

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 646**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2011 E 14178981 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2829881**

54 Título: **Diagnóstico para cáncer colorrectal**

30 Prioridad:

14.07.2010 AU 2010903140

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

08.02.2018

73 Titular/es:

**VISION TECH BIO PTY LTD (100.0%)
of Level 17 500 Collins Street
Melbourne, VIC 3000, AU**

72 Inventor/es:

**COSGROVE, LEAH JANE;
TABOR, BRUCE;
BURGESS, ANTONY WILKS y
NICE, EDOUARD COLLINS**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 653 646 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

Diagnóstico para cáncer colorrectal

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a la determinación de la presencia y/o el nivel de biomarcadores para detectar o diagnosticar el cáncer colorrectal. La invención también se refiere a los kits de diagnóstico que comprenden reactivos para determinar la presencia y/o el nivel de biomarcadores y los procedimientos de detección o diagnóstico del cáncer colorrectal.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer colorrectal, también conocido como cáncer de colon o cáncer de intestino, es la segunda causa más común de cáncer en todo el mundo. Hay una incidencia anual de casi un millón de casos de cáncer colorrectal con una mortalidad anual aproximada de 500.000 (Cancer in Australia: an overview, 2008). Desafortunadamente, el 30-50 % de los pacientes tiene metástasis oculta o manifiesta en la presentación y una vez que los tumores se han metastatizado, el pronóstico es muy pobre con cinco años de supervivencia de menos del 10 % (Etzioni y cols., 2003). Por el contrario, más del 90 % de los pacientes que se presentan mientras el tumor sigue localizado seguirán estando vivos después de 5 años y se pueden considerar curados. La detección temprana de las lesiones colorrectales reduciría, por lo tanto, significativamente el impacto del cáncer de colon (Etzioni y cols. 2003).

Los ensayos de diagnóstico precoz actuales en el uso generalizado para el diagnóstico de cáncer colorrectal son la prueba de sangre oculta en las heces (FOBT, por sus siglas en inglés), la sigmoidoscopia flexible y la colonoscopia (Lieberman, 2010). La FOBT tiene relativamente baja especificidad lo que resulta en una tasa alta de falsos positivos. Se debe, por lo tanto, realizar un seguimiento de todos los FOBT positivos con una colonoscopia. El muestreo se realiza por individuos en casa y requiere al menos analizar dos muestras fecales para lograr una óptima sensibilidad. Algunas versiones de la FOBT requieren también restricciones dietéticas antes de realizar el muestreo. La FOBT carece también de sensibilidad en la etapa temprana de las lesiones cancerosas que no sangran en el intestino y, como se establece anteriormente, estas son las lesiones para las que el tratamiento tiene más éxito.

Mientras que el diagnóstico precoz de la FOBT no resulta en la reducción de la mortalidad debido a que el cáncer colorrectal experimenta una tasa baja de cumplimiento (30-40 %), muy probablemente debido a la naturaleza desagradable de la prueba, lo cual limita su utilidad como una herramienta de diagnóstico precoz. La colonoscopia es el estándar de oro actual y tiene una especificidad mayor al 90 % pero es intrusiva y costosa con un riesgo pequeño pero definido de complicaciones (2,1 por cada 1000 intervenciones) (Levin, 2004). El desarrollo de un ensayo barato basado en sangre rápido y específico superaría los problemas de cumplimiento comúnmente vistos con otras pruebas de diagnóstico precoz (Tonus, 2006; Hundt y cols., 2007) y resultaría más aceptable como parte de un ensayo de diagnóstico precoz.

El documento WO2008/138522 divulga un procedimiento para el diagnóstico de cáncer colorrectal en muestras de heces basado en la detección de TIMP-1. La sensibilidad y especificidad de esta prueba diagnóstica no son sin embargo óptimas.

45 **RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

Los autores de la presente invención investigaron más de sesenta biomarcadores asociados con el cáncer colorrectal, pero encontraron que ninguno de los biomarcadores en solitario era adecuado como prueba de diagnóstico. Sorprendentemente, se ha descubierto que la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos tres biomarcadores asociados con el cáncer colorrectal en una muestra de un sujeto permitió la detección o diagnóstico del cáncer colorrectal en cualquiera de las etapas de la enfermedad, donde los tres biomarcadores son (a) DKK-3, M2PK, y IGFBP2, (b) M2PK, IGFBP2 y EpCAM, (c) M2PK, IGFBP2 y IL-13, o (d) M2PK, IGFBP2 y IL-8. Determinar la presencia y/o el nivel de al menos tres biomarcadores (a), (b), (c) o (d) proporciona ventajosamente una prueba de diagnóstico que es al menos comparable en la sensibilidad y especificidad a la FOBT.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

i) la determinación de la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores, donde los tres biomarcadores son:

60

(a) DKK-3 (dickkopf homólogo 3), M2PK (piruvato cinasa muscular 2), y IGFBP2 (factor de crecimiento similar a la insulina que fija la proteína-2);

(b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial),

(c) M2PK, IGFBP2 y IL-13 (interleucina-13); o

5 (d) M2PK, IGFBP2 y IL-8 (interleucina-8)

en una muestra del sujeto,

donde la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores es indicativo de cáncer colorrectal.

10 La descripción también divulga un procedimiento para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

i) la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos dos biomarcadores seleccionados de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1 en una muestra del sujeto,

15

donde la presencia y/o el nivel de dos biomarcadores es indicativo de cáncer colorrectal.

En un aspecto de esta divulgación, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de dos biomarcadores seleccionados de entre M2PK, EpCam, IL-13, DKK-3, IL-8 y IGFBP2.

20

En otro aspecto de esta divulgación, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos tres de los biomarcadores.

En un aspecto de esta divulgación, los tres biomarcadores se seleccionan de entre M2PK, EpCam, IL-13, DKK-3, IL-

25

8, IGFBP2, MIP1 β , TGF β 1 y MAC2BP.

En una forma de realización particular, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores, donde los tres biomarcadores son:

30 i) DKK-3, M2PK, y IGFBP2; o

ii) M2PK, IGFBP2, y EpCAM;

En otra forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos cuatro de los biomarcadores.

35

En una forma de realización particular, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de cuatro biomarcadores, donde los cuatro biomarcadores son:

i) DKK-3, M2PK, MAC2BP, y IGFBP2;

40 (ii) DKK-3, M2PK, IL-8 y IGFBP2;

(iii) DKK-3, M2PK, IL-13 y IGFBP2;

(iv) DKK-3, M2PK, IGFBP2 y EpCAM;

(v) DKK-3, M2PK, MIP1 β y IGFBP2;

(vi) DKK-3, M2PK, TGF β 1 y IGFBP2;

45 (vii) DKK-3, M2PK, IGFBP2 y TIMP1;

(viii) M2PK, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;

(ix) M2PK, MIP1 β , IL-13, y IGFBP2;

(x) M2PK, IL-13, Mac2BP, IGFBP2;

(xi) M2PK, IL-13, IGFBP2, EpCAM;

50 (xii) M2PK, IL-8, IL-13 y IGFBP2;

(xiii) M2PK, IL-8, MAC2BP, IGFBP2;

(xiv) M2PK, IL-8, IGFBP2, EpCAM;

(xv) M2PK, IL-13, TGF β 1 y IGFBP2;

(xvi) M2PK, IL-13, IGFBP2 y TIMP1;

55 (xvii) M2PK, TGF β 1, IGFBP2 y EpCAM;

(xviii) M2PK, MIP1 β , IGFBP2 y EpCAM; o

(xix) M2PK, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM.

En otra forma de realización más, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos cinco de los biomarcadores.

60

En una forma de realización particular, los cinco biomarcadores son

- (i) M2PK, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- 5 (ii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IGFBP2 y EpCAM;
- (iii) DKK-3, M2PK, IL-8, IGFBP2 y EpCAM;
- (iv) DKK-3, M2PK, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (v) M2PK, MIP1beta, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (vi) DKK-3, M2PK, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- 10 (vii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13 y IGFBP2;
- (viii) DKK-3, M2PK, IL-13, TGFbeta1 y IGFBP2;
- (ix) DKK-3, M2PK, IL-13, IGFBP2 y EpCAM;
- (x) M2PK, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (xi) M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1 y IGFBP2;
- 15 (xii) M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (xiii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8 y IGFBP2;
- (xiv) DKK-3, M2PK, MIP1beta, Mac2BP y IGFBP2;
- (xv) M2PK, IL-8, IL-13, IGFBP2 y EpCAM;
- (xvi) M2PK, IL-8, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- 20 (xvii) DKK-3, M2PK, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xviii) M2PK, MIP1beta, IL-13, IGFBP2 y EpCAM;
- (xix) M2PK, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (xx) M2PK, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2 y EpCAM;
- (xxi) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1 y IGFBP2;
- 25 (xxii) DKK-3, M2PK, IL-8, Mac2BP y IGFBP2;
- (xxiii) M2PK, IL-8, IL-13, IGFBP2 y TIMP1;
- (xxiv) M2PK, IL-13, IGFBP2, TIMP1, EpCAM; o
- (xxv) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13 y IGFBP2.

30 En otra forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos seis de los biomarcadores.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos siete de los biomarcadores.

35

En una forma de realización particular, los siete biomarcadores son:

- (i) DKK-3, M2PK, IL-8, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (ii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- 40 (iii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (iv) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (v) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (vi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (vii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- 45 (viii) IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, y TGF β 1;
- (ix) M2PK, MIP1beta, IL-8, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (x) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP y IGFBP2;
- (xi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (xii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- 50 (xiii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2 y TIMP1;
- (xiv) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xv) DKK-3, M2PK, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, y TIMP1;
- (xvi) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xvii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, IGFBP2, y EpCAM;
- 55 (xviii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, y IGFBP2;
- (xix) M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (xx) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xxi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (xxii) DKK3, MIP1bet IL8, IL13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1,
- 60 (xxiii) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;

(xxiv) M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
 (xxv) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2 y EpCAM;
 (xxvi) DKK-3, M2PK, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM; o
 (xxvii) IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, EpCam, y MIP1β.

5

En otra forma de realización más, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos ocho de los biomarcadores.

En una forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos nueve de los biomarcadores. En una forma de realización, los nueve biomarcadores son:

- (i) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (ii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (iii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- 15 (iv) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (v) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (vi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (vii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM; o
- (viii) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM.

20

En otra forma de realización más, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos diez de los biomarcadores. En una forma de realización, los diez biomarcadores son DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM.

25 En otro aspecto de la divulgación, el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de una combinación de biomarcadores según cualquiera de las tablas de la 7 a la 18.

En otra forma de realización, el procedimiento comprende la detección de la presencia y/o el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado de entre IGF-I, IGF-II, IGF-BP2, Anfirregulina, VEGFA, VEGFD, MMP-1, MMP-2, 30 MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ENA-78, MCP-1, MIP-1β, IFN-γ, IL-10, IL-13, IL-1β, IL-4, IL-8, IL-6, MAC2BP, piruvato cinasa M2 tumoral, M65, OPN, DKK-3, EpCam, TGFβ-1, y VEGFpan.

En otra forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 66 %.

35

En otra forma de realización más, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 77 %.

En una forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una especificidad de al menos el 75 %.

En una forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una especificidad de al menos el 80 %.

45 En otra forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una especificidad de al menos el 90 %.

En otra forma de realización más, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una especificidad de al menos el 95 %.

50

En otra forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal en etapa A de Dukes con una sensibilidad de al menos el 50 % y una especificidad de al menos el 95 %.

En otra forma de realización más, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal en etapa A de Dukes 55 con una sensibilidad de al menos el 60 % y una especificidad de al menos el 80 %.

En otra forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal en etapa A de Dukes con una sensibilidad de al menos el 50 % y una especificidad de al menos el 90 %.

60 Los expertos en la materia comprenderán que la etapa A de Dukes se corresponde a las clasificaciones TNM T1,

N0, M0 y T2, N0, M0.

Por lo tanto, en una forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con clasificación TNM T1, N0, M0 o T2, N0, M0 con una sensibilidad de al menos el 50 % y una especificidad de al menos el 95 %.

En otra forma de realización más, el procedimiento diagnostica o detecta un cáncer colorrectal con clasificación TNM T1, N0, M0 o T2, N0, M0 con una sensibilidad de al menos el 60 % y una especificidad de al menos el 80 %.

10 En otra forma de realización, el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal según la clasificación TNM T1, N0, M0 o T2, N0, M0 con una sensibilidad de al menos el 50 % y una especificidad de al menos el 90 %.

En los procedimientos de la invención se puede usar cualquier técnica adecuada para la detección de polipéptidos. En una forma de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con al menos un compuesto que une un polipéptido biomarcador. Alternativamente, el procedimiento comprende la detección de polipéptidos por espectrometría de masas.

En una forma de realización particular, el compuesto se marca detectablemente.

20 En otra forma de realización, el compuesto es un anticuerpo.

En una forma de realización, el compuesto está unido a un soporte sólido.

En el procedimiento de la invención, la determinación de la presencia y/o el nivel del biomarcador puede comprender la determinación de la presencia y/o el nivel de un polinucleótido que codifica el biomarcador, como por ejemplo una transcripción genética del biomarcador. Por lo tanto, en una forma de realización, los biomarcadores son polinucleótidos.

En otra forma de realización más de los procedimientos de la invención, el procedimiento comprende:

- 30
- i) la determinación de la presencia y/o el nivel de los biomarcadores en la muestra del sujeto; y
 - ii) la comparación de la presencia y/o el nivel de los biomarcadores con un control, donde una presencia y/o el nivel en la muestra que sea distinta a la del control es indicativo de cáncer colorrectal.

35 En una forma de realización, la muestra comprende sangre, plasma, suero, orina, plaquetas, magacariocitos o heces.

En otro aspecto, la presente descripción divulga un procedimiento de tratamiento que comprende:

- 40
- (i) el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal de acuerdo con el procedimiento de la invención; y
 - (ii) la administración o recomendación de un tratamiento terapéutico para el tratamiento del cáncer colorrectal.

En otro aspecto adicional, la presente descripción divulga un procedimiento para monitorizar la eficacia del tratamiento del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento el tratamiento del sujeto contra el cáncer y después la detección de la presencia y/o el nivel de al menos dos biomarcadores seleccionados de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1 en una muestra del sujeto, donde una ausencia de y/o reducción en el nivel de expresión de los polipéptidos después del tratamiento al compararlos antes del tratamiento son indicativos de la eficacia del tratamiento.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una matriz de compuestos para el diagnóstico o detección *in vitro* del cáncer colorrectal, donde cada uno de los compuestos se une a un polipéptido biomarcador distinto seleccionado de entre

- (a) DKK-3, M2PK, y IGFBP2; o
- 55 (b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM.

En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un kit para el diagnóstico o detección *in vitro* del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el kit compuestos que se unen cada uno a un polipéptido biomarcador distinto seleccionado de entre

60

- (a) DKK-3, M2PK, y IGFBP2; o
 (b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM.

A lo largo de esta memoria descriptiva la palabra "comprender", o variaciones como "comprendiendo" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento declarado, un número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos.

Como será evidente, las funciones y características preferidas de un aspecto de la invención se aplican a muchos otros aspectos de la invención.

De ahora en adelante, la invención se describirá mediante los siguientes ejemplos no limitantes y con referencia a las figuras adjuntas.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS ADJUNTOS**

Figura 1. En el Estudio 3 se descubrió una combinación óptima de 46 biomarcadores proteicos potenciales usando modelos de regresión logística, resultando en un panel de siete biomarcadores que se ilustra como una curva ROC (curva negra). Se estimó el rendimiento de este "panel" de datos independientes usando la validación cruzada "dejar uno fuera" (curva gris). Las líneas verticales se dibujan en los puntos de especificidad del 80 % y del 90 %, puntos de interés de funcionamiento en las pruebas de diagnóstico precoz. Las estadísticas del rendimiento se presentan en la Tabla 5.

Figura 2. Rendimiento del modelo de siete biomarcadores que identifica a los pacientes con cáncer colorrectal entre los normales en cada etapa de Dukes ilustrada por las curvas ROC para cada etapa. A (roja)- Etapa A, B (verde)- Etapa B, C (azul)- Etapa C, y D (negra)-Etapa D del Estudio 3a. Las características de rendimiento se presentan en la Tabla 6.

Figura 3. Cuando el resultado del biomarcador del Estudio 4 (también conocido como Estudio 3 recalculado) se modeló en pares en un total de 5 pares (de un máximo de 45 combinaciones seleccionadas de entre la lista anterior de 10 biomarcadores) se puede mostrar para producir una sensibilidad superior al 52 % a una especificidad de 95. El rendimiento de este par de combinaciones de biomarcadores adecuadas se ilustra como curvas ROC (n = 5 curvas). Las características de rendimiento se presentan en la Tabla 7.

Figura 4. Un ejemplo de un modelo de 3 biomarcadores generado a partir de los datos del Estudio 4 que tiene una sensibilidad de al menos el 50 % a una especificidad del 95 %. Hay 968 posibles combinaciones de 3-10 biomarcadores y aproximadamente la mitad de esas combinaciones mostraron un rendimiento de al menos el 50 % de sensibilidad a una especificidad del 90 %.

Figura 5. Las curvas ROC se ilustran para todas las combinaciones de 3-10 biomarcadores generadas a partir de los datos del Estudio 4 que tienen una sensibilidad de al menos el 50 % a una especificidad del 95 % (n = 485 curvas de validación cruzada de un total de 968 modelos posibles).

Figura 6. Frecuencia de cada biomarcador en los mejores 485 modelos. Estos BM representan todos los modelos de suero que dieron una sensibilidad de al menos del 50 % al 95 %. La alta representación de todos los 10 biomarcadores en los modelos útiles demostró la unidad de nuestra selección de estos 10 biomarcadores.

Figura 7. Un modelo de 5 biomarcadores generado a partir de los datos del Estudio 4 se ilustra como una curva ROC (negra) y una curva ROC de validación cruzada (gris). Estos modelos mostraron una sensibilidad del 68 % a una especificidad del 95 % cuando todas las etapas de la enfermedad están incluidas y cuando la validación cruzada ofrece una sensibilidad del 64 %. Los biomarcadores incluidos son [IL-8, IGFBP2, Mac2BP, DKK-3 y M2PK].

Figura 8. Un modelo de 6 biomarcadores generado a partir de los datos del Estudio 4 se ilustra como una curva ROC (negra) y una curva ROC de validación cruzada (gris). Estos modelos mostraron una sensibilidad del 77 % a una especificidad del 95 % cuando todas las etapas de la enfermedad están incluidas y cuando la validación cruzada ofrece una sensibilidad del 67 %. Los biomarcadores incluidos son [IL-8, IGFBP2, Mac2BP, DKK-3, TGFbeta1&M2PK].

Figura 9. Se muestran dos modelos alternativos de siete biomarcadores generados a partir de los datos del Estudio 3a. Uno se optimizó para alta especificidad (negro/nuevo) y se muestra una alternativa o modelo optimizado para el área debajo de la curva (gris/antiguo). A una especificidad del 90 % la sensibilidad fue del 72 % para el modelo nuevo y del 77 % para el modelo antiguo. Los biomarcadores incluidos fueron los siguientes:

Nuevo: IL8,IGFBP2, s90MAC2BP, M2PK, DKK-3, IL-13 & TGFbeta,
 Antiguo: IL8, IGFBP2, s90MAC2BP, M2PK, EpCAM, IL13 & MIP-1b.

