde dicha muestra enriquecida de células tumorales circulantes (CTC) es una muestra de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los grados de admisión pertinentes son los siguientes:
- 20 - ARNm de *TWIST1*: 9,30E-09 si el sujeto está afectado por un cáncer colorrectal, o 2,57E-8 si el sujeto está afectado por un cáncer de páncreas;
- ARNm de *SLUG*: 1,83E-10 si el sujeto está afectado por un cáncer colorrectal, o 5,70E-9 si el sujeto está afectado por un cáncer de páncreas;
- *ZEB2*: 4,08E-05 si el sujeto está afectado por un cáncer colorrectal, como indicación, luego del tratamiento contra el cáncer, de remisión parcial o total de cáncer colorrectal, y/o una variación de la etapa de cáncer colorrectal y/o respuesta al tratamiento, o 26,84E-6 si el sujeto está afectado por cáncer de páncreas.
- 25 6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los niveles de ARNm se obtienen mediante RCP-TR.
7. El uso de un kit de RCP-TR cuantitativa para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que incluye:
- 30 - elementos de retrotranscripción para obtener ADNc específicos;
- sondas específicas de amplificación para amplificar ADNc específicos;
- elementos de detección para detectar y medir el nivel de ADNc específicos amplificados.
8. El uso del kit de RCP-TR cuantitativa según la reivindicación 7, en donde dichas sondas de amplificación son capaces de amplificar:
- 35 - la región nt. 781-835 de *TWIST1*, nro. de entrada: NM_000474.3, (SEQ ID No. 1);
- la región nt. 711-819 de *SLUG*, nro. de entrada: NM_003068.3, (SEQ ID No. 2);
- la región nt. 1262-1352 de *ZEB2*, nro. de entrada: NM_014795.3, (SEQ ID No. 3);
- la región nt. 174-244 de *SNAIL*, nro. de entrada: NM_005985.3, (SEQ ID No. 4).
- 40 9. El uso del kit de RCP-TR cuantitativa según la reivindicación 7 u 8, en donde dichas sondas de amplificación tienen esencialmente las secuencias:
- TWIST1* directo AGCAAGATTCAGACCCTCAAGCT (SEQ ID No. 8);
- TWIST1* inverso CCTGGTAGAGGAAGTCGATGTACCT (SEQ ID No. 9);
- SLUG* directo TGTTTGCAAGATCTGCGGC (SEQ ID No. 10);
- SLUG* inverso TGCAATCAGGGCAAGAAAAA (SEQ ID No. 11);

ES 2 651 522 T3

ZEB2 directo GCTACACGTTTGCCTACCGC (SEQ ID No. 12);

ZEB2 inverso CGATTACCTGCTCCTTGGGTT (SEQ ID No. 13).

