

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 843**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2011 PCT/IB2011/000787**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117267**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2011 E 11719644 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2681330**

54 Título: **Utilización de la proteína olfactomedina-4 (OLFM4) en el diagnóstico del cáncer colorrectal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.04.2018**

73 Titular/es:

**INSTITUT DE CANCÉROLOGIE DE L'OUEST  
(I.C.O) (100.0%)  
2 Rue Moll  
49100 Angers, FR**

72 Inventor/es:

**GUETTE, CATHERINE;  
COQUERET, OLIVIER;  
BARRE, BENJAMIN y  
GAMELIN, ERICK**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 663 843 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

Utilización de la proteína olfactomedina-4 (OLFM4) en el diagnóstico del cáncer colorrectal.

5 Con 655.000 muertes en todo el mundo cada año, el cáncer colorrectal es la tercera causa más común de cáncer y la segunda causa más importante de muerte relacionada con el cáncer en el mundo occidental. El control de los pacientes de cáncer colorrectal y la selección del mejor protocolo de tratamiento es, de esta manera, un problema sanitario crucial. La selección del tratamiento apropiado resulta crucial para el paciente, así como por motivos de economía del sector sanitario.

10

Las opciones principales para la terapia del cáncer colorrectal son la cirugía y/o la quimioterapia, dependiendo del estadio del tumor del paciente individual y otros factores relacionados con la edad y comorbilidades.

El oncólogo se enfrenta a dos tipos de situación:

15

1. En el caso de los tumores primarios localizados, la cuestión principal es la indicación de quimioterapia adyuvante durante la cirugía. Resulta esencial seleccionar tumores de mal pronóstico que requieren un protocolo de quimioterapia inicial intensa y agresiva con el fin de evitar las metástasis secundarias. De lo contrario, en el caso de invasión de los ganglios linfáticos proximales, el riesgo de metástasis secundarias es de 70% a los 5 años. Por otra parte, la adición de una quimioterapia adyuvante agresiva a la cirugía en caso de no resultar necesaria puede llevar a efectos secundarios tóxicos adversos que podrían afectar significativamente a la calidad de vida del paciente o incluso su propia vida. Además, debido a que la mediana de edad de los pacientes con cáncer colorrectal es de 69, estos pacientes, que con frecuencia presentan comorbilidades, presentan un riesgo más alto de efectos secundarios tóxicos severos.

20

Además, las terapias dirigidas innovadoras son muy caras (aproximadamente 5.000 euros al mes) y sólo deberían utilizarse en caso necesario y cuando exista una probabilidad elevada de resultar eficaces.

25

2. El 50% de los pacientes con cáncer colorrectal presentarán metástasis secundarias que pueden tratarse únicamente con agentes quimioterápicos y terapias dirigidas. La eficacia de estos fármacos con frecuencia resulta perjudicada por mecanismos de resistencia de las células tumorales, tales como la sobreexpresión o mutación de proteínas de señal de transducción o factores de transcripción, que resultan en la proliferación o supervivencia tumoral. De esta manera, existe una gran necesidad de nuevas pruebas que permitan evaluar los factores de resistencia de un tumor colorrectal particular con el fin de poder seleccionar el tratamiento adaptado.

30

En conclusión, todavía existe una necesidad de identificar y caracterizar marcadores fiables de pronóstico tumoral o factores predictivos de la resistencia con el fin de facilitar la identificación de los tumores que 1) realmente requieren quimioterapia adyuvante o 2) requieran un protocolo optimizado de quimioterapia.

35

La resistencia tumoral al tratamiento muy frecuentemente implica la sobreexpresión o mutación de las proteínas de señal de transducción o antiapoptóticas.

40

Una de las proteínas más importantes que participan en la señal de transducción de la MAP quinasa es KRAS. KRAS es un elemento de la familia génica del virus del sarcoma de rata (ras) de oncogenes (que incluye KRAS, HRAS y NRAS) y codifica la proteína de unión a guanosina difosfato (GDP) y a guanosina trifosfato (GTP) llamada RAS, que actúa como un importante transductor de señales intracelulares. Tras la unión y activación por GTP, RAS atrae el oncogén RAF, que fosforila MAP2K-1 (proteína quinasa 1 activada por mitógeno) y MAP2K-2, iniciando de esta manera la señalización por MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) que finalmente conduce a la expresión de proteínas que desempeñan funciones importantes en el crecimiento, diferenciación y supervivencia celulares. La mutación de KRAS, BRAF o PIK3CA resulta en la activación continua de las rutas RAS-MAPK o PI3K posteriores. Dicha activación a su vez potencia la transcripción de diversos oncogenes que participan en la progresión anormal del ciclo celular, incluyendo MYC, AP1, CREB y NF- $\kappa$ B (7,8,9).