Figura 10. Un modelo de siete biomarcadores generado a partir de los datos del Estudio 4 se ilustra como una curva ROC (negra) y una curva ROC de validación cruzada (gris). Este modelo mostró una sensibilidad del 84 % a una especificidad del 95 %. Los biomarcadores incluidos son [M2PK suero, IL8.plasma, TGF beta1.suero, IGFBP2.plasma,Mac2BP.suero, TIMP1.plasma y Dkk3 plasma.

Figura 11. Se ilustran las curvas ROC de validación cruzada muestran el rendimiento de un modelo de 3 biomarcadores para cada etapa de Dukes. Estos datos demuestran la validez de la elección de los tres biomarcadores (DKK-3, M2PK y IGFBP2) para la detección del cáncer a etapas diferentes de la progresión de la enfermedad. Los datos indican que en la Etapa A si se usan los tres biomarcadores, la prueba aún logrará una importante sensibilidad del 64 % a una especificidad del 95 % lo que es comparable a la sensibilidad lograda en la etapa tardía de la enfermedad (79 %). Que es el panel de los tres biomarcadores que recogerá etapas tempranas de la enfermedad permitiendo la detección temprana. Los biomarcadores incluidos son Dkk3, M2PK y IGFBP2.

CÓDIGO AL LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 SEQ ID NO:1 - secuencia de aminoácido de IL-8
 SEQ ID NO:2 - secuencia de aminoácido de IGFBP2
 SEQ ID NO:3 - secuencia de aminoácido de MAC2BP
 SEQ ID NO:4 - secuencia de aminoácido de M2PK variante 1
 15 SEQ ID NO:5 - secuencia de aminoácido de M2PK variante 2
 SEQ ID NO:6 - secuencia de aminoácido de M2PK variante 3
 SEQ ID NO:7 - secuencia de aminoácido de IL-13
 SEQ ID NO:8 - secuencia de aminoácido de DKK-3 variante 1
 SEQ ID NO:9 - secuencia de aminoácido de DKK-3 variante 2
 20 SEQ ID NO:10 - secuencia de aminoácido de DKK-3 variante 3
 SEQ ID NO:11- secuencia de aminoácido de EpCam
 SEQ ID NO:12 - secuencia de aminoácido de MIP1 β
 SEQ ID NO:13 - secuencia de aminoácido de TGF β 1
 SEQ ID NO:14 - secuencia de aminoácido de TIMP-1

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Técnicas y definiciones generales

- 30 A menos que específicamente se defina de otro modo, debe entenderse que todos los términos técnicos y científicos usados en esta invención tienen el mismo significado que comúnmente entendería un experto en la materia cualquiera (p.ej. en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química proteica y bioquímica).
- 35 A menos que se indique lo contrario la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente invención serán procedimientos estándar, muy conocidos por los expertos en la técnica. Dichas técnicas se describen y explican en toda la bibliografía en fuentes como por ejemplo J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook y cols., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn, Cold Spring Harbour Laboratory Press (2001), R. Scopes, Protein Purification - Principles and Practice, 3rd edn, Springer (1994), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel y cols. (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), and J.E. Coligan y cols. (editors) Current
- 45 Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (including all updates until present).

Como se usa en esta invención, el término "cáncer colorrectal", también conocido como "cáncer de colon", se refiere a todas las formas de cáncer originadas a partir de células epiteliales que recubren el intestino grueso y/o el recto.

- 50 Como se usa en esta invención, "biomarcador" se refiere a cualquier molécula, como por ejemplo un gen, transcripción genética (por ejemplo ARNm), péptido o proteína o fragmento del mismo producido por un sujeto que es útil en la diferenciación de sujetos que tienen cáncer colorrectal de los sujetos normales o sanos.

Como se usa en esta invención, el término "diagnóstico", y variantes del mismo como por ejemplo, pero sin limitarse a, "diagnóstico", "diagnosticado" o "diagnosticar" no se debe limitar al diagnóstico principal de un estado clínico, pero se debe utilizar para incluir el diagnóstico de la enfermedad recurrente.

- Como se usa en esta invención, el término "sujeto" se refiere a cualquier animal que pueda desarrollar cáncer colorrectal e incluye animales como por ejemplo mamíferos, p. ej. humanos o no humanos como por ejemplo gatos y
- 60 perros, animales de laboratorio como por ejemplo ratones, ratas, conejos o cobayas, y ganado. En una forma de

realización preferida, el sujeto es un humano.

- La "muestra" puede ser de cualquier tipo adecuado y puede referirse, p.ej. a un material en el que se puede detectar el nivel de biomarcadores. Preferentemente, se obtiene la muestra a partir del sujeto para que la detección de la presencia y/o el nivel de biomarcadores puedan realizarse *in vitro*. Alternativamente, la presencia y/o el nivel de biomarcadores se pueden detectar *in vivo*. La muestra se puede usar obtenida directamente de la fuente o siguiendo al menos un paso de purificación (parcial). La muestra se puede preparar en cualquier medio práctico que no interfiera con el procedimiento de la invención. Típicamente, la muestra es una solución acuosa, fluido biológico, células o tejido. Preferentemente, la muestra es sangre, plasma, suero, orina, plaquetas, macariorocitos o heces. El pretratamiento puede implicar, por ejemplo, la preparación de plasma a partir de sangre, fluidos viscosos diluidos, y similares. Los procedimientos de tratamiento pueden implicar filtración, destilación, separación, concentración, inactivación o interferencia de los componentes, y la adición de reactivos. La selección y el pretratamiento de muestras biológicas antes de la prueba son bien conocidos en la técnica y no necesitan describirse más.
- 15 Como se usa en esta invención los términos "tratar", "trata" o "tratamiento" incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto lo suficiente para reducir o retrasar el comienzo o progresión del cáncer colorrectal, o para reducir o eliminar al menos un síntoma del cáncer colorrectal.

Biomarcadores

- 20 Los autores de la presente invención han demostrado que determinar la presencia y/o el nivel de al menos tres biomarcadores en una muestra de un sujeto permite la detección o diagnóstico del cáncer colorrectal, ya sea la detección precoz en la etapa A de Dukes o a una etapa algo tardía como por ejemplo la Etapa B o C o D de Dukes, con especificidad y sensibilidad comparables a o mayores que la lograda con la FOBT. Al menos los tres biomarcadores que son útiles en los procedimientos de la presente invención se seleccionan de entre IL-8 (interleucina-8), IGFBP2 (factor de crecimiento similar a la insulina que fija la proteína-2), MAC2BP (proteína que fija MAC2; proteína sérica 90K), M2PK (piruvato cinasa muscular 2, piruvato cinasa 3), IL-13 (interleucina-13), DKK-3 (dickkopf homólogo, 3), EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial), MIP1 β (proteína inflamatoria de macrófagos 1 β , CCL4, MIP1beta), TGF β 1 (actor del crecimiento transformante β 1, TGFbeta1) y TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas 1) y son más específicamente:

- (a) DKK-3, M2PK y IGFBP2;
 (b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM,
 (c) M2PK, IGFBP2 y IL-13; o
 35 (d) M2PK, IGFBP2 y IL-8.

Entre la referencia a estos biomarcadores se incluye la referencia a todas las variantes de polipéptido y polinucleótido como por ejemplo isoformas y variantes de transcripción como conocería el experto en la materia. Los números de acceso NCBI de las secuencias representativas para cada uno de los biomarcadores se proporcionan en la Tabla 1.

Tabla 1. Números de acceso NCBI para las secuencias representativas del biomarcador.

Biomarcador	Números de acceso NCBI representativos
IL-8	NM_000584.2 (SEQ ID NO:1)
IGFBP2	NM_000597.2 (SEQ ID NO:2)
MAC2BP	NM_005567.3 (SEQ ID NO:3)
M2PK	NM_002654.3; NM_182470.1; NM_182471.1 (SEQ ID NOs:4-6)
IL-13	NM_002188.2 (SEQ ID NO:7)
DKK-3	NM_015881.5; NM_013253; NM_001018057.1 (SEQ ID NOs:8-10)
EpCam	NM_002354.2 (SEQ ID NO:11)
MIP1 β	NM_002984.2 (SEQ ID NO:12)
TGF β 1	NM_000660.4 (SEQ ID NO:13)
TIMP-1	NM_003254.2 (SEQ ID NO:14)

Detección o diagnóstico del cáncer colorrectal

- 45 Será evidente a partir de la descripción anterior que los procedimientos de diagnóstico de la presente invención pueden involucrar un grado de cuantificación para determinar los niveles de biomarcadores en muestras de pacientes. Dichas cuantificaciones se proporcionan fácilmente mediante la inclusión de muestras de control

apropiadas.

En una forma de realización, se incluyen los controles internos en los procedimientos de la presente invención. Un control interno preferido es una o más muestras tomadas de uno o más individuos sanos.

5

En el presente contexto, el término "individuo sano" se entenderá como un individuo que se sabe que no padece cáncer colorrectal, dicho conocimiento derivado de datos clínicos sobre el individuo, incluyendo, pero sin limitarse a, un ensayo de diagnóstico distinto al descrito en esta invención.

10 Como será conocido por los expertos en la técnica, cuando los controles internos no se incluyen en cada ensayo realizado, el control puede derivarse de un conjunto de datos establecido.

Los datos relativos a los sujetos de control se seleccionaran preferentemente entre el grupo formado por:

- 15 1. un conjunto de datos que comprende mediciones de la presencia o el nivel de los biomarcadores para una población típica de sujetos que se conoce que tienen cáncer colorrectal;
 2. un conjunto de datos que comprende mediciones de la presencia o el nivel de biomarcadores del sujeto a analizar donde dichas mediciones se han hecho anteriormente, como por ejemplo, cuando se sabía que el sujeto estaba sano o, en el caso de un sujeto que tiene cáncer colorrectal, cuando el sujeto fue diagnosticado o en una etapa temprana en la progresión de la enfermedad;
- 20 3. un conjunto de datos que comprende mediciones de la presencia o el nivel de biomarcadores para un individuo sano o una población de individuos sanos; y
 4. un conjunto de datos que comprende mediciones de la presencia o el nivel de los biomarcadores para un individuo normal o una población de individuos normales.

25

En el presente contexto, el término "población típica" con respecto a los sujetos conocidos por tener cáncer colorrectal se entenderá que se refiere a una población o muestra de sujetos diagnosticados con cáncer colorrectal que es representativa del espectro de pacientes con cáncer colorrectal. Esto no debe entenderse como una exigencia de una distribución normal estricta de parámetros morfológicos o clinicopatológicos en la población, dado que algunas variaciones en dicha distribución son permisibles. Preferentemente, una "población típica" exhibirá un espectro de cáncer colorrectal en distintas etapas de progresión de la enfermedad. Se prefiere particularmente que una "población típica" exhiba las características de la expresión de una cohorte de sujetos como se describe en esta invención.

30

35 El término "individuo normal" se entenderá como un individuo que no expresa un biomarcador, o expresa un biomarcador a un nivel bajo en una muestra. Como será conocido por los expertos en la técnica, los datos obtenidos de una muestra lo suficientemente grande de población se normalizarán, permitiendo la generación de un conjunto de datos para determinar el nivel promedio de un biomarcador particular.

40 Los expertos en la materia son fácilmente capaces de determinar el valor de referencia para la comparación en cualquier ensayo diagnóstico de la presente invención sin experimentación innecesaria, basándose en la enseñanza proporcionada en esta invención.

Los compuestos que unen un biomarcador cuando se usa diagnósticamente pueden estar unidos a un reactivo de diagnóstico como por ejemplo una etiqueta detectable para permitir la fácil detección de los eventos de unión *in vitro* o *in vivo*. Las etiquetas adecuadas incluyen radioisótopos, marcadores de colorantes u otros reactivos de imágenes para la detección y/o localización de moléculas diana. Los compuestos unidos a una etiqueta detectable se pueden usar con tecnologías de imágenes *in vivo* adecuadas como por ejemplo radiología, fluoroscopia, resonancia magnética nuclear (RM), exploración mediante tomografía axial computarizada (TAC), tomografía por emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada, etc.

50

Los procedimientos de diagnóstico de la presente invención son capaces de diagnosticar o detectar el cáncer colorrectal con una sensibilidad y especificidad que es al menos comparable a una FOBT, o mayor. Como entendería un experto en la materia, la sensibilidad se refiere a la proporción de los positivos reales en la prueba de diagnóstico que se identifican correctamente como que tienen un cáncer colorrectal. La especificidad mide la proporción de negativos que se han identificado correctamente como que no tienen cáncer colorrectal. En una forma de realización los procedimientos de la invención son capaces de diagnosticar o detectar el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 60 % o 66 %, o al menos el 77 %, 80 %, 83 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, o al menos el 93 %. En otra forma de realización, los procedimientos de la invención son capaces de diagnosticar o detectar el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 80 %, o al menos el 85 % o al menos el 90 % o al

55

60

menos el 95 %.

En otra forma de realización, los procedimientos de la invención son capaces de diagnosticar o detectar el cáncer colorrectal con una especificidad de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o al menos el 95 %.

Ventajosamente, los procedimientos de la presente invención son capaces de detectar el cáncer colorrectal en todas las etapas de Dukes con mayor sensibilidad que la FOBT. En la Etapa A de Dukes, el tumor ha penetrado en, pero no a través de la pared intestinal. En la Etapa B de Dukes, el tumor ha penetrado a través de la pared intestinal, pero aún no ha afectado ningún ganglio linfático. En la Etapa C de Dukes, el cáncer afecta los ganglios linfáticos regionales. En la Etapa D de Dukes, hay una metástasis distante, por ejemplo al hígado o pulmón. En una forma de realización, el procedimiento de la presente invención es capaz de diagnosticar o detectar el cáncer colorrectal en cualquier Etapa de Dukes con una sensibilidad de al menos el 80 %.

15 Como conocen los expertos en la materia, hay otros sistemas para la estadificación del cáncer que se conocen en la técnica. Un ejemplo es la clasificación de tumores malignos (TNM) que usa el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC: Colon and rectum. in Edge y cols., eds; AJCC Cancer Staging Manual, 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp:143-164). Otro ejemplo es la Clasificación Astler-Coller Modificada (MAC).

20 En consecuencia, Los expertos en la materia apreciarán que las Etapas de Dukes se corresponden con ciertas Clasificaciones TNM. Por ejemplo, la Etapa A de Dukes se corresponde con la T1, T2, N0 y M0; la Etapa B de Dukes se corresponde con T3, T4a, T4b, N0 y M0; y la Etapa C de Dukes se corresponde con i) T1-T2, N1/N1c, M0; ii) T1, N2a y M0; iii) T3-T4a, N1/N1c y M0; iv) T2-T3, N2a y M0; v) T1-T2, N2b y M0; vi) T4a, N2a y M0; vii) T3-T4a, N2b y M0; y viii) T4b, N1-N2 y M0. Por lo tanto, los expertos en la materia comprenderán que la referencia a una Etapa de Dukes como se usa en esta invención incluye la referencia a la correspondiente clasificación TMN tal como es conocida en la técnica.

Técnicas de detección de proteínas

30 En una forma de realización, se detecta el polipéptido biomarcador en una muestra de paciente, donde la presencia y/o el nivel del polipéptido en la muestra son indicativos de cáncer colorrectal. Por ejemplo, el procedimiento puede comprender poner en contacto una muestra biológica derivada de un sujeto con un compuesto capaz de unirse a un polipéptido biomarcador, y detectar la formación de complejo entre el compuesto y el polipéptido biomarcador. El término "polipéptido biomarcador", como se usa en esta invención incluye los fragmentos de los polipéptidos biomarcadores, incluyendo, por ejemplo, los fragmentos y epítomos inmunogénicos del polipéptido biomarcador.

En una forma de realización, el compuesto que une el biomarcador es un anticuerpo.

40 El término "anticuerpo" como se usa en esta invención incluye moléculas intactas así como moléculas que comprenden o están formadas por fragmentos de la misma, como por ejemplo Fab, F(ab')₂, Fv y scFv, así como variantes diseñadas incluyendo diacuerpos, triacuerpos y minicuerpos y anticuerpos de dominio único que son capaces de unir un epítopo determinante. Por lo tanto, los anticuerpos pueden existir como inmunoglobulinas intactas, o como modificaciones en una variedad de formas.

45 En otra forma de realización, se detecta un anticuerpo frente a un polipéptido biomarcador en una muestra de paciente, donde la presencia y/o el nivel del anticuerpo de la muestra son indicativos de cáncer colorrectal.

Entre los sistemas de detección preferidos contemplados en esta invención se incluye cualquier ensayo conocido para la detección de proteínas o anticuerpos en una muestra biológica aislada de un sujeto humano, como por ejemplo, SDS/PAGE, isoelectroenfoque, electroforesis en gel de 2 dimensiones que comprende SDS/PAGE e isoelectroenfoque, un inmunoensayo, citometría de flujo, p. ej. separación de células activadas por fluorescencia (FACS), un sistema basado en la detección usando un compuesto de anticuerpo y de no anticuerpo, como por ejemplo, una molécula pequeña (p. ej. un compuesto químico, agonista, antagonista, modulador alostérico, inhibidor competitivo, o inhibidor no competitivo, de la proteína). De acuerdo con estas formas de realización, el anticuerpo o la molécula pequeña se pueden usar en cualquier fase sólida estándar o formato de ensayo de fase de solución susceptible a la detección de proteínas. La detección óptica o fluorescente, como por ejemplo, el uso de espectrometría de masas, MALDI-TOF, tecnología biosensora, fibra óptica evanescente o transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, se incluye claramente en la presente invención. También se contemplan los sistemas de ensayo adecuados para el uso en cribado ultrarrápido de muestras de masa, p. ej. el procedimiento de resonancia de espectroscopia ultrarrápido (p. ej. MALDI-TOF, MS electronebulización o MS nano

electronebulización). Otra técnica de detección de proteína adecuada implica el uso de Monitorización de Reacciones Múltiples (MRM) en LC-MS (LC/MRM-MS) (Anderson and Hunter, 2006).

Los formatos de inmunoensayo son particularmente adecuados, p. ej. seleccionados de entre el grupo formado por una inmunotransferencia, un Western blot, un dot blot, un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático. También son útiles los inmunoensayos modificados que usan transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), etiquetas de afinidad codificadas con isótopos (ICAT), tiempo de vuelo de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), ionización por electronebulización (ESI), tecnología biosensora, tecnología de fibra óptica evanescente, tecnología de chip de proteína.

Técnicas de detección de ácidos nucleicos

Se puede usar cualquier técnica adecuada que permita la valoración cualitativa y/o cuantitativa del nivel de un polinucleótido biomarcador en una muestra. Los términos "molécula de ácido nucleico" o "polinucleótido" como se usan en esta invención se refieren a un oligonucleótido, polinucleótido o cualquier fragmento de los mismos.