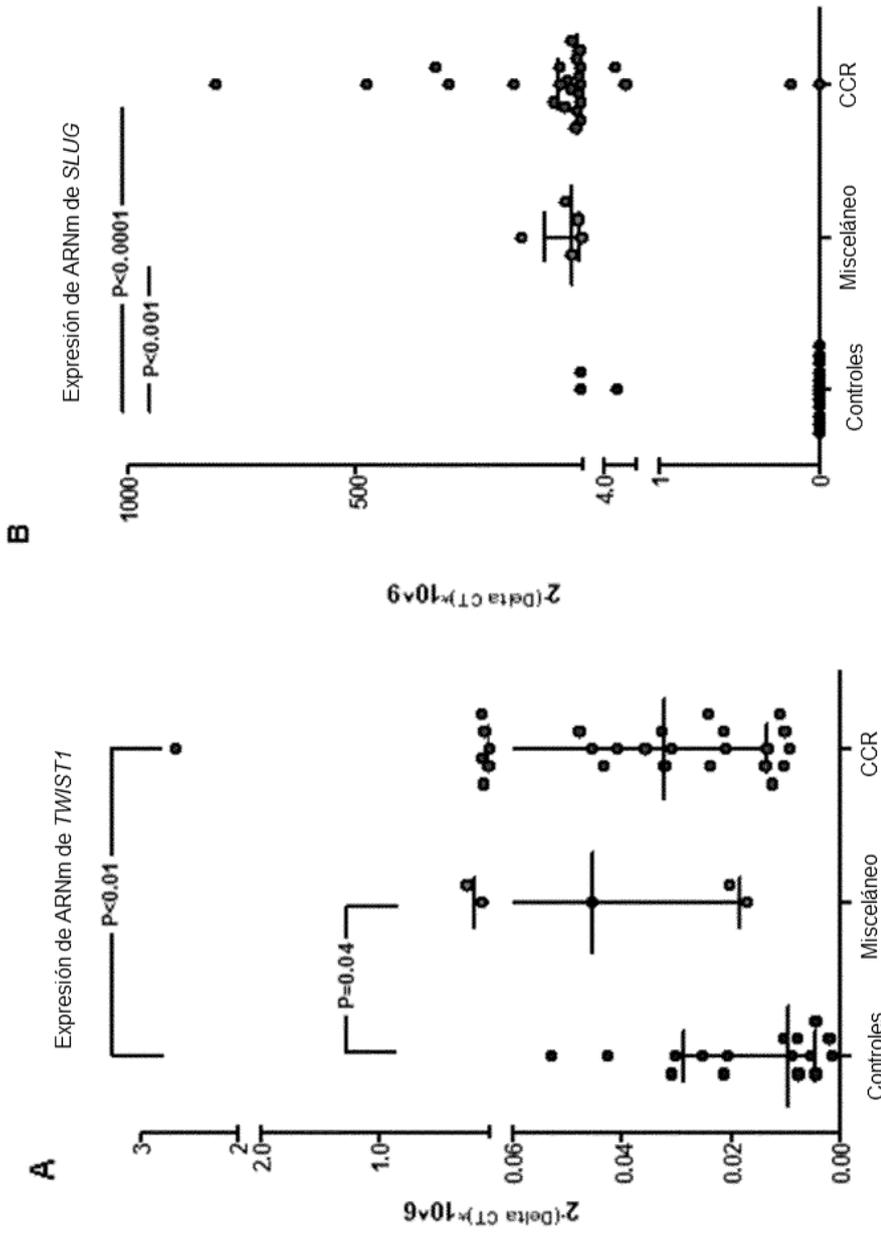


Fig. 1 (1/2)

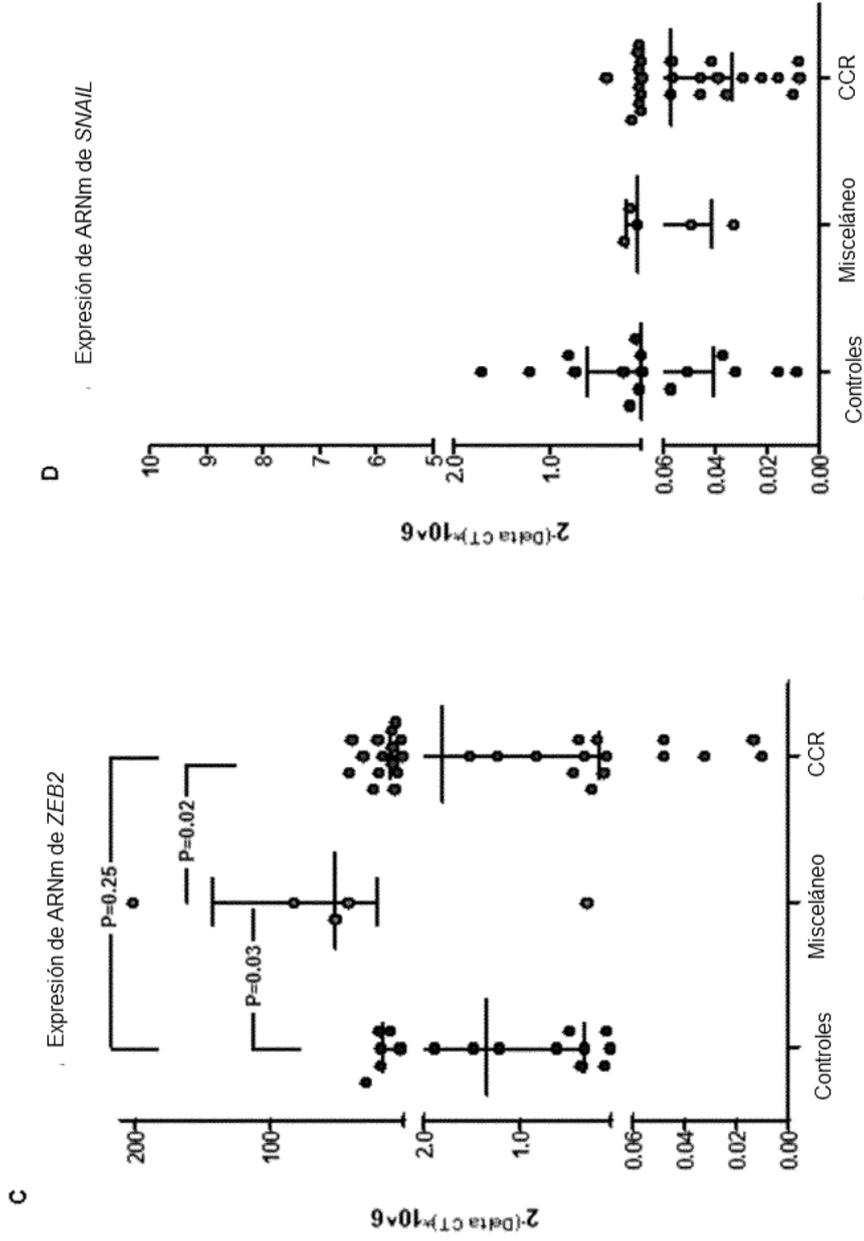


Fig. 1 (2/2)