La comparación se puede hacer mediante la referencia a un control estándar, o a un nivel de control que se encuentra en el tejido sano. Por ejemplo, los niveles de un gen transcrito se pueden determinar mediante una inmunotransferencia tipo Northern, y/o RT-PCR. Con la llegada del PCR cuantitativo (a tiempo real), los análisis cuantitativos de la expresión génica se pueden lograr usando los cebadores apropiados para el gen de interés. El ácido nucleico puede etiquetarse e hibridarse en una matriz génica, en cuyo caso la concentración génica será directamente proporcional a la intensidad de la señal radiactiva o fluorescente generada en la matriz.

Los procedimientos para la secuenciación directa de secuencias nucleótidas son muy conocidos por los expertos en la materia y se pueden encontrar por ejemplo en Ausubel y cols., eds., Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley, (1995) and Sambrook y cols., Molecular Cloning, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001). La secuenciación se puede llevar a cabo mediante cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, secuenciación dideoxi, secuenciación química o variaciones de las mismas. La secuenciación directa tiene la ventaja de determinar las variaciones en cualquier par de bases de una secuencia particular.

Otros procedimientos de PCR que se pueden usar en la realización de la invención incluyen la hibridación basada en los sistemas de detección por PCR, ensayo TaqMan (patente de EE.UU n.º 5.962.233) y el ensayo de baliza molecular (patente de EE.UU n.º 5.925.517).

El ácido nucleico se puede separar de la muestra para su análisis. Los expertos en la técnica conocerán los procedimientos adecuados. Por ejemplo, el ARN puede aislarse de la muestra para analizarlo usando procedimientos convencionales, como por ejemplo los suministrados por la tecnología QIAGEN. Después, este ARN se retrotranscribe en ADN usando transcriptasa reversa y la molécula de ADN de interés puede después amplificarse mediante técnicas de PCR usando cebadores específicos.

Los procedimientos de diagnóstico también pueden realizarse directamente en las muestras de paciente. Los ensayos de hibridación o amplificación, como por ejemplo, los análisis Southern o Northern blot, inmunohistoquímica, análisis de polimorfismo conformacional de hebra simple (SSCP) y los análisis de PCR son algunas técnicas que son útiles en este sentido. Si lo desea, el ácido nucleico diana o la sonda se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido como por ejemplo una placa de microvaloración, membrana, perla de poliestireno, portaobjetos de vidrio u otra fase sólida.

Kits

La presente invención proporciona usos de los kits para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal. Dichos kits pueden ser adecuados para la detección de especies de ácido nucleico o, alternativamente pueden ser para la detección de un producto génico polipeptídico, como se analiza anteriormente.

Para la detección de polipéptidos, los anticuerpos se usarán más típicamente como componentes de los kits. Sin embargo, cualquier agente capaz de unirse específicamente a un producto génico biomarcador será útil en este aspecto de la invención. Otros componentes de los kits incluirán típicamente etiquetas, anticuerpos secundarios, sustratos (si el gen es una enzima), inhibidores, cofactores y preparaciones de productos génicos de control para permitir que el usuario cuantifique los niveles de expresión y/o evalúe si el experimento de diagnóstico ha funcionado correctamente. Las pruebas basadas en ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y las pruebas ELISA

competitivas son ensayos particularmente adecuados que los expertos en la materia pueden llevar a cabo fácilmente usando los componentes del kit.

- Opcionalmente, el kit comprende además medios para la detección de la unión de un anticuerpo a un polipéptido biomarcador. Dichos medios incluyen una molécula indicadora como por ejemplo, una enzima (como por ejemplo peroxidasa de rábano picante, o fosfatasa alcalina), un colorante, un radionúclido, un grupo luminiscente, un grupo fluorescente, biotina o una partícula coloidal, como por ejemplo oro coloidal o selenio. Preferentemente dicha molécula indicadora está directamente unida al anticuerpo.
- 10 En otra forma de realización más, un kit puede comprender adicionalmente una muestra de referencia. En una forma de realización, una muestra de referencia comprende un polipéptido que es detectado por un anticuerpo. Preferentemente, el polipéptido es de concentración conocida. Dicho polipéptido es de uso particular como estándar. En consecuencia, varias concentraciones conocidas de dicho polipéptido pueden detectarse usando un ensayo de diagnóstico descrito en esta invención.

- 15 Para la detección de ácidos nucleicos, dichos kits pueden contener un primer recipiente como por ejemplo un vial o un tubo de plástico o una placa de microvaloración que contiene una sonda oligonucleótida. Estos kits pueden contener opcionalmente un segundo recipiente que incluya los cebadores. La sonda se puede hibridizar con ADN cuya expresión alterada se asocia con el cáncer colorrectal y los cebadores son útiles para amplificar ese ADN. Los kits que contienen una sonda oligonucleótida inmovilizada en un soporte sólido se pueden también desarrollar, por ejemplo, usando matrices (véase Suplemento del número 21(1) Nature Genetics, 1999).

- Para la amplificación por PCR del ácido nucleico, los cebadores de ácido nucleico pueden estar incluidos en el kit, y son complementarios a al menos una parte de un gen biomarcador como se describe en esta invención. El conjunto de cebadores incluye típicamente al menos dos oligonucleótidos, preferentemente cuatro oligonucleótidos, que son capaces de la amplificación específica del ADN. Se pueden incluir oligonucleótidos etiquetados con fluorescente que permitirán la determinación por PCR cuantitativa (p. ej. química TaqMan, balizas moleculares). También se podrán incluir enzimas adecuadas para la amplificación del ADN.
- 25

- 30 Para propósitos de comparación o validación se puede incluir el ácido nucleico de control. Dichos controles pueden ser ARN/ADN aislado de un tejido sano, o de individuos sanos, o genes de mantenimiento como por ejemplo β -actina o GAPDH cuyos niveles de ARNm no están afectados por el cáncer colorrectal.

Algoritmos de regresión y estadísticas

- 35 Para desarrollar un panel de biomarcadores adecuado para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal, los autores de la presente invención han analizado numerosos biomarcadores en un modelo estadístico. Dicha mejora en el rendimiento de una prueba se conoce a veces como rendimiento "en la muestra". Una evaluación imparcial de una prueba requiere su evaluación con sujetos fuera de la muestra, es decir, sujetos no incluidos en la construcción del modelo predictivo inicial. Esto se logra mediante la evaluación del rendimiento de la prueba usando validación cruzada.
- 40

- Las pruebas de importancia estadística incluyen regresión lineal y no lineal, incluyendo ANOVA, Kruskal-Wallis, Wilcoxon, Mann-Whitney y razón de posibilidades, algoritmos de probabilidad bayesianos. Sin embargo, a medida que el número de biomarcadores medidos aumenta, puede resultar generalmente más cómodo usar técnicas más sofisticadas como por ejemplo bosques aleatorios, logística simple, red de Bayes por nombrar algunas.
- 45

- Por ejemplo, se puede adoptar la probabilidad bayesiana. En esta circunstancia se puede usar una validación cruzada de 10 veces para estimar el rendimiento "fuera de la muestra" de los modelos en cuestión. Para cada combinación de biomarcadores en consideración, se pueden dividir los datos aleatoriamente en 10 submuestras, cada una con proporciones similares de sujetos sanos y sujetos en cada etapa de la enfermedad. A su vez, se puede excluir cada submuestra, y construir un modelo logístico usando el 90 % restante de los sujetos. Después, este modelo se puede usar para estimar la probabilidad de cáncer de la submuestra excluida, proporcionando una estimación del rendimiento "fuera de la muestra". Repitiendo esto para las restantes 9 submuestras, se puede estimar el rendimiento "fuera de la muestra" a partir de los datos del estudio por sí mismos. Estas probabilidades predichas fuera de la muestra pueden compararse después con el estado real de la enfermedad de los sujetos para crear una curva de eficacia diagnóstica (ROC), a partir de la que se puede estimar la sensibilidad de validación cruzada a una especificidad del 95 %.
- 50
- 55

- 60 Cada estimación del rendimiento "fuera de la muestra" usando validación cruzada (o cualquier otro procedimiento),

aunque imparcial, tiene un elemento de variabilidad. Por lo tanto una clasificación de modelos (basada en combinaciones de biomarcadores) puede ser indicativa solo del rendimiento relativo de dichos modelos. Sin embargo un conjunto de biomarcadores que es capaz de usarse en un gran número de combinaciones para generar una prueba de diagnóstico como se demostró mediante las evaluaciones de rendimiento "fuera de la muestra",
5 contiene dentro de sí mismo, casi con total seguridad, combinaciones de biomarcadores que soportarán la evaluación repetida.

Muchas combinaciones diferentes pueden calificar como pruebas de diagnóstico que puede resultar útiles y rentables y tener una sensibilidad aceptable para una especificidad dada. Como ejemplo considere los cinco
10 biomarcadores: IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK y DKK-3. Un modelo de discriminación de sujetos con cáncer a partir de controles sanos puede ser como sigue:

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_{IL8} C_{IL8} + \beta_{IGFBP2} C_{IGFBP2} + \beta_{MAC2BP} C_{MAC2BP} + \beta_{M2PK} C_{M2PK} + \beta_{DKK3} C_{DKK3}$$

15 Aquí p representa la probabilidad de que una persona tenga cáncer colorrectal. Cada C_i es el logaritmo de concentración del biomarcador i en el plasma (o suero) de una persona. Cada beta (β) es un coeficiente aplicado a dicho biomarcador en las unidades de concentración en las que se mide - β_0 es "valor inicial" o "intersección". Este modelo lógico lineal es común a todos los resultados presentados en esta invención, pero está lejos de ser la única
20 forma en la que una combinación de concentraciones de biomarcadores puede modelarse para predecir la probabilidad de cáncer.

Otros algoritmos no lineales o lineales que pueden ser igualmente aplicables incluyen bosque aleatorio, ANOVA, prueba t, análisis Fisher, máquinas de vectores de soporte, modelos lineales de datos de la micromatriz (LIMMA) y/o análisis de importancia de datos de micromatrices (SAM), Primero mejor, algoritmo voraz por pasos, Naive Bayes,
25 selección lineal prospectiva, búsqueda dispersa, análisis discriminante lineal (LDA), regresión logística por pasos, característica operativa del receptor y árboles de clasificación (CT).

Por lo tanto, a luz de las enseñanzas de la presente especificación, el experto en la materia apreciará que la sensibilidad y especificidad de una prueba de diagnóstico de cáncer colorrectal se puede modular para seleccionar
30 una combinación diferente de biomarcadores como se describe en esta invención

Sistemas basados en el conocimiento

Será evidente a partir de la discusión en esta invención que el software y el hardware informático basado en el
35 conocimiento para implementar un algoritmo forma también parte de la presente divulgación. Dichos software y/o hardware informáticos serán útiles para realizar un procedimiento de diagnóstico o detección de cáncer colorrectal según la invención. Por lo tanto, la presente descripción divulga también el software o hardware programado para implementar un algoritmo que procese datos obtenidos mediante la realización del presente procedimiento de la invención mediante un análisis multivariado para proporcionar una puntuación de la enfermedad y proporcionar
40 permitir un diagnóstico o detección del cáncer colorrectal y/o determinar la progresión o estado de un cáncer colorrectal o determinar si ha progresado o no el cáncer colorrectal o determinar si el sujeto está respondiendo o no al tratamiento del cáncer colorrectal de acuerdo con los resultados de la puntuación de la enfermedad en comparación con los valores predeterminados.

45 En un ejemplo, un procedimiento de la invención se puede usar en la arquitectura o plataformas basadas en el conocimiento existente asociadas con los servicios de patología. Por ejemplo, los resultados de un procedimiento descrito en esta invención se transmiten mediante una red de comunicaciones (p. ej. Internet) hasta un sistema de procesamiento en el que se almacena un algoritmo y se usa para generar un valor de probabilidad posterior predicho que se traduce a la puntuación de la probabilidad de la enfermedad o riesgo de recurrencia o metástasis o
50 capacidad de respuesta a un tratamiento que después se reenvía a un usuario final en la forma de un informe de diagnóstico o predictivo.

El procedimiento de la invención puede, por lo tanto, estar en forma de un kit o sistema basado en ordenador que comprende los reactivos necesarios para detectar la concentración de biomarcadores y el hardware y/o software
55 informático para facilitar la determinación y la transmisión de los informes a un médico.

El ensayo de la presente invención permite la integración en arquitectura de patología o sistemas de plataforma existentes o recién desarrollados. Por ejemplo, la presente invención contempla un procedimiento para permitir a un

usuario determinar el estado de un sujeto con respecto al cáncer colorrectal, incluyendo el procedimiento:

- (a) la recepción de datos en forma de niveles, al menos tres biomarcadores seleccionados de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1 en una muestra obtenida fácilmente,
- 5 opcionalmente en combinación con otro marcador de cáncer colorrectal;
- (b) el procesamiento de datos del sujeto mediante análisis multivariados (por ejemplo, análisis de regresión) para proporcionar una puntuación de la enfermedad;
- (c) la determinación del estado del sujeto de acuerdo con los resultados de la puntuación de la enfermedad en comparación con los valores predeterminados; y
- 10 (d) la transferencia de una indicación del estado del sujeto al usuario mediante la referencia de la red de comunicaciones al análisis multivariable que incluye un algoritmo que realiza la función de análisis multivariable.

En una forma de realización, el procedimiento para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal de la invención puede realizarse tomando una muestra de sangre de un paciente y determinando la presencia y/o el nivel de uno o
 15 más biomarcadores como se describe en esta invención. Si lo desea, las mediciones pueden realizarse, por ejemplo, en un biochip por lo que se puede usar un solo análisis para medir la presencia y/o el nivel de múltiples biomarcadores. Los resultados de este análisis se pueden introducir después en un programa informático que los somete a un análisis de regresión lineal. El ordenador también puede contener la información como para controlar los valores o intervalos esperados, o el médico, enfermera, administrador médico o el médico en medicina general
 20 puede introducir dichos datos. Este análisis puede además proporcionar una puntuación o probabilidad de tener cáncer colorrectal. Si se realiza una segunda prueba al paciente, el análisis de regresión puede indicar un cambio en la puntuación, por lo tanto indicar que la enfermedad del paciente ha evolucionado o empeorado.

Otros aspectos de la descripción son los siguientes:

- 25 1. Un procedimiento para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
 - i) la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos dos biomarcadores seleccionados de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1 en una muestra del sujeto,
 - 30 donde la presencia y/o el nivel de dos biomarcadores son indicativos de cáncer colorrectal.
 - 2. El procedimiento del aspecto 1, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de dos biomarcadores seleccionados de entre M2PK, EpCam, IL-13, DKK-3, IL-8 y IGFBP2.
 - 3. El procedimiento del aspecto 1, o del aspecto 2, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos tres de los biomarcadores.
 - 35 4. El procedimiento del aspecto 3, donde los tres biomarcadores se seleccionan de entre M2PK, EpCam, IL-13, DKK-3, IL-8, IGFBP2, MIP1 β , TGF β 1 y MAC2BP.
 - 5. El procedimiento del aspecto 4, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores, donde los tres biomarcadores son:
 - i) DKK-3, M2PK, y IGFBP2;
 - 40 ii) M2PK, IGFBP2, y EpCAM;
 - iii) M2PK, MIP1 β , y TGF β 1; o
 - iv) IL-8, IL-13, y MAC2BP.
 - 6. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de la expresión de al menos cuatro de los biomarcadores.
 - 45 7. El procedimiento del aspecto 6, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de cuatro biomarcadores, donde los cuatro biomarcadores son:
 - i) DKK-3, M2PK, MAC2BP, y IGFBP2;
 - ii) IL-8, IL-13, MAC2BP, y EpCam;
 - iii) DKK3, M2PK, TGF β 1, y TIMP-1;
 - 50 iv) M2PK, MIP1 β , IL-13, y TIMP-1; o
 - v) IL-8, MAC2BP, IGFBP2, y EpCam.
 - 8. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos nueve de los biomarcadores.
 - 9. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación
 55 de la presencia y/o el nivel de al menos seis de los biomarcadores.
 - 10. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos siete de los biomarcadores.
 - 11. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos ocho de los biomarcadores.
 - 60 12. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación

de la presencia y/o el nivel de al menos nueve de los biomarcadores.

13. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de al menos diez de los biomarcadores.
- 5 14. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende la detección de la presencia y/o el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado de entre IGF-I, IGF-II, IGF-BP2, Anfirregulina, VEGFA, VEGFD, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, ENA-78, MCP-1, MIP-1 β , IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-1 β , IL-4, IL-8, IL-6, MAC2BP, piruvato cinasa M2 tumoral, M65, OPN, DKK-3, EpCam, TGF β -1, y VEGFpan.
- 10 15. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 50 %.
16. El procedimiento del aspecto 15, donde el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 66 %.
17. El procedimiento del aspecto 16, donde el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 77 %.
- 15 18. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento diagnostica o detecta la Etapa A de Dukes del cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 50 % y una especificidad de al menos el 95 %.
19. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento diagnostica o detecta la Etapa A de Dukes del cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 60 % y una especificidad de al menos
- 20 el 80 %.
20. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento diagnostica o detecta la Etapa A de Dukes del cáncer colorrectal con una sensibilidad de al menos el 50 % y una especificidad de al menos el 90 %.
21. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende poner en contacto
- 25 la muestra con al menos un compuesto que une un polipéptido biomarcador.
22. El procedimiento del aspecto 21, donde el compuesto se marca detectablemente.
23. El procedimiento del aspecto 21 o del aspecto 22, donde el compuesto es un anticuerpo.
24. El procedimiento de cualquiera de los aspectos del 21 al 23, donde el compuesto está unido a un soporte sólido.
25. El procedimiento de cualquiera de los aspectos del 1 al 20, donde los biomarcadores son polinucleótidos.
- 30 26. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde el procedimiento comprende:
- i) la determinación de la presencia y/o el nivel de los biomarcadores en la muestra del sujeto; y
- ii) la comparación de la presencia y/o el nivel de los biomarcadores con un control, donde una presencia y/o el nivel en la muestra que sea distinta a la del control son indicativos de cáncer colorrectal.
27. El procedimiento de cualquiera de los aspectos anteriores, donde la muestra comprende sangre, plasma, suero,
- 35 orina, plaquetas, magacariocitos o heces.
28. Un procedimiento de tratamiento que comprende:
- (i) el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal de acuerdo con el procedimiento de la invención; y
- (ii) la administración o recomendación de un tratamiento terapéutico para el tratamiento del cáncer colorrectal.
29. Un procedimiento para monitorizar la eficacia del tratamiento del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo
- 40 el procedimiento el tratamiento del sujeto contra el cáncer y después la detección de la presencia y/o el nivel de al menos dos biomarcadores seleccionados de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1 en una muestra del sujeto, donde una ausencia de y/o reducción en el nivel de expresión de los polipéptidos después del tratamiento al compararlos antes del tratamiento son indicativos de la eficacia del tratamiento.
- 45 30. Una matriz de al menos dos compuestos para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal, donde cada uno de los compuestos se une a un polipéptido biomarcador seleccionado de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP, M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1.
31. Un kit para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el kit dos compuestos que se unen cada uno a diferentes polipéptidos biomarcadores seleccionados de entre IL-8, IGFBP2, MAC2BP,
- 50 M2PK, IL-13, DKK-3, EpCam, MIP1 β , TGF β 1, y TIMP-1.