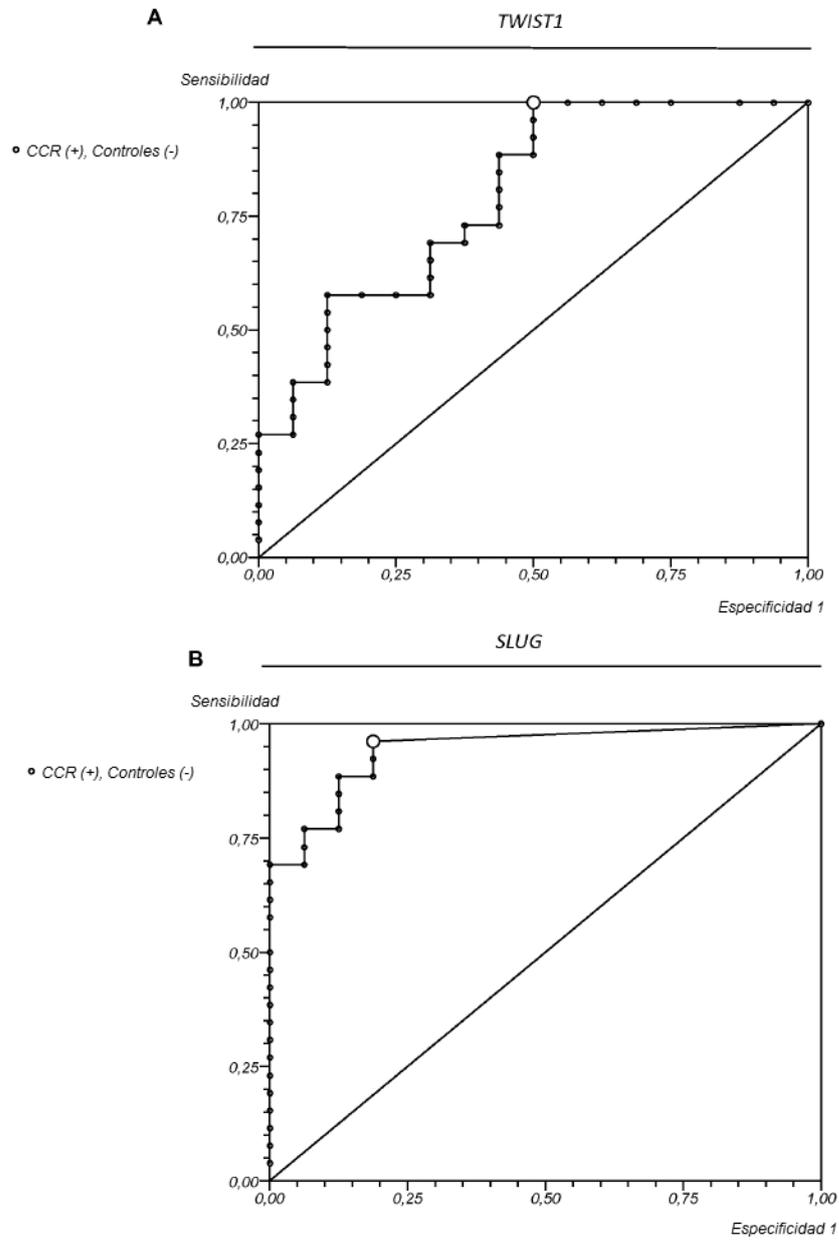


Fig. 2

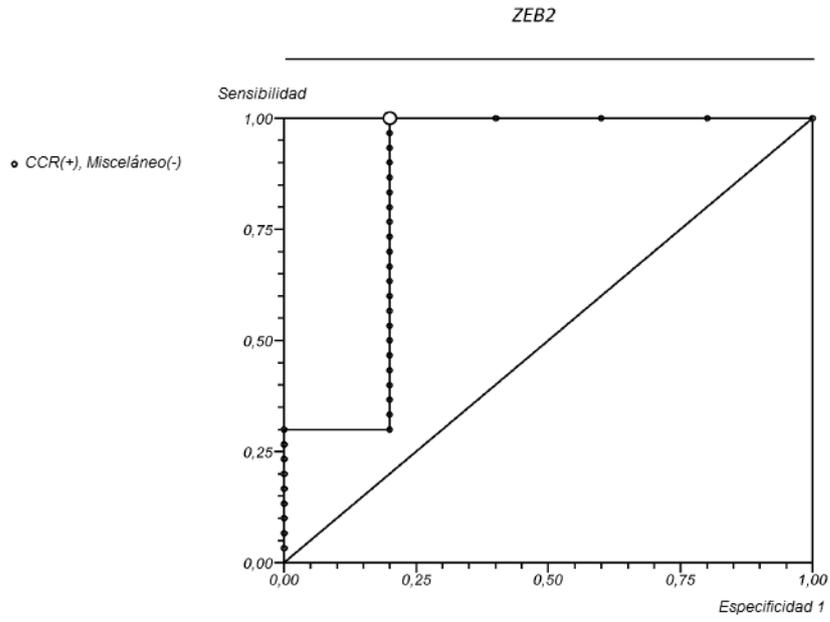


Fig. 3

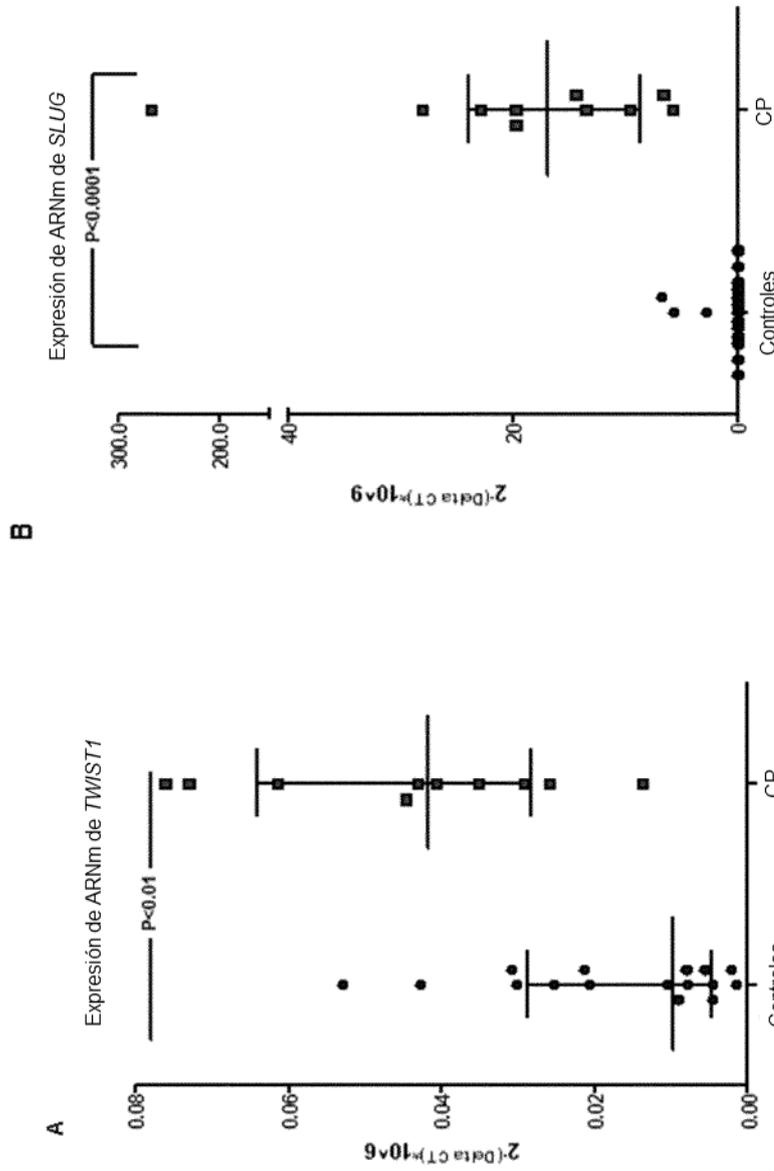


Fig. 4 (1/2)