EJEMPLOS

Materiales y procedimientos

55

Muestras de paciente

Se tomó y procesó una recolección de muestras de plasma y suero a partir de una cohorte de pacientes con cáncer colorrectal (Etapas A-D de Dukes) que se estaban tratando en varios hospitales.

60

También se recogió y procesó sangre de un grupo de aproximadamente 50 voluntarios sanos de aproximadamente 65 años de edad y de un grupo de 15 sobre la edad de 50.

Se realizaron cuatro estudios separados con biomarcadores ligeramente diferentes. El Estudio 1 examinó 52 muestras de cáncer y 50 de controles, el Estudio 2 examinó 55 muestras de cáncer y 53 de controles, el Estudio 3 y el 4 examinaron a 96 muestras de cáncer y 50 de controles. En los estudios 2, 3 y 4 los pacientes fueron emparejados por edad y sexo en las Etapas de Dukes, véase la Tabla 2 para las estadísticas de resumen.

Tabla 2. Características de voluntarios normales y pacientes con cáncer colorrectal usadas en los estudios 2, 3 y 4.

	Controles n= 50	Cáncer n= 96
Sexo		
hombre	25	48
mujer	25	48
Edad media (años)	68	68
Etapas de Dukes		
A		22
B		30
C		30
D		14
Lugar del tumor		
colon		73
recto		17
desconocido		6
Proximal (incluye ciego, ascendente, flexura hepática y colon transversal)		43
Distal (incluye flexión esplénica, descendente, sigmoide y recto)		47

10

Análisis de biomarcadores

Los análisis de biomarcadores se hicieron con kits comerciales y anticuerpos extraídos (DSL, R&D Duoset, Calbiotech, Millipore, Abnova, Genway, Peviva, Schebo, Bender) y usando ensayos ELISA Luminex.

15

Evaluación estadística y modelado de biomarcadores por paneles

Los resultados de cada ensayo se analizaron usando los paquetes de software de estadística Prism y "R". El rendimiento individual de los marcadores se evaluó usando la prueba t Mann-Whitney no paramétrica y se generaron curvas de eficacia diagnóstica (ROC) individuales.

20

La regresión logística y las estrategias de modelado relacionadas se usaron para encontrar las combinaciones de biomarcadores que mejor separaron controles y pacientes con cáncer colorrectal.

25 Se realizaron cuatro estudios separados con las mismas muestras/alícuotas. Los resultados de cada uno se dan a continuación.

Resultados del Estudio 1, 2 y 3

30 Los biomarcadores elegidos para medirse en el Estudio 1 y 2 y 3 se enumeran en la Tabla 3. Los biomarcadores en negrita son aquellos identificados como prometedores en cada estudio (es decir, fueron significativamente diferentes en las muestras de cáncer colorrectal frente a control y/o se identificaron en paneles de biomarcadores combinados que distinguían el cáncer colorrectal de los controles).

35

Tabla 3. Biomarcadores analizados en los estudios.

Estudio 1	Estudio 2	Estudio 3
IGF-I	IGF-BP2	IGF-BP2 (DSL)
IGF-II	IGF-II	IGF-II
IGF-BP2	IGF-BP3	IFNg
IGF-BP3	Her2	TNFa
BTC	VegFA	IL-10

Anfirregulina	VegFC	IL-6
VegFA	VegFD	GM-CSF
VegFC	TIMP-1	IL-12
VegFD	TIMP-2	IL-13
MMP-2	MMP-1	IL-8
MMP-7	MMP-2	IL-4
MMP-9	MMP-3	IL-2
TIMP-2	MMP-7	IL-1b
Her2	MMP-8	MMP-1
	MMP-12	MMP-2
	MMP-13	MMP-3
	ENA-78	MMP-7
	MCP-1	MMP-8
	MIP-1beta	MMP-9
	GM-CSF	ENA-78
	IFN-gamma	MIP-1alpha
	IL-10	MIP-1beta
	IL-12	MCP-1
	IL-13	Mac-2BP
	IL-1beta	TIMP-1
	IL-2	TIMP-2
	IL-4	Gro-alpha
	IL-6	Piruvato cinasa M2 tumoral
	IL-8	M30-apoptosentido
	TNF-alpha	M65
	Cripto	Trail-R2
		P-cadherina
		OPN
		Dkk-3
		EpCam
		TGFbeta1
		REG IV
		CEA
		DcR3
		CA19.9
		Anfirregulina
		CEACAM6
		VegFA pan
		VegFA165b
		Espondina-2
		survivina

Evaluación estadística y modelado de biomarcadores por paneles

- 5 Para encontrar las combinaciones de biomarcadores que mejor separaron los controles y los pacientes con cáncer colorrectal, se adoptó la selección de variable posterior con criterios de información bayesiana para penalizar la probabilidad logarítmica para impedir la sobrevaloración. Para estimar el rendimiento probable del panel de biomarcadores en un conjunto de datos independiente, se usó la validación cruzada "N-veces" o "dejar uno fuera". En este procedimiento se excluyó una observación cada vez mientras que todo el algoritmo de ajuste del modelo se aplicó a las observaciones restantes.
- 10 Después, el modelo resultante se usó para estimar la probabilidad de que la observación excluida es un caso. Esto se repitió para cada observación en el conjunto de datos. De esta forma, cada observación a su vez actuó como una prueba independiente del algoritmo de creación de modelos. El conjunto de datos resultante constituido por casos y controles, cada uno con una probabilidad de caso "independientemente prevista", se puede comparar después con
- 15 el modelo original. La capacidad de elegir entre numerosos biomarcadores y ponderarlos apropiadamente permite una estrategia de búsqueda que optimiza el rendimiento en las regiones de interés en la curva ROC. El coste por la baja especificidad es un gran número de colonoscopias innecesarias.

En el estudio 3, se evaluaron 48 biomarcadores potenciales para seleccionar un panel candidato de biomarcadores de cáncer colorrectal, aleatorización por bloques en las placas para evitar el sesgo. De esta lista de 48 solo 42 mostraron niveles medibles. Individualmente 14 biomarcadores mostraron diferencias significativas entre los controles y CRC como evaluó la prueba t; (IGFII, IGFBP2, IL-8, IL-6, MMP-1, MMP-7, s90/Mac2BP, M2PK, EpCam, TIMP-1 (suero y plasma), M65, OPN, TGFβ1, VEGFpan. Como se esperaba, ninguno de ellos tuvo la suficiente sensibilidad o especificidad para ser útil como biomarcador por sí mismo (no mostrado). Sin embargo, usando una variedad de estrategias de modelado, incluyendo el uso de valores logarítmicos, se demostró que varios paneles distintos de biomarcadores superaban el rendimiento de FOBT especialmente para etapas tempranas y tardías de la enfermedad.

La Figura 1 muestra los resultados de un panel de 7 biomarcadores que incluyó IL8 (suero), IL-13 (suero), EpCAM (plasma), M2PK (plasma), IGFBP2 (suero) y Mac2BP (suero) y al que se realizó la validación cruzada para predecir su rendimiento en muestras independientes.

Este modelo de 7 biomarcadores que se describió al menos conceptualmente como

$$\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_{IL8} C_{IL8} + \beta_{IGFBP2} C_{IGFBP2} + \beta_{MAC2BP} C_{MAC2BP} + \beta_{M2PK} C_{M2PK} + \beta_{DKK3} C_{DKK3}$$

proporcionó buen rendimiento a alta especificidad y resultó robusto bajo validación cruzada. Los coeficientes estimados para obtener el mejor modelo para esta combinación de biomarcadores en plasma se enumeran en la Tabla 4. Las estadísticas del rendimiento se proporcionan en la Tabla 5. Este rendimiento supera al citado para FOBT (65,8 % de sensibilidad, 95 % de especificidad) (Morikawa y cols., 2005).

Tabla 4. Coeficientes para la combinación de biomarcador.

Biomarcador	Medido en	Unidades de concentración	Coficiente
Intersección	ND	ND	-37,74
IL-8	suero	pg/ml	1,07
IL-13	suero	pg/ml	-0,28
EpCAM	plasma	pg/ml	-0,33
M2PK	plasma	unidades/ml	1,40
IGFBP2	suero	ng/ml	1,99
Mac2BP	suero	ng/ml	2,39
MIP1beta	Suero	Pg/ml	-1,19

Tabla 5. Rendimiento del modelo de 7 biomarcadores y validación cruzada.

	Estimación del modelo	Validación cruzada
Área debajo de la curva ROC (AUC)	0,91	0,86
Sensibilidad a una especificidad del 80 %	0,84	0,78
Sensibilidad a una especificidad del 90 %	0,81	0,69

Este modelo también se aplicó separadamente en pacientes para cada etapa de cáncer colorrectal (Etapas A, B, C, D de Dukes) y demostró que funcionaba igual de bien en cada etapa (Figura 2). Los AUC fueron de 0,88-0,93 y fueron casi igualmente buenos en discriminar todas las etapas del cáncer colorrectal. El modelo demostró la sensibilidad más alta del 90 % a una especificidad del 90 % para la Etapa de y la sensibilidad más baja al 73 % a una especificidad del 90 % para la Etapa B (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento del modelo por la Etapa de Dukes

	Etapa A	Etapa B	Etapa C	Etapa C
Área debajo de la curva ROC (AUC)	0,89	0,88	0,93	0,91
Sensibilidad a una especificidad del 80 %	0,82	0,77	0,90	0,93
Sensibilidad a una especificidad del 90 %	0,77	0,73	0,90	0,86

Estudio 4 (también conocido como "Estudio 3 recalculado")

En el estudio 4, se recalcularon 10 biomarcadores en la misma cohorte que en el Estudio 3. Se recogió sangre de 96 pacientes con cáncer colorrectal y de 50 sujetos normales (los controles). En este estudio la atención se centró en

10 biomarcadores, a saber IGFBP2, IL8, IL13, Mac2BP, M2PK, Dkk3, EpCam, TGFbeta1, TIMP-1, MIP1beta. Los ensayos se realizaron como se describe previamente. Los niveles de suero y plasma de cada uno de los biomarcadores se midieron y compararon con los valores de control.

- 5 Cuando se modeló en pares (dos marcadores), un total de 5 pares (de un máximo de 45 combinaciones seleccionadas de entre la lista anterior de 10 biomarcadores) pueden demostrar que producen una sensibilidad superior al 52 % a una especificidad del 95 %. Véase la Tabla 7 y la Figura 3.

Tabla 7. Pares de biomarcadores que producen pruebas de diagnóstico precoz útiles en validación cruzada.

Biomarcador 1	Biomarcador 2	Sensibilidad estimada en la muestra (prueba) a una especificidad del 95 %	Sensibilidad estimada fuera de la muestra (validación cruzada) a una especificidad del 95 %
M2PK	EpCAM	58,3 %	58,3 %
M2PK	IL13	56,3 %	57,3 %
Dkk3	M2PK	55,2 %	55,2 %
M2PK	IL8	60,4 %	54,2 %
M2PK	IGFBP2	58,3 %	52,1 %

10

Al analizar combinaciones de tres a diez de los biomarcadores nominados, hay 968 combinaciones posibles. Las 968 combinaciones de entre 3 y 10 biomarcadores consisten en 120 combinaciones de 3 marcadores; 210 combinaciones de 4 marcadores; 252 combinaciones de 5 marcadores; 210 combinaciones de 6 marcadores; 120 combinaciones de 7 marcadores; 45 combinaciones de 8 marcadores; 10 combinaciones de 9 marcadores y la combinación única que incluye los 10 biomarcadores. Cuando se modelaron utilizando un modelo logístico lineal y se probaron después mediante validación cruzada de 10 veces, aproximadamente la mitad de las 968 combinaciones tenían una sensibilidad del 50 % con una especificidad del 95 %, véase la Figura 4 que muestra los resultados para una combinación de tres biomarcadores. Más de la mitad de esas combinaciones tendría una especificidad de 90 % y una sensibilidad del 50 %.

20

La Figura 5 muestra todas las 485 curvas ROC fuera de la muestra (validación cruzada de 10 veces) estimadas para las pruebas de un total posible de 968 modelos basados en todas las combinaciones posibles de 3 a 10 de los biomarcadores. Tenga en cuenta que los segmentos individuales de las 485 curvas ROC son coincidentes, a causa de que cada segmento horizontal representa un control y cada segmento vertical un caso. En este caso, el 50,1 % de las combinaciones han superado el 50 % de la sensibilidad, el 95 % de la especificidad, el mejor rendimiento "fuera de la muestra" estimado es una sensibilidad del 76 % a una especificidad del 95 %. La repetición de la validación cruzada seleccionará un conjunto diferente de modelos, la sensibilidad de cualquier combinación puede variar en un 10 % a una especificidad del 95 % debido al muestreo aleatorio, pero resultará en una proporción similar de "pruebas de diagnóstico precoz útiles" útiles. La validación precisa de modelos individuales requiere de experimentos repetidos y tamaños de muestras mayores.

30

La Figura 6 muestra cuántas de las 485 combinaciones con el 50 % de sensibilidad, el 95 % de especificidad, incluye cualquier marcado dado. Como máximo, 432 de las combinaciones "útiles" incluyen M2PK. Como mínimo, 227 de las combinaciones "útiles" incluyen MIP1beta. Esta alta representación de los 10 biomarcadores en modelos "útiles" muestra la unidad y autocomplementación de la selección de estos 10 biomarcadores.

35

La Figura 7 a la Figura 11 demuestran algunos de los resultados de este último estudio (Estudio 4) para las combinaciones de 5 a 7 biomarcadores, incluyendo un modelo donde las muestras son de agrupaciones de plasma o de suero. La Figura 11 demuestra la validez de la elección de los tres biomarcadores (DKK-3, M2PK y IGFBP2) a etapas diferentes de la progresión de la enfermedad. Los datos indican que en la Etapa A si se usan los tres biomarcadores, la prueba aún logrará una importante sensibilidad (64 %) a una especificidad del 95 % lo que es comparable a la sensibilidad lograda en la etapa tardía de la enfermedad (79 %). Que es el panel de los tres biomarcadores que recogerá etapas tempranas de la enfermedad permitiendo la detección temprana.

40

Las listas de las Tablas de la 8 a la 16 resultan de varias combinaciones de varios conjuntos de paneles de biomarcadores. Dependiendo de la regresión lineal que se usa, así como del control de cohorte y otros factores como por ejemplo la derivación de la muestra y la técnica del kit de ensayo, puede haber variaciones en las figuras actuales o en el orden de los biomarcadores. Independientemente, muchas de estas combinaciones lograrán buena selectividad a altas especificidades como para ser útiles para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal a cualquier etapa de la progresión de la enfermedad.

50

Tabla 8. Combinación de tres biomarcadores en suero que iguala o supera el 50 % de sensibilidad a una especificidad del 95 %.

BM1	BM2	BM3	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
Dkk3	M2PK	IGFBP2	72,9 %	70,8 %
Dkk3	M2PK	IL8	62,5 %	61,5 %
M2PK	IL13	IGFBP2	65,6 %	61,5 %
M2PK	IGFBP2	EpCAM	63,5 %	61,5 %
M2PK	IL8	IGFBP2	65,6 %	60,4 %
M2PK	IL8	IL13	61,5 %	58,3 %
M2PK	MIP1beta	IL13	55,2 %	57,3 %
M2PK	IL8	Mac2BP	59,4 %	57,3 %
M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	57,3 %	56,3 %
M2PK	IL8	EpCAM	64,6 %	56,3 %
Dkk3	M2PK	IL13	59,4 %	55,2 %
Dkk3	M2PK	EpCAM	56,3 %	55,2 %
M2PK	MIP1beta	EpCAM	59,4 %	55,2 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	58,3 %	55,2 %
M2PK	IL8	TIMP1	57,3 %	55,2 %
TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	54,2 %	55,2 %
M2PK	Mac2BP	IGFBP2	58,3 %	54,2 %
Dkk3	IL8	Mac2BP	55,2 %	53,1 %
M2PK	MIP1beta	Mac2BP	52,1 %	53,1 %
M2PK	MIP1beta	IGFBP2	57,3 %	53,1 %
M2PK	TIMP1	EpCAM	58,3 %	53,1 %
M2PK	MIP1beta	IL8	56,3 %	52,1 %
M2PK	IL13	TIMP1	58,3 %	52,1 %
Dkk3	M2PK	Mac2BP	57,3 %	51,0 %
Dkk3	M2PK	TIMP1	55,2 %	51,0 %
M2PK	IL13	Mac2BP	58,3 %	51,0 %
M2PK	TGFbeta1	IGFBP2	52,1 %	51,0 %
M2PK	TGFbeta1	TIMP1	57,3 %	51,0 %
M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	56,3 %	50,0 %
IL8	IL13	Mac2BP	61,5 %	50,0 %
IL8	TGFbeta1	Mac2BP	53,1 %	50,0 %
M2PK	MIP1beta	TIMP1	49,0 %	49,0 %
M2PK	TGFbeta1	EpCAM	49,0 %	47,9 %
IL8	IL13	IGFBP2	49,0 %	47,9 %
IL8	Mac2BP	IGFBP2	57,3 %	47,9 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	55,2 %	46,9 %
TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	46,9 %	46,9 %
Dkk3	Mac2BP	IGFBP2	49,0 %	45,8 %
M2PK	IL13	EpCAM	50,0 %	45,8 %
IL8	Mac2BP	TIMP1	52,1 %	45,8 %
IL13	Mac2BP	IGFBP2	45,8 %	44,8 %
Dkk3	IL8	TGFbeta1	41,7 %	43,8 %
MIP1beta	IL8	Mac2BP	42,7 %	43,8 %
MIP1beta	IL8	EpCAM	44,8 %	43,8 %
IL8	TGFbeta1	EpCAM	46,9 %	43,8 %
Dkk3	IL8	EpCAM	51,0 %	42,7 %
IL8	IGFBP2	EpCAM	43,8 %	42,7 %
M2PK	Mac2BP	TIMP1	51,0 %	41,7 %

Tabla 9. Combinación de cuatro biomarcadores incluyendo DKK-3 en suero que iguala o supera el 50 % de sensibilidad a una especificidad del 95 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
Dkk3	M2PK	Mac2BP	IGFBP2	68,8 %	69,8 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	71,9 %	68,8 %
Dkk3	M2PK	IL8	EpCAM	70,8 %	67,7 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	67,7 %	65,6 %
Dkk3	M2PK	IL8	IGFBP2	69,8 %	64,6 %
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	69,8 %	63,5 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	65,6 %	61,5 %
Dkk3	M2PK	IL8	TIMP1	68,8 %	61,5 %
Dkk3	M2PK	IL13	IGFBP2	63,5 %	61,5 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	59,4 %	60,4 %
Dkk3	M2PK	IGFBP2	EpCAM	68,8 %	60,4 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IGFBP2	69,8 %	59,4 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	IGFBP2	61,5 %	59,4 %
Dkk3	M2PK	IL13	Mac2BP	56,3 %	58,3 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	TIMP1	65,6 %	58,3 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	57,3 %	57,3 %
Dkk3	IL8	Mac2BP	IGFBP2	62,5 %	56,3 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	65,6 %	55,2 %
Dkk3	M2PK	IL13	TIMP1	57,3 %	55,2 %
Dkk3	M2PK	Mac2BP	TIMP1	57,3 %	55,2 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	Mac2BP	57,3 %	54,2 %
Dkk3	IL8	IL13	Mac2BP	61,5 %	54,2 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	EpCAM	61,5 %	53,1 %
Dkk3	M2PK	IGFBP2	TIMP1	61,5 %	53,1 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	63,5 %	52,1 %
Dkk3	M2PK	TIMP1	EpCAM	56,3 %	52,1 %
Dkk3	IL8	Mac2BP	TIMP1	57,3 %	52,1 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	EpCAM	60,4 %	51,0 %
Dkk3	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	59,4 %	51,0 %

Tabla 10. Combinación de cuatro biomarcadores incluyendo M2PK en suero que iguala o supera el 50 % de sensibilidad a una especificidad del 95 %.

5

BM1	BM2	BM3	BM4	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
M2PK	IL8	Mac2BP	TIMP1	63,5 %	65,6 %
M2PK	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	70,8 %	65,6 %
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	66,7 %	64,6 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	65,6 %	64,6 %
M2PK	MIP1beta	IL13	IGFBP2	64,6 %	62,5 %
M2PK	IL8	IL13	TIMP1	64,6 %	62,5 %
M2PK	IL8	IL13	EpCAM	65,6 %	62,5 %
M2PK	IL13	Mac2BP	IGFBP2	69,8 %	62,5 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	63,5 %	61,5 %
M2PK	IL8	Mac2BP	EpCAM	65,6 %	61,5 %
M2PK	IL13	IGFBP2	EpCAM	69,8 %	61,5 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	58,3 %	58,3 %
M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	67,7 %	58,3 %
M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	61,5 %	58,3 %
M2PK	IL8	IGFBP2	EpCAM	64,6 %	58,3 %
M2PK	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	64,6 %	58,3 %

M2PK	IL13	TGFbeta1	EpCAM	62,5 %	58,3 %
M2PK	IL13	IGFBP2	TIMP1	62,5 %	58,3 %
M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	62,5 %	58,3 %
M2PK	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	61,5 %	58,3 %
M2PK	MIP1beta	IL13	TIMP1	57,3 %	57,3 %
M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	TIMP1	58,3 %	57,3 %
M2PK	MIP1beta	IGFBP2	EpCAM	65,6 %	57,3 %
M2PK	MIP1beta	IL8	Mac2BP	54,2 %	56,3 %
M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	64,6 %	56,3 %
M2PK	IL8	TIMP1	EpCAM	62,5 %	56,3 %
M2PK	IL13	Mac2BP	TIMP1	57,3 %	56,3 %
M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	60,4 %	56,3 %
M2PK	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	63,5 %	56,3 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TIMP1	57,3 %	55,2 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	TIMP1	57,3 %	55,2 %
M2PK	MIP1beta	IL13	Mac2BP	57,3 %	54,2 %
M2PK	MIP1beta	IL8	EpCAM	62,5 %	53,1 %
M2PK	MIP1beta	TIMP1	EpCAM	59,4 %	52,1 %
M2PK	IL13	TGFbeta1	TIMP1	64,6 %	52,1 %
M2PK	IL13	Mac2BP	EpCAM	51,0 %	52,1 %
M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	57,3 %	51,0 %
M2PK	MIP1beta	Mac2BP	IGFBP2	57,3 %	51,0 %
M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	52,1 %	51,0 %
M2PK	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	59,4 %	51,0 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IGFBP2	52,1 %	50,0 %
M2PK	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	52,1 %	50,0 %
M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	Mac2BP	63,5 %	49,0 %
M2PK	MIP1beta	IL13	EpCAM	50,0 %	47,9 %
M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	EpCAM	53,1 %	47,9 %
M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	60,4 %	46,9 %
M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	IGFBP2	49,0 %	44,8 %

Tabla 11. Combinación de cinco biomarcadores en suero que iguala o supera el 50 % de sensibilidad a una especificidad del 95 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	74,0 %	70,8 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TIMP1	71,9 %	70,8 %
M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	69,8 %	70,8 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	71,9 %	69,8 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IGFBP2	EpCAM	71,9 %	69,8 %
Dkk3	M2PK	IL8	IGFBP2	EpCAM	78,1 %	69,8 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	68,8 %	69,8 %
M2PK	MIP1beta	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	69,8 %	68,8 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	70,8 %	67,7 %
Dkk3	M2PK	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	70,8 %	67,7 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	66,7 %	67,7 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	70,8 %	66,7 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	68,8 %	66,7 %
Dkk3	M2PK	IL13	IGFBP2	EpCAM	66,7 %	66,7 %
M2PK	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	71,9 %	66,7 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	69,8 %	65,6 %
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	TIMP1	67,7 %	65,6 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	66,7 %	65,6 %

M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	71,9 %	65,6 %
M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	66,7 %	65,6 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	64,6 %	65,6 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	69,8 %	65,6 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IGFBP2	66,7 %	64,6 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	Mac2BP	IGFBP2	70,8 %	64,6 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TIMP1	65,6 %	64,6 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	65,6 %	64,6 %
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	EpCAM	76,0 %	64,6 %
M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	EpCAM	72,9 %	64,6 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	64,6 %	64,6 %
M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	71,9 %	64,6 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	TIMP1	68,8 %	63,5 %
Dkk3	M2PK	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	67,7 %	63,5 %
M2PK	MIP1beta	IL13	IGFBP2	EpCAM	67,7 %	63,5 %
M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	66,7 %	63,5 %
M2PK	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	70,8 %	63,5 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	69,8 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	EpCAM	65,6 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	IGFBP2	70,8 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	69,8 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	68,8 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	68,8 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	67,7 %	62,5 %
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	64,6 %	62,5 %
M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	66,7 %	62,5 %
M2PK	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	68,8 %	62,5 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	IGFBP2	63,5 %	61,5 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	TIMP1	64,6 %	61,5 %

Tabla 12. Combinación de siete biomarcadores en suero que iguala o supera el 50 % de sensibilidad a una especificidad del 95 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
Dkk3	M2PK	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	78 %	56 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	76 %	64 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	73 %	69 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	72 %	68 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	71 %	62 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	70 %	64 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	70 %	67 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	69 %	66 %
M2PK	MIP1beta	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	69 %	55 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	67 %	68 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	67 %	64 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	65 %	59 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	65 %	52 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	64 %	56 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	64 %	57 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	64 %	50 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	63 %	55 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	63 %	58 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	63 %	53 %

Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	63 %	59 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	63 %	59 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	62 %	51 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	62 %	56 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	62 %	39 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	62 %	43 %
Dkk3	M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	62 %	50 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	62 %	55 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	62 %	47 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	62 %	56 %
M2PK	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	62 %	49 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	60 %	56 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	60 %	55 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	60 %	53 %

Tabla 13. Siete combinaciones de biomarcadores con sensibilidad entre el 60 % y el 52 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	EpCAM	59 %	54 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	IGFBP2	EpCAM	59 %	52 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	59 %	52 %
Dkk3	M2PK	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	59 %	47 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	59 %	52 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	59 %	45 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	58 %	41 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	58 %	50 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58 %	55 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	58 %	50 %
Dkk3	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	58 %	52 %
M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58 %	52 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	57 %	49 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TIMP1	EpCAM	57 %	48 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	57 %	51 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	57 %	46 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57 %	49 %
Dkk3	M2PK	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57 %	49 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	57 %	50 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	57 %	43 %
M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57 %	52 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	56 %	47 %
Dkk3	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	56 %	48 %
MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	56 %	54 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	55 %	35 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	55 %	44 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	55 %	35 %
Dkk3	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	55 %	50 %
Dkk3	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	55 %	54 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	EpCAM	54 %	49 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	54 %	39 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54 %	42 %
Dkk3	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54 %	51 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	54 %	37 %

M2PK	MIP1beta	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54 %	41 %
M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	54 %	43 %
MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	54 %	42 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	53 %	52 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	53 %	42 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	53 %	34 %
M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	53 %	45 %
	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	53 %	51 %
MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	53 %	39 %
MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	53 %	51 %

Tabla 14. Siete combinaciones de biomarcadores con sensibilidad <53 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	Sensibilidad de la prueba a una especificidad del 95 %	Sensibilidad de la validación cruzada a una especificidad del 95 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	52 %	42 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	51 %	41 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	51 %	35 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	51 %	38 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	51 %	30 %
M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	51 %	37 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	TIMP1	50 %	48 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	50 %	41 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	50 %	42 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	50 %	49 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	50 %	35 %
MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	50 %	39 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	49 %	44 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	49 %	33 %
M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	49 %	43 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48 %	43 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48 %	38 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48 %	40 %
Dkk3	MIP1beta	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	48 %	31 %
Dkk3	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48 %	38 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	48 %	33 %
M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	48 %	45 %
M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	48 %	37 %
M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	47 %	41 %
IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	47 %	40 %
Dkk3	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	46 %	42 %
M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	46 %	30 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	45 %	37 %
Dkk3	M2PK	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	45 %	41 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	EpCAM	45 %	33 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	44 %	40 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	44 %	43 %
Dkk3	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	44 %	43 %
MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	44 %	28 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	43 %	31 %
Dkk3	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	42 %	40 %
MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	42 %	31 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	EpCAM	41 %	23 %

Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	TIMP1	EpCAM	41 %	33 %
Dkk3	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	41 %	41 %
Dkk3	MIP1beta	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	41 %	39 %
Dkk3	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	41 %	37 %
M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	32 %	27 %

Tabla 15. Sensibilidad de nueve combinaciones de biomarcadores en muestras de plasma y suero a una especificidad del 95 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7	BM8	BM9	Plasma	Suero
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	73 %	77 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	EpCAM	73 %	77 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	TIMP1	EpCAM	54 %	72 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58 %	74 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	74 %	70 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	71 %	78 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	57 %	72 %
Dkk3	M2PK	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	67 %	76 %
Dkk3	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	54 %	55 %
M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP	IGFBP2	TIMP1	EpCAM	58 %	69 %

5 Tabla 16. Sensibilidad de diez combinaciones de biomarcadores en muestras de plasma y suero a una especificidad del 95 %.

BM1	BM2	BM3	BM4	BM5	BM6	BM7 BM8	B9 BM1o	Plasma	Suero
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP IGFBP2	TIP1 EpCAM	70 %	55 %
Dkk3	M2PK	MIP1beta	IL8	IL13	TGFbeta1	Mac2BP IGFBP2	TIP1 EpCAM	73 %	68 %

Los expertos en la materia apreciarán que se pueden realizar numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención como se muestra en las formas de realización específicas sin alejarse del alcance de la invención descrita en líneas generales. Las presentes formas de realización tienen, por lo tanto, que se consideradas en conjunto como ilustrativas y no restrictivas.

La presente aplicación reivindica la prioridad del documento AU 2010903140.

15 Cualquier discusión de los documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se hayan incluido en la presente memoria descriptiva tiene solo el propósito de proporcionar un contexto para la presenta invención. No debe tomarse como una admisión de que alguno o todos estos asuntos forman parte del estado de la técnica anterior o eran conocimientos generales comunes en el campo relevante para la presente invención tal como existía antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

20

REFERENCIAS

- Anderson and Hunter (2006) Mol Cell Proteomics, 5:573-588.
- Cancer in Australia, an overview (2008) AIHW (Australian Institute of Health and Welfare) & AACR (Australasian Association of Cancer Registries), Cancer series no. 46, Cat. No: CAN 42, Canberra: AIHW.
- 25 Etzioni y cols. (2003) Nat Rev Cancer, 3:243-252.
- Hundt y cols. (2007) Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 16:1935-1953.
- Kimmel (1987) Methods Enzymol, 152:507-511.
- Kwoh y cols. (1989) Proc Natl Acad Sci USA. 86:1173-1177.
- 30 Levin (2004) Gastroenterology, 127:1841-1844.
- Lieberman (2010) Gastroenterology, 138:2115-2126.
- Morikawa y cols. (2005) Gastroenterology, 129:422-428.
- Notomi y cols. (2000) Nucleic Acids Res. 28:E63.
- Tonus (2006) World J Gastroenterol, 12:7007-7011.
- 35 Wahl and Berger (1987) Methods Enzymol, 152:399-407.
- Walker y cols. (1992a) Proc Natl Acad Sci USA. 89:392-396.
- Walker y cols. (1992b) Nucleic Acids Res. 20:1691-1696.

<110> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation

<120> Diagnostic for colorectal cancer

<130> B10093A CA/CS

<150> AU 2010903140

5 <151> 2010-07-14

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 99

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Thr Ser Lys Leu Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Phe Leu Ile Ser
1      5      10
Ala Ala Leu Cys Glu Gly Ala Val Leu Pro Arg Ser Ala Lys Glu Leu
20
Arg Cys Gln Cys Ile Lys Thr Tyr Ser Lys Pro Phe His Pro Lys Phe
35      40      45
Ile Lys Glu Leu Arg Val Ile Glu Ser Gly Pro His Cys Ala Asn Thr
50      55      60
Glu Ile Ile Val Lys Leu Ser Asp Gly Arg Glu Leu Cys Leu Asp Pro
65      70      75      80
Lys Glu Asn Trp Val Gln Arg Val Val Glu Lys Phe Leu Lys Arg Ala
85      90      95
Glu Asn Ser
    
```

<210> 2

15 <211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Leu Pro Arg Val Gly Cys Pro Ala Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro
1      5      10
Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ser Gly
20
Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ala Glu Val Leu Phe Arg Cys Pro Pro Cys
35      40      45
Thr Pro Glu Arg Leu Ala Ala Cys Gly Pro Pro Pro Val Ala Pro Pro
50      55      60
Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Arg Met Pro Cys Ala Glu
65      70      75      80
Leu Val Arg Glu Pro Gly Cys Gly Cys Cys Ser Val Cys Ala Arg Leu
85      90      95
Glu Gly Glu Ala Cys Gly Val Tyr Thr Pro Arg Cys Gly Gln Gly Leu
100     105     110
Arg Cys Tyr Pro His Pro Gly Ser Glu Leu Pro Leu Gln Ala Leu Val
115     120     125
Met Gly Glu Gly Thr Cys Glu Lys Arg Arg Asp Ala Glu Tyr Gly Ala
130     135     140
Ser Pro Glu Gln Val Ala Asp Asn Gly Asp Asp His Ser Glu Gly Gly
    
```