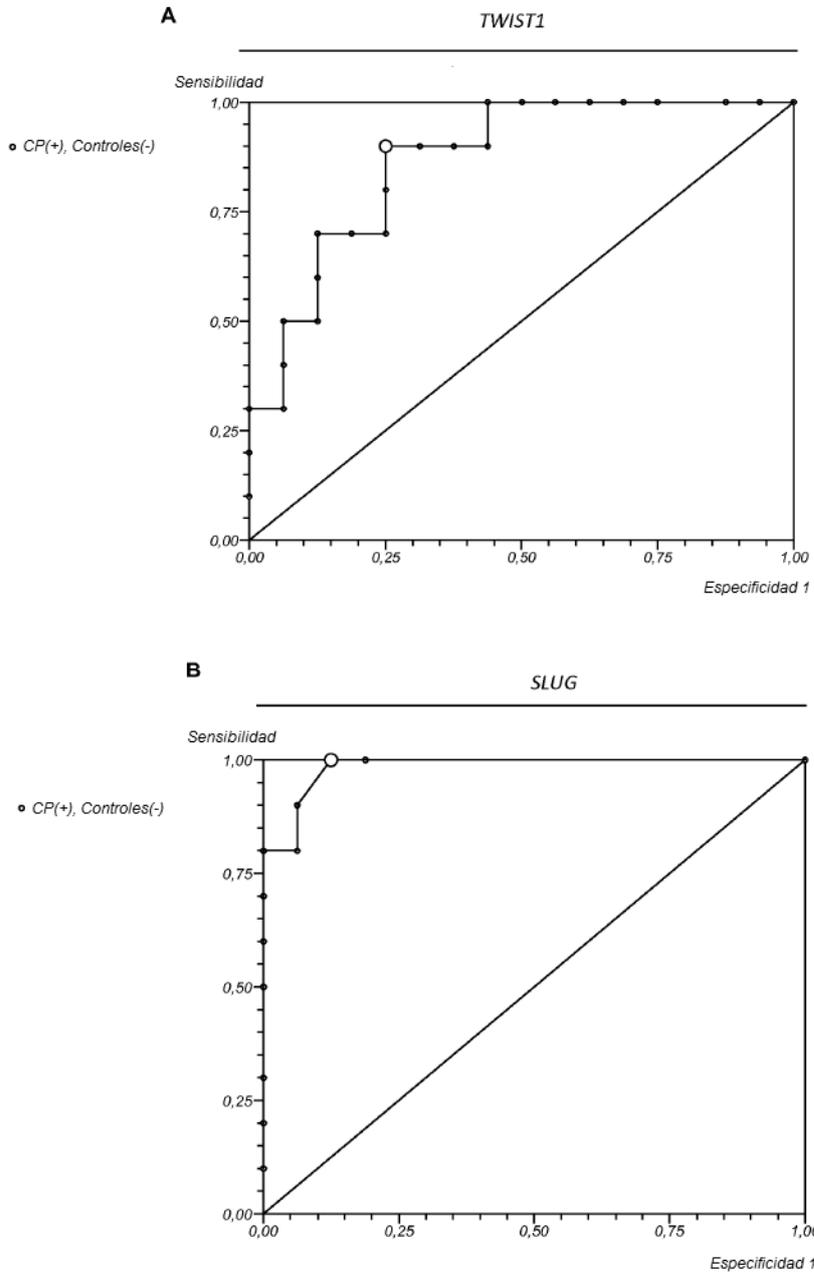


Fig. 5 (1/2)

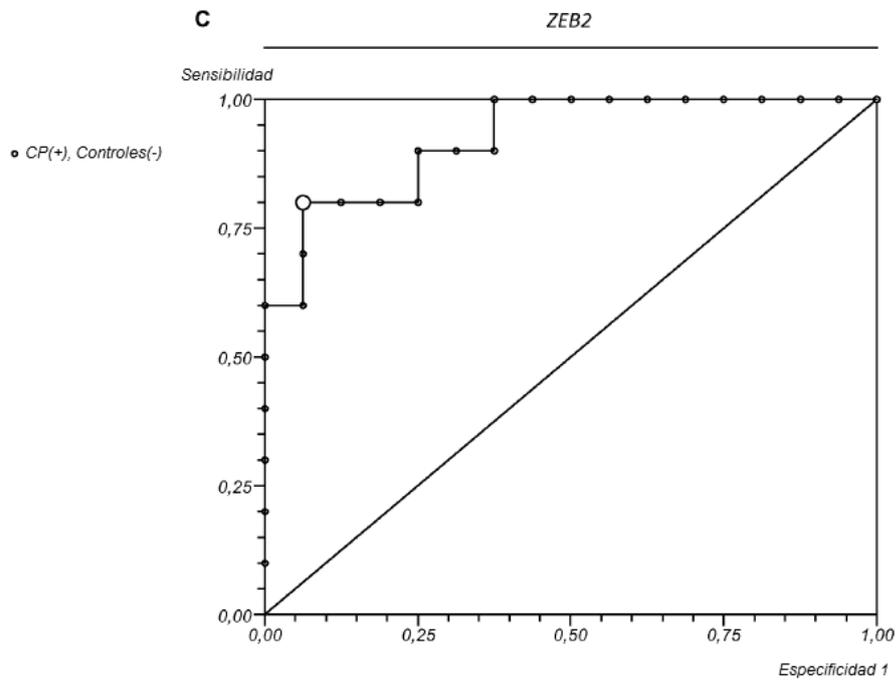


Fig. 5 (2/2)