20

ES 2 653 646 T3

```

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

```

<210> 3

<211> 585

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

Met Thr Pro Pro Arg Leu Phe Trp Val Trp Leu Leu Val Ala Gly Thr
1              5              10              15
Gln Gly Val Asn Asp Gly Asp Met Arg Leu Ala Asp Gly Gly Ala Thr
              20              25              30
Asn Gln Gly Arg Val Glu Ile Phe Tyr Arg Gly Gln Trp Gly Thr Val
              35              40              45
Cys Asp Asn Leu Trp Asp Leu Thr Asp Ala Ser Val Val Cys Arg Ala
50              55              60
Leu Gly Phe Glu Asn Ala Thr Gln Ala Leu Gly Arg Ala Ala Phe Gly
65              70              75              80
Gln Gly Ser Gly Pro Ile Met Leu Asp Glu Val Gln Cys Thr Gly Thr
              85              90              95
Glu Ala Ser Leu Ala Asp Cys Lys Ser Leu Gly Trp Leu Lys Ser Asn
              100              105              110
Cys Arg His Glu Arg Asp Ala Gly Val Val Cys Thr Asn Glu Thr Arg
              115              120              125
Ser Thr His Thr Leu Asp Leu Ser Arg Glu Leu Ser Glu Ala Leu Gly
130              135              140
Gln Ile Phe Asp Ser Gln Arg Gly Cys Asp Leu Ser Ile Ser Val Asn
145              150              155              160
Val Gln Gly Glu Asp Ala Leu Gly Phe Cys Gly His Thr Val Ile Leu
              165              170              175
Thr Ala Asn Leu Glu Ala Gln Ala Leu Trp Lys Glu Pro Gly Ser Asn
              180              185              190
Val Thr Met Ser Val Asp Ala Glu Cys Val Pro Met Val Arg Asp Leu
              195              200              205
Leu Arg Tyr Phe Tyr Ser Arg Arg Ile Asp Ile Thr Leu Ser Ser Val
210              215              220
Lys Cys Phe His Lys Leu Ala Ser Ala Tyr Gly Ala Arg Gln Leu Gln
225              230              235              240
Gly Tyr Cys Ala Ser Leu Phe Ala Ile Leu Leu Pro Gln Asp Pro Ser
              245              250              255

```

ES 2 653 646 T3

Phe Gln Met Pro Leu Asp Leu Tyr Ala Tyr Ala Val Ala Thr Gly Asp
 260 265 270
 Ala Leu Leu Glu Lys Leu Cys Leu Gln Phe Leu Ala Trp Asn Phe Glu
 275 280 285
 Ala Leu Thr Gln Ala Glu Ala Trp Pro Ser Val Pro Thr Asp Leu Leu
 290 295 300
 Gln Leu Leu Leu Pro Arg Ser Asp Leu Ala Val Pro Ser Glu Leu Ala
 305 310 315 320
 Leu Leu Lys Ala Val Asp Thr Trp Ser Trp Gly Glu Arg Ala Ser His
 325 330 335
 Glu Glu Val Glu Gly Leu Val Glu Lys Ile Arg Phe Pro Met Met Leu
 340 345 350
 Pro Glu Glu Leu Phe Glu Leu Gln Phe Asn Leu Ser Leu Tyr Trp Ser
 355 360 365
 His Glu Ala Leu Phe Gln Lys Lys Thr Leu Gln Ala Leu Glu Phe His
 370 375 380
 Thr Val Pro Phe Gln Leu Ala Arg Tyr Lys Gly Leu Asn Leu Thr
 385 390 395 400
 Glu Asp Thr Tyr Lys Pro Arg Ile Tyr Thr Ser Pro Thr Trp Ser Ala
 405 410 415
 Phe Val Thr Asp Ser Ser Trp Ser Ala Arg Lys Ser Gln Leu Val Tyr
 420 425 430
 Gln Ser Arg Arg Gly Pro Leu Val Lys Tyr Ser Ser Asp Tyr Phe Gln
 435 440 445
 Ala Pro Ser Asp Tyr Arg Tyr Tyr Pro Tyr Gln Ser Phe Gln Thr Pro
 450 455 460
 Gln His Pro Ser Phe Leu Phe Gln Asp Lys Arg Val Ser Trp Ser Leu
 465 470 475 480
 Val Tyr Leu Pro Thr Ile Gln Ser Cys Trp Asn Tyr Gly Phe Ser Cys
 485 490 495
 Ser Ser Asp Glu Leu Pro Val Leu Gly Leu Thr Lys Ser Gly Gly Ser
 500 505 510
 Asp Arg Thr Ile Ala Tyr Glu Asn Lys Ala Leu Met Leu Cys Glu Gly
 515 520 525
 Leu Phe Val Ala Asp Val Thr Asp Phe Glu Gly Trp Lys Ala Ala Ile
 530 535 540
 Pro Ser Ala Leu Asp Thr Asn Ser Ser Lys Ser Thr Ser Ser Phe Pro
 545 550 555 560
 Cys Pro Ala Gly His Phe Asn Gly Phe Arg Thr Val Ile Arg Pro Phe
 565 570 575
 Tyr Leu Thr Asn Ser Ser Gly Val Asp
 580 585

<210> 4
 <211> 531
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Met Ser Lys Pro His Ser Glu Ala Gly Thr Ala Phe Ile Gln Thr Gln
 1 5 10 15
 Gln Leu His Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu His Met Cys Arg
 20 25 30
 Leu Asp Ile Asp Ser Pro Pro Ile Thr Ala Arg Asn Thr Gly Ile Ile
 35 40 45
 Cys Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Glu Thr Leu Lys Glu Met
 50 55 60
 Ile Lys Ser Gly Met Asn Val Ala Arg Leu Asn Phe Ser His Gly Thr
 65 70 75 80
 His Glu Tyr His Ala Glu Thr Ile Lys Asn Val Arg Thr Ala Thr Glu
 85 90 95
 Ser Phe Ala Ser Asp Pro Ile Leu Tyr Arg Pro Val Ala Val Ala Leu

ES 2 653 646 T3

				100					105					110	
Asp	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Ile	Arg	Thr	Gly	Leu	Ile	Lys	Gly	Ser	Gly
		115					120					125			
Thr	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Lys	Lys	Gly	Ala	Thr	Leu	Lys	Ile	Thr	Leu
		130				135					140				
Asp	Asn	Ala	Tyr	Met	Glu	Lys	Cys	Asp	Glu	Asn	Ile	Leu	Trp	Leu	Asp
145					150					155					160
Tyr	Lys	Asn	Ile	Cys	Lys	Val	Val	Glu	Val	Gly	Ser	Lys	Ile	Tyr	Val
				165					170						175
Asp	Asp	Gly	Leu	Ile	Ser	Leu	Gln	Val	Lys	Gln	Lys	Gly	Ala	Asp	Phe
			180					185					190		
Leu	Val	Thr	Glu	Val	Glu	Asn	Gly	Gly	Ser	Leu	Gly	Ser	Lys	Lys	Gly
		195					200					205			
Val	Asn	Leu	Pro	Gly	Ala	Ala	Val	Asp	Leu	Pro	Ala	Val	Ser	Glu	Lys
		210				215					220				
Asp	Ile	Gln	Asp	Leu	Lys	Phe	Gly	Val	Glu	Gln	Asp	Val	Asp	Met	Val
225					230						235				240
Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Arg	Lys	Ala	Ser	Asp	Val	His	Glu	Val	Arg	Lys
				245					250					255	
Val	Leu	Gly	Glu	Lys	Gly	Lys	Asn	Ile	Lys	Ile	Ile	Ser	Lys	Ile	Glu
			260					265					270		
Asn	His	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Phe	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Ala	Ser	Asp
		275					280					285			
Gly	Ile	Met	Val	Ala	Arg	Gly	Asp	Leu	Gly	Ile	Glu	Ile	Pro	Ala	Glu
		290				295					300				
Lys	Val	Phe	Leu	Ala	Gln	Lys	Met	Met	Ile	Gly	Arg	Cys	Asn	Arg	Ala
305					310						315				320
Gly	Lys	Pro	Val	Ile	Cys	Ala	Thr	Gln	Met	Leu	Glu	Ser	Met	Ile	Lys
				325					330					335	
Lys	Pro	Arg	Pro	Thr	Arg	Ala	Glu	Gly	Ser	Asp	Val	Ala	Asn	Ala	Val
			340					345					350		
Leu	Asp	Gly	Ala	Asp	Cys	Ile	Met	Leu	Ser	Gly	Glu	Thr	Ala	Lys	Gly
		355					360					365			
Asp	Tyr	Pro	Leu	Glu	Ala	Val	Arg	Met	Gln	His	Leu	Ile	Ala	Arg	Glu
		370				375					380				
Ala	Glu	Ala	Ala	Ile	Tyr	His	Leu	Gln	Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Arg	Arg
385					390					395					400
Leu	Ala	Pro	Ile	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Thr	Ala	Val	Gly	Ala
				405					410					415	
Val	Glu	Ala	Ser	Phe	Lys	Cys	Cys	Ser	Gly	Ala	Ile	Ile	Val	Leu	Thr
			420					425					430		
Lys	Ser	Gly	Arg	Ser	Ala	His	Gln	Val	Ala	Arg	Tyr	Arg	Pro	Arg	Ala
		435					440					445			
Pro	Ile	Ile	Ala	Val	Thr	Arg	Asn	Pro	Gln	Thr	Ala	Arg	Gln	Ala	His
		450				455					460				
Leu	Tyr	Arg	Gly	Ile	Phe	Pro	Val	Leu	Cys	Lys	Asp	Pro	Val	Gln	Glu
465					470					475					480
Ala	Trp	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Leu	Arg	Val	Asn	Phe	Ala	Met	Asn	Val
				485					490					495	
Gly	Lys	Ala	Arg	Gly	Phe	Phe	Lys	Lys	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Val	Leu
			500					505					510		
Thr	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Ser	Gly	Phe	Thr	Asn	Thr	Met	Arg	Val	Val
		515					520					525			
Pro	Val	Pro													
		530													

<210> 5

<211> 531

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 653 646 T3

Met Ser Lys Pro His Ser Glu Ala Gly Thr Ala Phe Ile Gln Thr Gln
1 5 10 15
Gln Leu His Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu His Met Cys Arg
20 25 30
Leu Asp Ile Asp Ser Pro Pro Ile Thr Ala Arg Asn Thr Gly Ile Ile
35 40 45
Cys Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Glu Thr Leu Lys Glu Met
50 55 60
Ile Lys Ser Gly Met Asn Val Ala Arg Leu Asn Phe Ser His Gly Thr
65 70 75 80
His Glu Tyr His Ala Glu Thr Ile Lys Asn Val Arg Thr Ala Thr Glu
85 90 95
Ser Phe Ala Ser Asp Pro Ile Leu Tyr Arg Pro Val Ala Val Ala Leu
100 105 110
Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Leu Ile Lys Gly Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Glu Val Glu Leu Lys Lys Gly Ala Thr Leu Lys Ile Thr Leu
130 135 140
Asp Asn Ala Tyr Met Glu Lys Cys Asp Glu Asn Ile Leu Trp Leu Asp
145 150 155 160
Tyr Lys Asn Ile Cys Lys Val Val Glu Val Gly Ser Lys Ile Tyr Val
165 170 175
Asp Asp Gly Leu Ile Ser Leu Gln Val Lys Gln Lys Gly Ala Asp Phe
180 185 190
Leu Val Thr Glu Val Glu Asn Gly Gly Ser Leu Gly Ser Lys Lys Gly
195 200 205
Val Asn Leu Pro Gly Ala Ala Val Asp Leu Pro Ala Val Ser Glu Lys
210 215 220
Asp Ile Gln Asp Leu Lys Phe Gly Val Glu Gln Asp Val Asp Met Val
225 230 235 240
Phe Ala Ser Phe Ile Arg Lys Ala Ser Asp Val His Glu Val Arg Lys
245 250 255
Val Leu Gly Glu Lys Gly Lys Asn Ile Lys Ile Ile Ser Lys Ile Glu
260 265 270
Asn His Glu Gly Val Arg Arg Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp
275 280 285
Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Ile Glu Ile Pro Ala Glu
290 295 300
Lys Val Phe Leu Ala Gln Lys Met Met Ile Gly Arg Cys Asn Arg Ala
305 310 315 320
Gly Lys Pro Val Ile Cys Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met Ile Lys
325 330 335
Lys Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Gly Ser Asp Val Ala Asn Ala Val
340 345 350
Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly
355 360 365
Asp Tyr Pro Leu Glu Ala Val Arg Met Gln His Leu Ile Ala Arg Glu
370 375 380
Ala Glu Ala Ala Met Phe His Arg Lys Leu Phe Glu Glu Leu Val Arg
385 390 395 400
Ala Ser Ser His Ser Thr Asp Leu Met Glu Ala Met Ala Met Gly Ser
405 410 415
Val Glu Ala Ser Tyr Lys Cys Leu Ala Ala Ala Leu Ile Val Leu Thr
420 425 430
Glu Ser Gly Arg Ser Ala His Gln Val Ala Arg Tyr Arg Pro Arg Ala
435 440 445
Pro Ile Ile Ala Val Thr Arg Asn Pro Gln Thr Ala Arg Gln Ala His
450 455 460
Leu Tyr Arg Gly Ile Phe Pro Val Leu Cys Lys Asp Pro Val Gln Glu
465 470 475 480
Ala Trp Ala Glu Asp Val Asp Leu Arg Val Asn Phe Ala Met Asn Val
485 490 495
Gly Lys Ala Arg Gly Phe Phe Lys Lys Gly Asp Val Val Ile Val Leu

ES 2 653 646 T3

500 505 510
 Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Thr Met Arg Val Val
 515 520 525
 Pro Val Pro
 530

<210> 6
 <211> 531
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens
 <400> 6

Met Ser Lys Pro His Ser Glu Ala Gly Thr Ala Phe Ile Gln Thr Gln
 1 5 10 15
 Gln Leu His Ala Ala Met Ala Asp Thr Phe Leu Glu His Met Cys Arg
 20 25 30
 Leu Asp Ile Asp Ser Pro Pro Ile Thr Ala Arg Asn Thr Gly Ile Ile
 35 40 45
 Cys Thr Ile Gly Pro Ala Ser Arg Ser Val Glu Thr Leu Lys Glu Met
 50 55 60
 Ile Lys Ser Gly Met Asn Val Ala Arg Leu Asn Phe Ser His Gly Thr
 65 70 75 80
 His Glu Tyr His Ala Glu Thr Ile Lys Asn Val Arg Thr Ala Thr Glu
 85 90 95
 Ser Phe Ala Ser Asp Pro Ile Leu Tyr Arg Pro Val Ala Val Ala Leu
 100 105 110
 Asp Thr Lys Gly Pro Glu Ile Arg Thr Gly Leu Ile Lys Gly Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Glu Val Glu Leu Lys Lys Gly Ala Thr Leu Lys Ile Thr Leu
 130 135 140
 Asp Asn Ala Tyr Met Glu Lys Cys Asp Glu Asn Ile Leu Trp Leu Asp
 145 150 155 160
 Tyr Lys Asn Ile Cys Lys Val Val Glu Val Gly Ser Lys Ile Tyr Val
 165 170 175
 Asp Asp Gly Leu Ile Ser Leu Gln Val Lys Gln Lys Gly Ala Asp Phe
 180 185 190
 Leu Val Thr Glu Val Glu Asn Gly Gly Ser Leu Gly Ser Lys Lys Gly
 195 200 205
 Val Asn Leu Pro Gly Ala Ala Val Asp Leu Pro Ala Val Ser Glu Lys
 210 215 220
 Asp Ile Gln Asp Leu Lys Phe Gly Val Glu Gln Asp Val Asp Met Val
 225 230 235 240
 Phe Ala Ser Phe Ile Arg Lys Ala Ser Asp Val His Glu Val Arg Lys
 245 250 255
 Val Leu Gly Glu Lys Gly Lys Asn Ile Lys Ile Ile Ser Lys Ile Glu
 260 265 270
 Asn His Glu Gly Val Arg Arg Phe Asp Glu Ile Leu Glu Ala Ser Asp
 275 280 285
 Gly Ile Met Val Ala Arg Gly Asp Leu Gly Ile Glu Ile Pro Ala Glu
 290 295 300
 Lys Val Phe Leu Ala Gln Lys Met Met Ile Gly Arg Cys Asn Arg Ala
 305 310 315 320
 Gly Lys Pro Val Ile Cys Ala Thr Gln Met Leu Glu Ser Met Ile Lys
 325 330 335
 Lys Pro Arg Pro Thr Arg Ala Glu Gly Ser Asp Val Ala Asn Ala Val
 340 345 350
 Leu Asp Gly Ala Asp Cys Ile Met Leu Ser Gly Glu Thr Ala Lys Gly
 355 360 365
 Asp Tyr Pro Leu Glu Ala Val Arg Met Gln His Leu Ile Ala Arg Glu
 370 375 380
 Ala Glu Ala Ala Met Phe His Arg Lys Leu Phe Glu Glu Leu Val Arg
 385 390 395 400

ES 2 653 646 T3

Ala Ser Ser His Ser Thr Asp Leu Met Glu Ala Met Ala Met Gly Ser
 405 410 415
 Val Glu Ala Ser Tyr Lys Cys Leu Ala Ala Leu Ile Val Leu Thr
 420 425 430
 Glu Ser Gly Arg Ser Ala His Gln Val Ala Arg Tyr Arg Pro Arg Ala
 435 440 445
 Pro Ile Ile Ala Val Thr Arg Asn Pro Gln Thr Ala Arg Gln Ala His
 450 455 460
 Leu Tyr Arg Gly Ile Phe Pro Val Leu Cys Lys Asp Pro Val Gln Glu
 465 470 475 480
 Ala Trp Ala Glu Asp Val Asp Leu Arg Val Asn Phe Ala Met Asn Val
 485 490 495
 Gly Lys Ala Arg Gly Phe Phe Lys Lys Gly Asp Val Val Ile Val Leu
 500 505 510
 Thr Gly Trp Arg Pro Gly Ser Gly Phe Thr Asn Thr Met Arg Val Val
 515 520 525
 Pro Val Pro
 530

<210> 7

<211> 146

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
 20 25 30
 Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu
 35 40 45
 Glu Leu Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly
 50 55 60
 Ser Met Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Gly Met Tyr Cys Ala Ala
 65 70 75 80
 Leu Glu Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr
 85 90 95
 Gln Arg Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln
 100 105 110
 Phe Ser Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe
 115 120 125
 Val Lys Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Gln
 130 135 140
 Phe Asn
 145

<210> 8

<211> 350

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
 35 40 45
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys

ES 2 653 646 T3

```

65          70          75          80
Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
      85          90
Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
      100        105
Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
      115        120
Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
      130        135        140
His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
      145        150        155        160
Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
      165        170
Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
      180        185        190
Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
      195        200
Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
      210        215        220
Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
      225        230        235        240
Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
      245        250        255
Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
      260        265        270
Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
      275        280        285
Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
      290        295        300
Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
      305        310        315        320
Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Arg Glu
      325        330        335
Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
      340        345        350

```

<210> 9
 <211> 350
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 9

```

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1          5          10          15
Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
      20          25          30
Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
      35          40          45
Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Lys
      50          55          60
Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Lys
      65          70          75          80
Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
      85          90
Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
      100        105
Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
      115        120
Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
      130        135        140
His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
      145        150        155        160

```

ES 2 653 646 T3

Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
 165 170 175
 Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
 180 185 190
 Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
 195 200 205
 Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
 210 215 220
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
 245 250 255
 Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
 260 265 270
 Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
 275 280 285
 Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
 290 295 300
 Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
 305 310 315 320
 Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Arg Glu
 325 330 335
 Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
 340 345 350

<210> 10
 <211> 350
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens
 <400> 10

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
 35 40 45
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
 85 90 95
 Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
 100 105 110
 Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
 115 120 125
 Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
 130 135 140
 His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
 145 150 155 160
 Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
 165 170 175
 Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
 180 185 190
 Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
 195 200 205
 Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
 210 215 220
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu

ES 2 653 646 T3

				245					250				255				
Glu	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Asp	Arg	Cys	Pro	Cys	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu		
			260					265					270				
Cys	Gln	Pro	His	Ser	His	Ser	Leu	Val	Tyr	Val	Cys	Lys	Pro	Thr	Phe		
		275					280					285					
Val	Gly	Ser	Arg	Asp	Gln	Asp	Gly	Glu	Ile	Leu	Leu	Pro	Arg	Glu	Val		
	290					295					300						
Pro	Asp	Glu	Tyr	Glu	Val	Gly	Ser	Phe	Met	Glu	Glu	Val	Arg	Gln	Glu		
305				310						315				320			
Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	Met	Ala	Leu	Arg	Glu		
				325					330					335			
Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Glu	Ile				
			340					345					350				

<210> 11

<211> 314

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Met	Ala	Pro	Pro	Gln	Val	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala		
1				5					10				15				
Thr	Ala	Thr	Phe	Ala	Ala	Ala	Gln	Glu	Glu	Cys	Val	Cys	Glu	Asn	Tyr		
			20					25					30				
Lys	Leu	Ala	Val	Asn	Cys	Phe	Val	Asn	Asn	Asn	Arg	Gln	Cys	Gln	Cys		
		35				40						45					
Thr	Ser	Val	Gly	Ala	Gln	Asn	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Lys	Leu	Ala	Ala		
	50				55					60							
Lys	Cys	Leu	Val	Met	Lys	Ala	Glu	Met	Asn	Gly	Ser	Lys	Leu	Gly	Arg		
65				70					75					80			
Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp		
				85				90						95			
Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly		
			100					105					110				
Thr	Ser	Met	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp		
		115				120						125					
Lys	Asp	Thr	Glu	Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile		
	130				135						140						
Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys		
145				150						155					160		
Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu		
				165				170						175			
Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr		
			180					185					190				
Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp		
	195					200						205					
Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser		
	210				215						220						
Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu		
225				230						235				240			
Asp	Leu	Asp	Pro	Gly	Gln	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala		
				245				250					255				
Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Val	Ile		
			260					265					270				
Val	Val	Val	Val	Ile	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Val	Ile		
		275					280					285					
Ser	Arg	Lys	Lys	Arg	Met	Ala	Lys	Tyr	Glu	Lys	Ala	Glu	Ile	Lys	Glu		
	290				295						300						
Met	Gly	Glu	Met	His	Arg	Glu	Leu	Asn	Ala								
305				310													

<210> 12

<211> 92

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

ES 2 653 646 T3

Met Lys Leu Cys Val Thr Val Leu Ser Leu Leu Met Leu Val Ala Ala
 1 5 10 15
 Phe Cys Ser Pro Ala Leu Ser Ala Pro Met Gly Ser Asp Pro Pro Thr
 20 25 30
 Ala Cys Cys Phe Ser Tyr Thr Ala Arg Lys Leu Pro Arg Asn Phe Val
 35 40 45
 Val Asp Tyr Tyr Glu Thr Ser Ser Leu Cys Ser Gln Pro Ala Val Val
 50 55 60
 Phe Gln Thr Lys Arg Ser Lys Gln Val Cys Ala Asp Pro Ser Glu Ser
 65 70 75 80
 Trp Val Gln Glu Tyr Val Tyr Asp Leu Glu Leu Asn
 85 90

<210> 13

<211> 390

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 13

Met Pro Pro Ser Gly Leu Arg Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Trp Leu Leu Val Leu Thr Pro Gly Arg Pro Ala Ala Gly Leu Ser Thr
 20 25 30
 Cys Lys Thr Ile Asp Met Glu Leu Val Lys Arg Lys Arg Ile Glu Ala
 35 40 45
 Ile Arg Gly Gln Ile Leu Ser Lys Leu Arg Leu Ala Ser Pro Pro Ser
 50 55 60
 Gln Gly Glu Val Pro Pro Gly Pro Leu Pro Glu Ala Val Leu Ala Leu
 65 70 80
 Tyr Asn Ser Thr Arg Asp Arg Val Ala Gly Glu Ser Ala Glu Pro Glu
 85 90 95
 Pro Glu Pro Glu Ala Asp Tyr Tyr Ala Lys Glu Val Thr Arg Val Leu
 100 105 110
 Met Val Glu Thr His Asn Glu Ile Tyr Asp Lys Phe Lys Gln Ser Thr
 115 120 125
 His Ser Ile Tyr Met Phe Phe Asn Thr Ser Glu Leu Arg Glu Ala Val
 130 135 140
 Pro Glu Pro Val Leu Leu Ser Arg Ala Glu Leu Arg Leu Leu Arg Leu
 145 150 155 160
 Lys Leu Lys Val Glu Gln His Val Glu Leu Tyr Gln Lys Tyr Ser Asn
 165 170 175
 Asn Ser Trp Arg Tyr Leu Ser Asn Arg Leu Leu Ala Pro Ser Asp Ser
 180 185 190
 Pro Glu Trp Leu Ser Phe Asp Val Thr Gly Val Val Arg Gln Trp Leu
 195 200 205
 Ser Arg Gly Gly Glu Ile Glu Gly Phe Arg Leu Ser Ala His Cys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Ser Arg Asp Asn Thr Leu Gln Val Asp Ile Asn Gly Phe Thr
 225 230 235 240
 Thr Gly Arg Arg Gly Asp Leu Ala Thr Ile His Gly Met Asn Arg Pro
 245 250 255
 Phe Leu Leu Leu Met Ala Thr Pro Leu Glu Arg Ala Gln His Leu Gln
 260 265 270
 Ser Ser Arg His Arg Arg Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser
 275 280 285
 Thr Glu Lys Asn Cys Cys Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys

ES 2 653 646 T3

```

      290                295                300
Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn
305                310                315                320
Phe Cys Leu Gly Pro Cys Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr
      325                330                335
Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala
      340                345                350
Ala Pro Cys Cys Val Pro Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr
      355                360                365
Tyr Val Gly Arg Lys Pro Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val
      370                375                380
Arg Ser Cys Lys Cys Ser
      385                390

```

<210> 14

<211> 207

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 24

```

Met Ala Pro Phe Glu Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu Leu Leu Leu Trp
1                5                10                15
Leu Ile Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro Pro His Pro Gln
      20                25                30
Thr Ala Phe Cys Asn Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala Lys Phe Val Gly
      35                40                45
Thr Pro Glu Val Asn Gln Thr Thr Leu Tyr Gln Arg Tyr Glu Ile Lys
      50                55                60
Met Thr Lys Met Tyr Lys Gly Phe Gln Ala Leu Gly Asp Ala Ala Asp
65                70                75                80
Ile Arg Phe Val Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val Cys Gly Tyr Phe
      85                90                95
His Arg Ser His Asn Arg Ser Glu Glu Phe Leu Ile Ala Gly Lys Leu
      100                105                110
Gln Asp Gly Leu Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe Val Ala Pro Trp
      115                120                125
Asn Ser Leu Ser Leu Ala Gln Arg Arg Gly Phe Thr Lys Thr Tyr Thr
      130                135                140
Val Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Leu Ser Ile Pro Cys
145                150                155                160
Lys Leu Gln Ser Gly Thr His Cys Leu Trp Thr Asp Gln Leu Leu Gln
      165                170                175
Gly Ser Glu Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala Cys Leu Pro Arg
      180                185                190
Glu Pro Gly Leu Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Ser Gln Ile Ala
      195                200                205

```

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el diagnóstico o detección del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:
- 5 i) la determinación de la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores, donde los tres biomarcadores son:
- (a) DKK-3 (dickkopf homólogo 3), M2PK (piruvato cinasa muscular 2), y IGFBP2 (factor de crecimiento similar a la insulina que fija la proteína-2);
- 10 (b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM (molécula de adhesión celular epitelial),
 (c) M2PK, IGFBP2 y IL-13 (interleucina-13); o
 (d) M2PK, IGFBP2 y IL-8 (interleucina-8)
- en una muestra del sujeto,
- 15 donde la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores es indicativo de cáncer colorrectal.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de tres biomarcadores, donde los tres biomarcadores son:
- 20 i) DKK-3, M2PK, y IGFBP2; o
 ii) M2PK, IGFBP2, y EpCAM.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de expresión de cuatro biomarcadores, donde los biomarcadores son:
- 25 (i) DKK-3, M2PK, MAC2BP (proteína que fija MAC2) y IGFBP2;
 (ii) DKK-3, M2PK, IL-8 y IGFBP2;
 (iii) DKK-3, M2PK, IL-13 y IGFBP2;
 30 (iv) DKK-3, M2PK, IGFBP2 y EpCAM;
 (v) DKK-3, M2PK, MIP1beta (proteína inflamatoria de macrófagos 1β) y IGFBP2;
 (vi) DKK-3, M2PK, TGFbeta1 (factor del crecimiento transformante beta 1) y IGFBP2;
 (vii) DKK-3, M2PK, IGFBP2 y TIMP1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas 1);
 (viii) M2PK, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
 35 (ix) M2PK, MIP1beta, IL-13, y IGFBP2;
 (x) M2PK, IL-13, Mac2BP, IGFBP2;
 (xi) M2PK, IL-13, IGFBP2, EpCAM;
 (xii) M2PK, IL-8, IL-13 y IGFBP2;
 (xiii) M2PK, IL-8, MAC2BP, IGFBP2;
 40 (xiv) M2PK, IL-8, IGFBP2, EpCAM;
 (xv) M2PK, IL-13, TGFbeta1 y IGFBP2;
 (xvi) M2PK, IL-13, IGFBP2 y TIMP1;
 (xvii) M2PK, TGFbeta1, IGFBP2 y EpCAM;
 (xviii) M2PK, MIP1beta, IGFBP2 y EpCAM; o
 45 (xix) M2PK, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de expresión de cinco biomarcadores, donde los biomarcadores son:
- 50 (i) M2PK, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
 (ii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IGFBP2 y EpCAM;
 (iii) DKK-3, M2PK, IL-8, IGFBP2 y EpCAM;
 (iv) DKK-3, M2PK, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
 (v) M2PK, MIP1beta, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
 55 (vi) DKK-3, M2PK, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
 (vii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13 y IGFBP2;
 (viii) DKK-3, M2PK, IL-13, TGFbeta1 y IGFBP2;
 (ix) DKK-3, M2PK, IL-13, IGFBP2 y EpCAM;
 (x) M2PK, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
 60 (xi) M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1 y IGFBP2;

- (xii) M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (xiii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8 y IGFBP2;
- (xiv) DKK-3, M2PK, MIP1beta, Mac2BP y IGFBP2;
- (xv) M2PK, IL-8, IL-13, IGFBP2 y EpCAM;
- 5 (xvi) M2PK, IL-8, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (xvii) DKK-3, M2PK, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xviii) M2PK, MIP1beta, IL-13, IGFBP2 y EpCAM;
- (xix) M2PK, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (xx) M2PK, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2 y EpCAM;
- 10 (xxi) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1 y IGFBP2;
- (xxii) DKK-3, M2PK, IL-8, Mac2BP y IGFBP2;
- (xxiii) M2PK, IL-8, IL-13, IGFBP2 y TIMP1;
- (xxiv) M2PK, IL-13, IGFBP2, TIMP1, EpCAM; o
- (xxv) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13 y IGFBP2.

15

5. El procedimiento cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de expresión de siete biomarcadores, donde los biomarcadores son:

- (i) DKK-3, M2PK, IL-8, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- 20 (ii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (iii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (iv) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (v) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (vi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- 25 (vii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (viii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- (ix) M2PK, MIP1beta, IL-8, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (x) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP y IGFBP2;
- (xi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP y IGFBP2;
- 30 (xii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (xiii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2 y TIMP1;
- (xiv) DKK-3, M2PK, IL-8, TGFbeta1, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xv) DKK-3, M2PK, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, y TIMP1;
- (xvi) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- 35 (xvii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, IGFBP2, y EpCAM;
- (xviii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, y IGFBP2;
- (xix) M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (xx) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xxi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- 40 (xxii) DKK3, MIP1beta, IL8, IL13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1,
- (xxiii) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y TIMP1;
- (xxiv) M2PK, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (xxv) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2 y EpCAM;
- (xxvi) DKK-3, M2PK, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM; o
- 45 (xxvii) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 5, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de expresión de nueve biomarcadores, donde los biomarcadores son:

- 50 (i) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y TIP1;
- (ii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2 y EpCAM;
- (iii) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (iv) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (v) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-8, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- 55 (vi) DKK-3, M2PK, MIP1beta, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM;
- (vii) DKK-3, M2PK, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM; o
- (viii) M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el procedimiento comprende la determinación de la presencia y/o el nivel de expresión de diez biomarcadores, donde los biomarcadores son DKK-3,

60

M2PK, MIP1beta, IL-8, IL-13, TGFbeta1, Mac2BP, IGFBP2, TIMP1 y EpCAM.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende la detección de la presencia y/o el nivel de al menos un biomarcador adicional seleccionado de entre IGF-I, IGF-II, IGF-BP2, Anfirregulina, VEGFA, VEGFD, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, TIMP-2, ENA-78, MCP-1, MIP-1β, IFN-γ, IL-10, IL-1β, IL-4, IL-6, MAC2BP, piruvato cinasa M2 tumoral, M65, OPN, DKK-3, TGFβ-1, and VEGFpan.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento diagnostica o detecta el cáncer colorrectal con:
- 10 i) una sensibilidad de al menos el 66 %; o
ii) una sensibilidad de al menos el 77 %.
10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende poner en contacto la muestra con al menos un compuesto que une un polipéptido biomarcador.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, donde el compuesto se marca detectablemente.
12. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el procedimiento comprende:
- 20 i) la determinación de la presencia y/o el nivel de los biomarcadores en la muestra del sujeto; y
ii) la comparación de la presencia y/o el nivel de los biomarcadores con un control, donde una presencia y/o el nivel en la muestra que sea distinta a la del control es indicativo de cáncer colorrectal.
- 25 13. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra es sangre, plasma, suero, orina, plaquetas, magacariocitos o heces.
14. El uso de una matriz de compuestos para el diagnóstico o detección *in vitro* del cáncer colorrectal, donde cada uno de los compuestos se une a un polipéptido biomarcador distinto seleccionado de entre
- 30 (a) DKK-3, M2PK, y IGFBP2; o
(b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM.
15. El uso de un kit para el diagnóstico o detección *in vitro* del cáncer colorrectal en un sujeto, comprendiendo el kit compuestos que cada uno se une a un polipéptido biomarcador distinto seleccionado de entre
- 35 (a) DKK-3, M2PK, y IGFBP2; o
(b) M2PK, IGFBP2, y EpCAM.

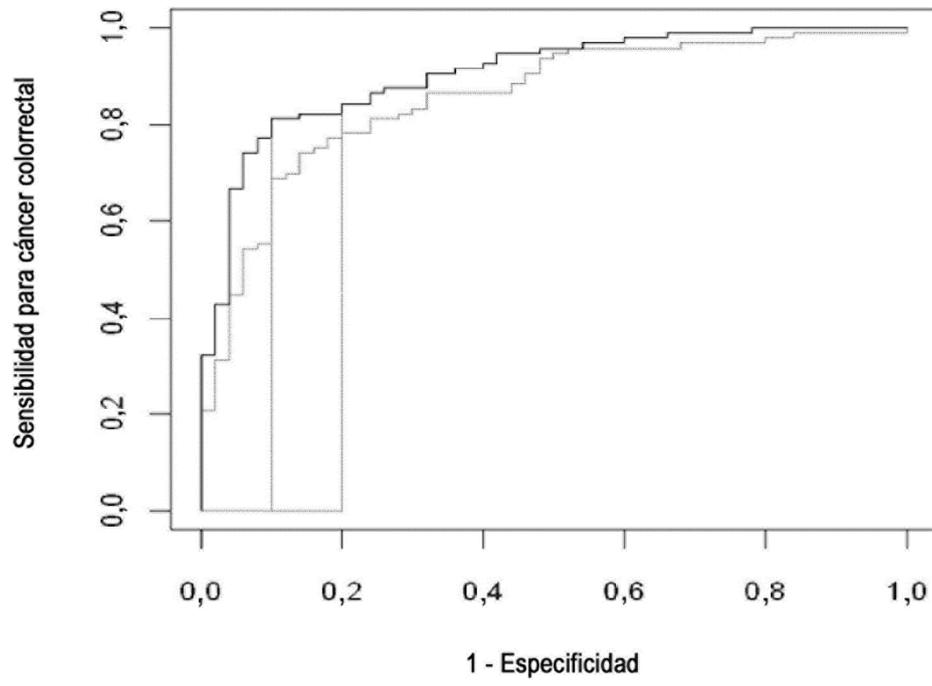


Figura 1

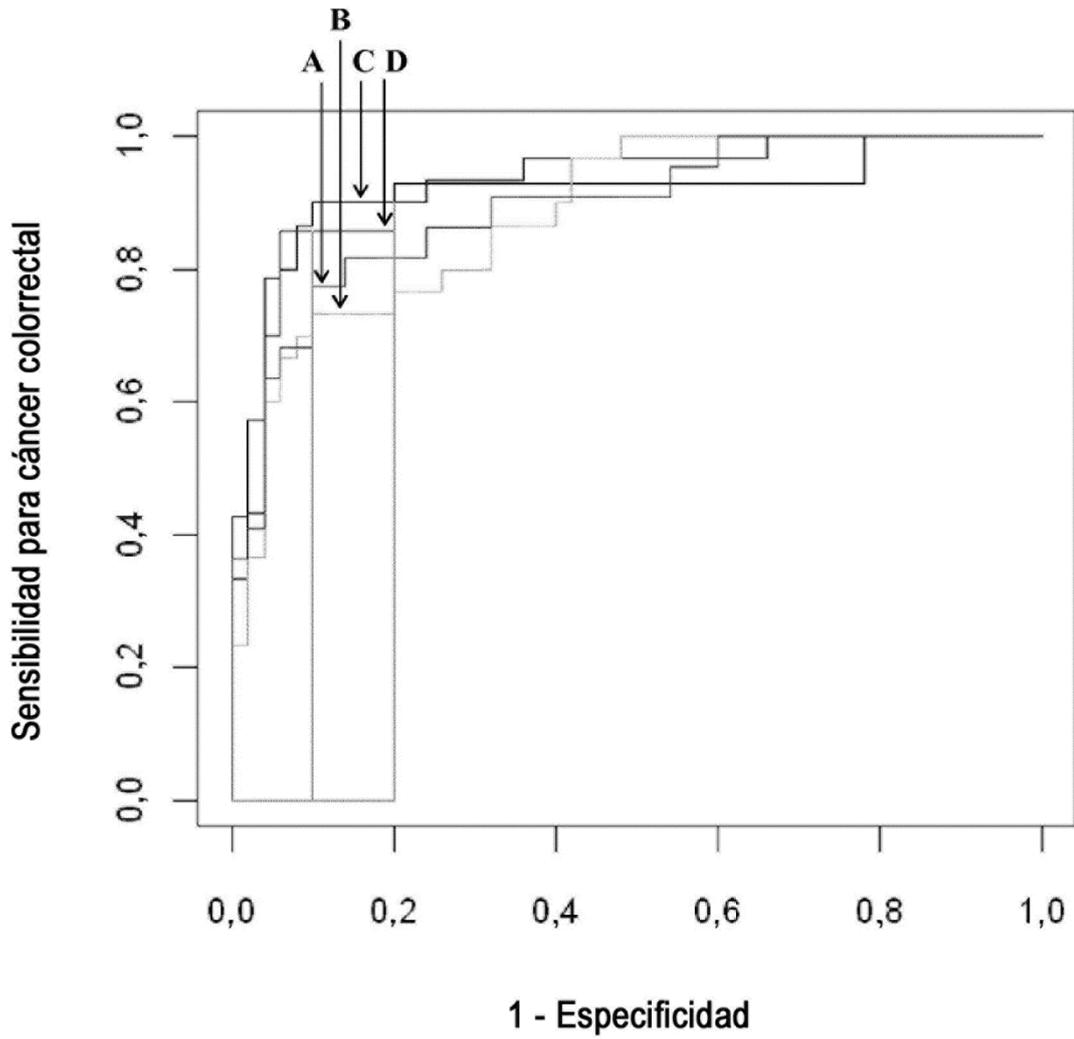


Figura 2

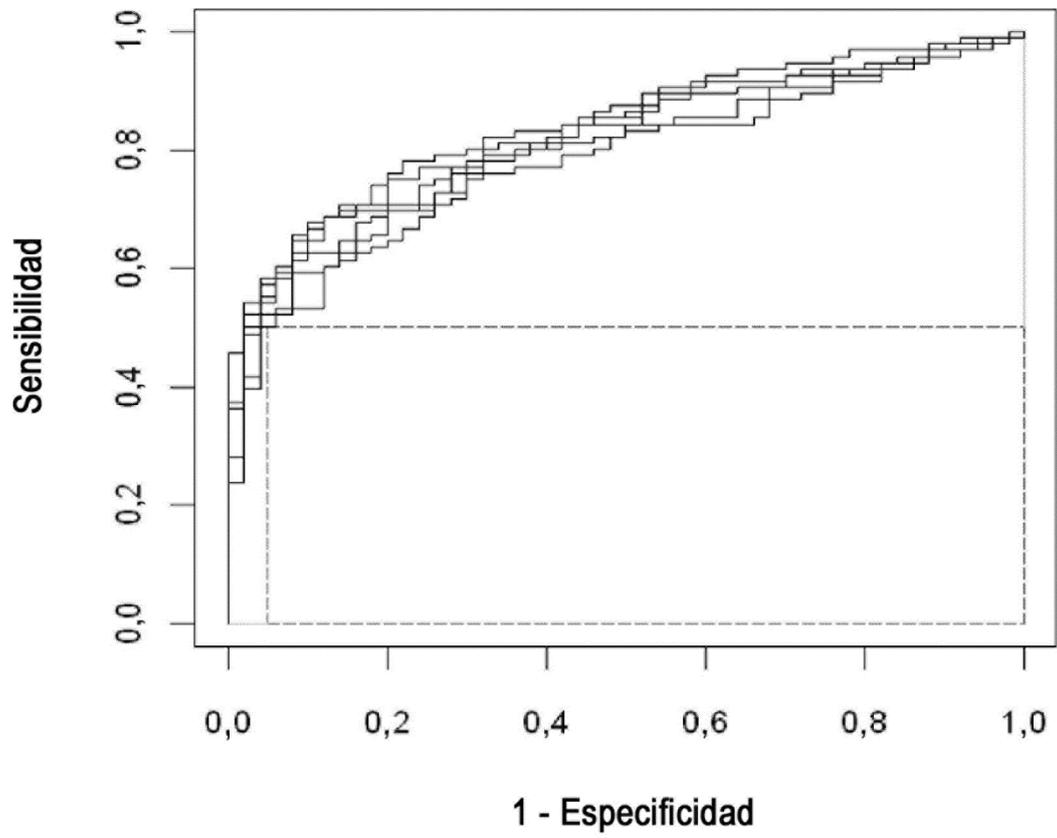


Figura 3

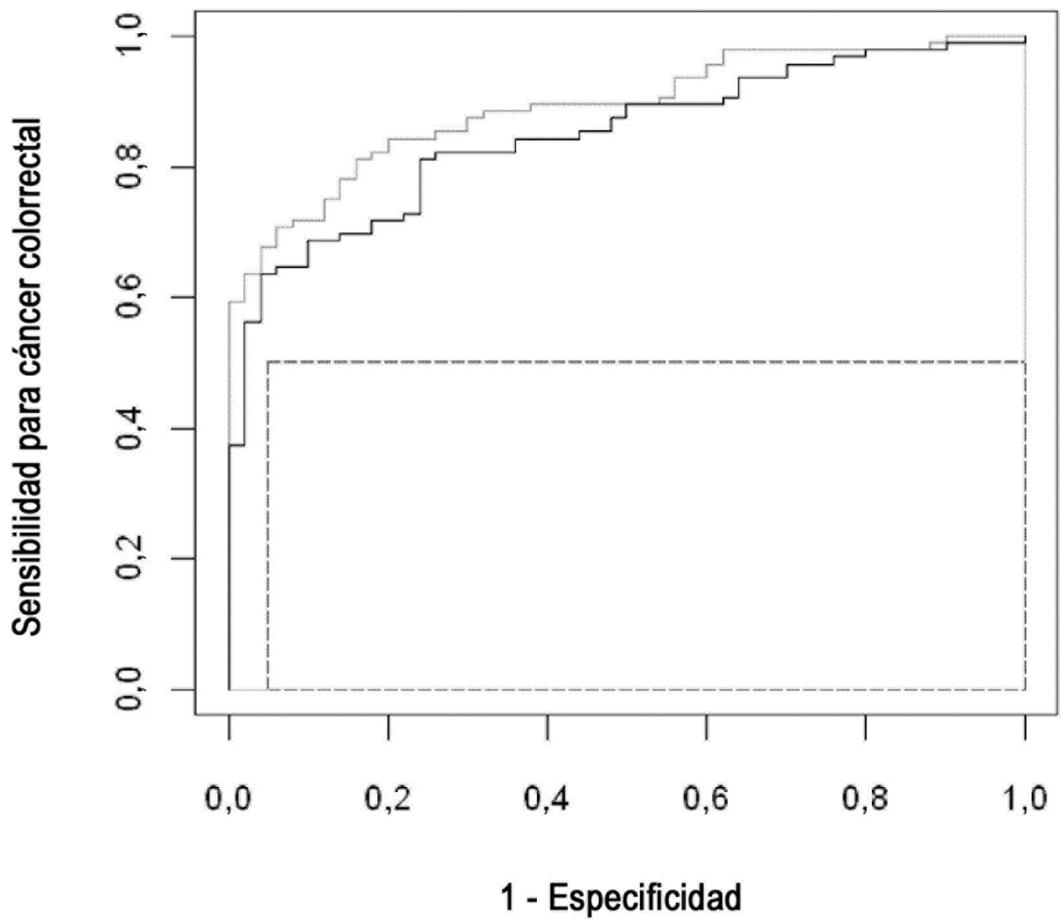


Figura 4

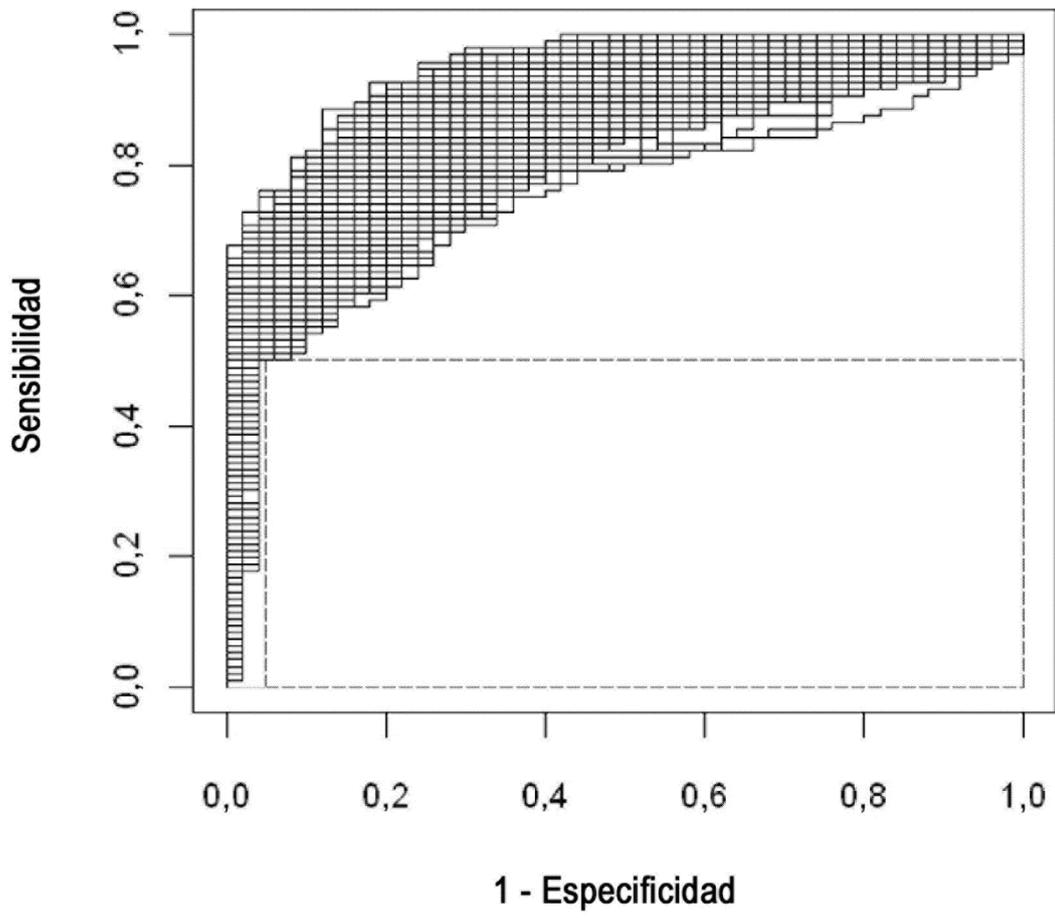
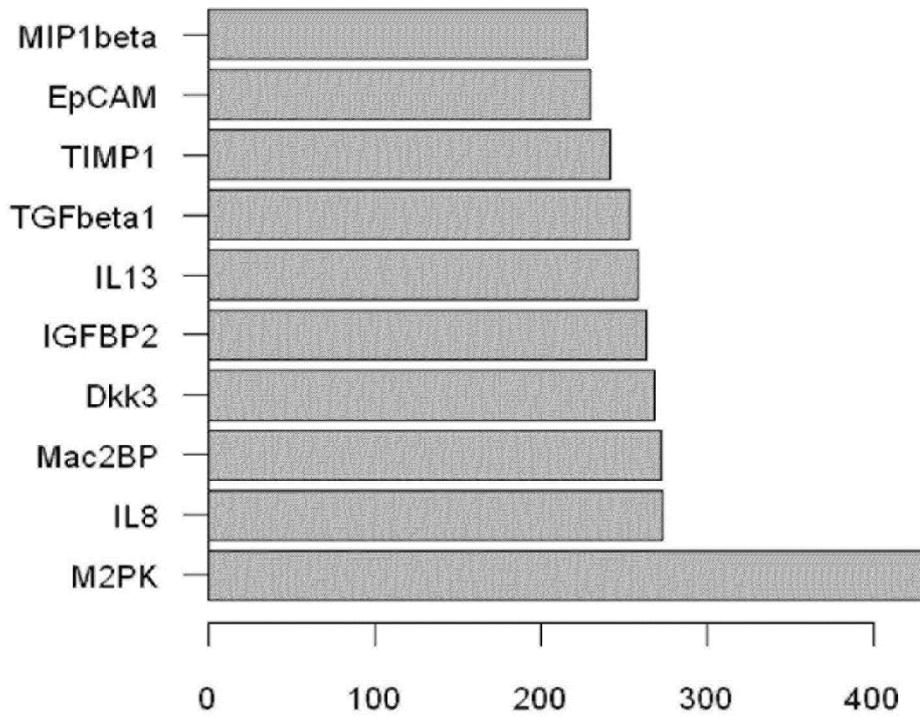


Figura 5



Modelos de suero útiles (de 485) en las que aparece cada biomarcador

Figura 6

Estudio 3 recalculado (Plasma): Modelo de 5 BM (Negro): Validación cruzada (Gris). BM: IL8, IGFBP2, Mac2BP, Dkk3 y M2PK

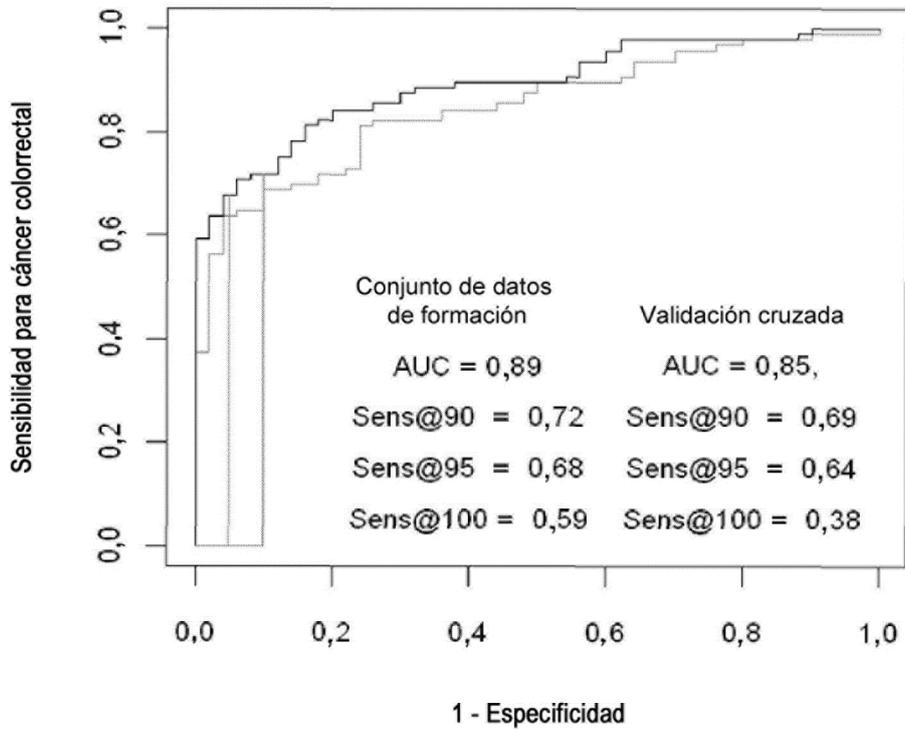


Figura 7

Estudio 3 recalculado (Plasma): Modelo de 5 BM (Negro): Validación cruzada (Gris). BM: M2PK, IL8, TGFbeta1, Dkk3, Mac2BP y IGFBP2

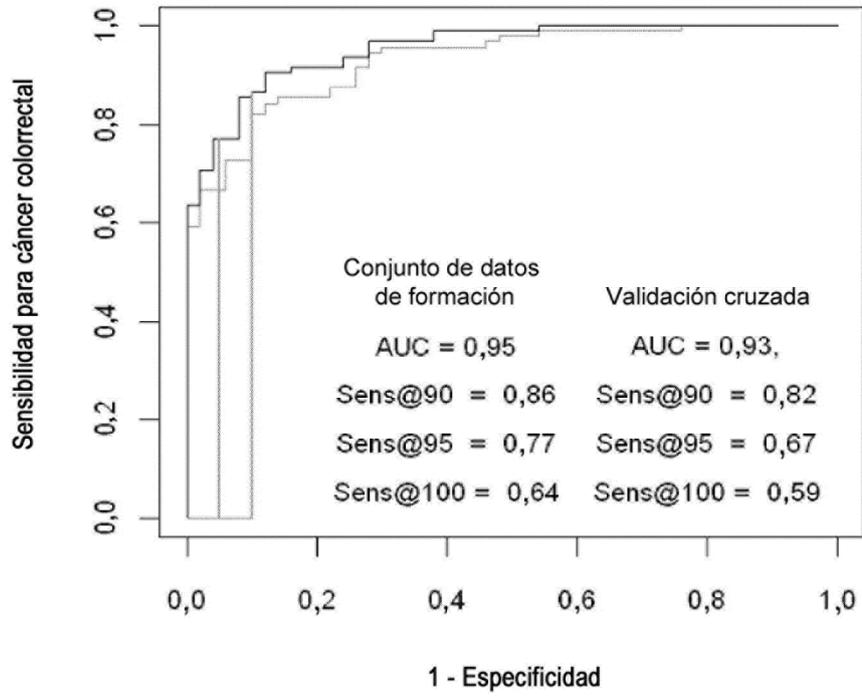


Figura 8

Modelo de siete optimizado a lata especificación (Negro): Modelo antiguo (Grey)
 Nuevos BM: IL8, IGFBP2, s90.MAC.BP, M2_PK, Dkk3, IL13 y TGFbeta
 Antiguos BM: IL8, IGFBP2, s90.MAC.BP, M2_PK, EpCAM, IL13 y MIP1b

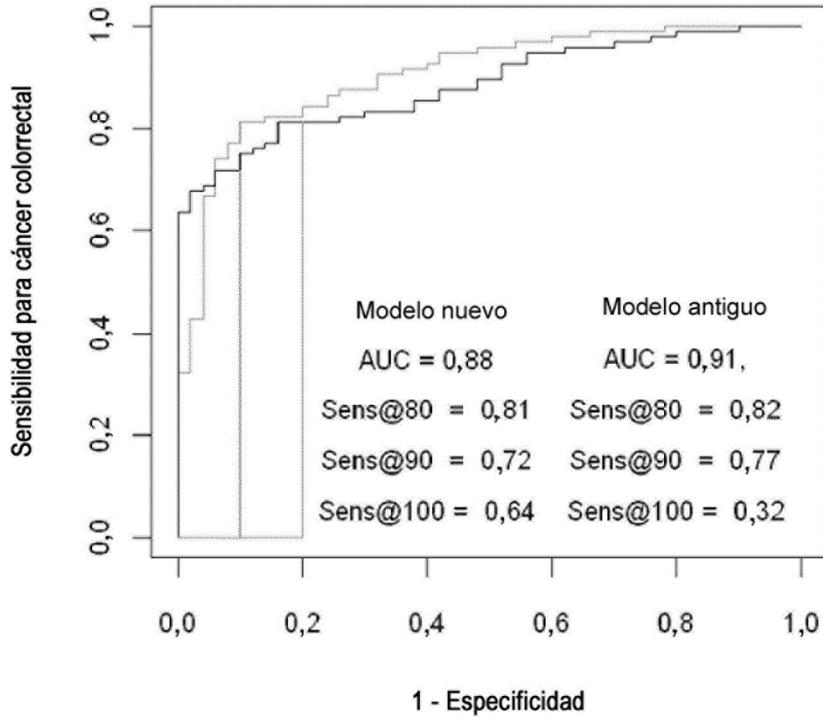


Figura 9

Estudio 3 recalculado (Plasma y Suero): Modelo de 7 BM (Negro): Valid. X
 BM: M2PK,S, IL8.P, TGFbeta1.S, IGFBP2.P, Mac2BP.S, TIMP1 y Dkk

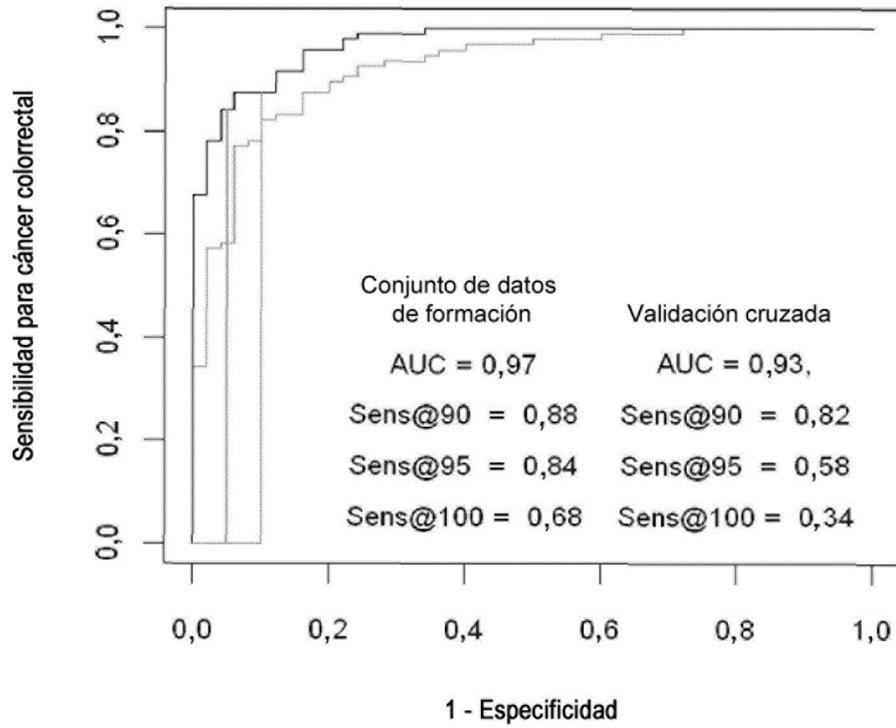


Figura 10

Curva ROC de validación cruzada por etapas para el modelo de 3 biomarcadores.
Biomarcadores: Dkk3, M2PK y IGFBP2

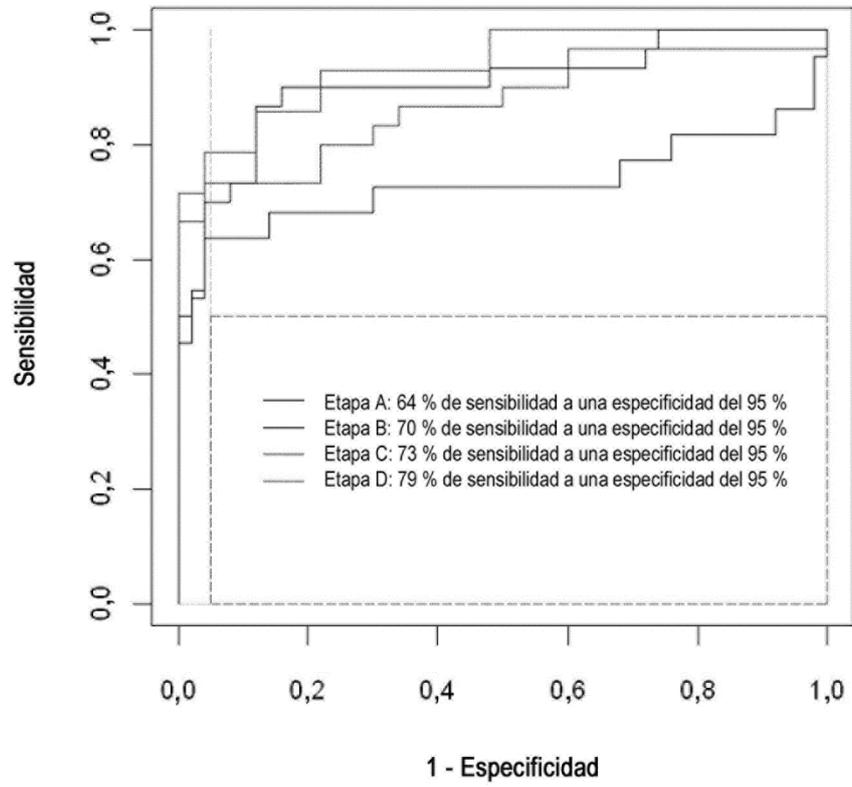


Figura 11