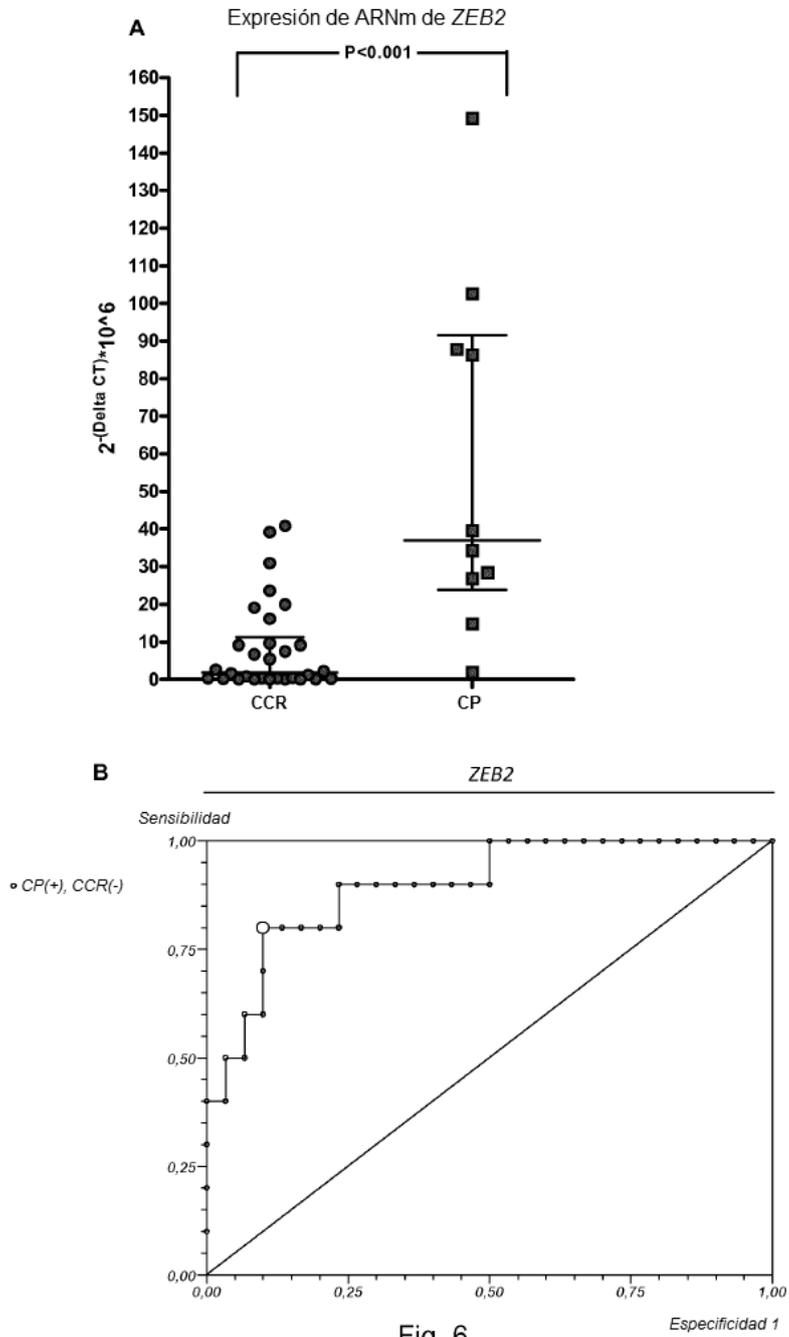


Fig. 6