45

50

El KRAS es uno de los oncogenes comúnmente mutados en los cánceres humanos. En particular, las mutaciones de KRAS se observan en 30% a 40% de los tumores y representan junto con APC una de las alteraciones somáticas que participan en el inicio del cáncer colorrectal. Esta mutación se produce temprano en el proceso de la carcinogénesis y se mantiene en las diversas etapas de avance de la enfermedad, tales como la afectación de ganglios y la diseminación metastásica. Un estudio reciente con un gran número de pacientes ha demostrado que KRAS mutado se asocia a un peor resultado en el avance del cáncer colorrectal, con efectos más pronunciados en la enfermedad en los estadios II y III (Nash et al., Ann. Surg. Oncol. 17:416-424, 2010). El mismo grupo ha demostrado en otro estudio (Nash et al., Ann. Surg. Oncol. 17:572-578, 2010) que la mutación de KRAS se asocia a un comportamiento metastásico más rápido y agresivo de las metástasis hepáticas colorrectales.

55

60

Además, se ha informado de que la mutación de KRAS induce resistencia a fármacos y el fracaso del tratamiento

con terapias que se dirigen (“targeting”) al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en el cáncer colorrectal metastásico. Las mutaciones de KRAS, en particular en el codón 12 o 13, confieren resistencia tanto a cetuximab (Erbix®) como a panitumumab (Vectibix®) (Allegra et al., J. Clin. Oncol. 27:2091-2096, 2009; Linardou et al., Lancet Oncol. 9:962-972, 2008). Más recientemente se ha propuesto extender las pruebas a otros codones a fin de incluir la variabilidad individual (Smith et al., Br. J. Cancer 102:693-703, 2010). En consecuencia, el genotipado de KRAS resulta necesario en el cáncer colorrectal metastásico antes de que se seleccione una terapia dirigida y el gen Kras de tipo salvaje resulta obligatorio antes de administrar fármacos anti-EGFR.

De hecho Kras es la piedra angular de la resistencia tumoral. No sólo las mutaciones de KRAS son responsables de la resistencia tanto a cetuximab como a panitumumab, sino que recientemente se ha demostrado que confieren resistencia a los tumores colorrectales frente a un agente derivado del platino, el oxaliplatino (Richman et al., J. Clin. Oncol. 27(35):5866-5867, 2009). Además, en el caso de que la adición de un fármaco anti-reconocimiento de EGFR al irinotecán no presente ningún efecto, sea positivo o negativo, en el tratamiento de los tumores con mutación de KRAS, la adición dicho fármaco al oxaliplatino comporta efectos perjudiciales (Douillard et al., J. Clin. Oncol. 28(31):4697-4705, 2010).

Las pruebas comerciales de KRAS basadas en la identificación de mutaciones específicas de KRAS se encuentran disponibles comercialmente. Sin embargo, un estudio de comparabilidad ha revelado la falta de concordancia entre dichos ensayos de KRAS (Oliner et al., Diagn. Pathol. 5:23, 2010). Además, dichas pruebas pueden no identificar con precisión tumores heterogéneos, es decir, tumores en los que sólo algunas células son portadoras de mutaciones de KRAS. De esta manera, todavía existe una necesidad de una prueba para determinar la presencia de mutaciones de KRAS en los cánceres colorrectales.

Los presentes inventores ahora han demostrado que la sobreexpresión de la olfactomedina-4 (OLFM4) se asocia a un riesgo más elevado de ser portador de una mutación de KRAS. Además, la sobreexpresión de la olfactomedina-4 se relaciona con la resistencia al tratamiento de quimioterapia.

La OLFM4 es un elemento de la familia de proteínas que contienen dominio olfactomedina que presenta un dominio hélice-hélice relativamente diverso en el extremo aminoterminal y un dominio olfactomedina bien conservado en el extremo carboxiterminal. La proteína olfactomedina-4 es una proteína N-glucosilada secretada que puede someterse a ensayo de la sangre del paciente. El gen de OLFM4 se expresa a nivel elevado en la diferenciación mielóide en la enfermedad intestinal inflamatoria activa y en determinados cánceres, lo que sugiere que OLFM4 podría desempeñar un papel importante en la diferenciación celular, la inflamación y la evolución del cáncer (Zheng et al., Blood 103:1883-1890, 2004; Liu et al., Exp. Cell Res. 312(10):1785-1797, 2006). Una serie de estudios ha informado de que OLFM4 participa en la regulación de la apoptosis celular y en la proliferación de las células de cáncer (Zhang et al., Cancer Res. 64:2474-2481, 2004; Kobayashi et al., Cancer Sci. 98(3):334-340, 2007). En particular, OLFM4 se sobreexpresa en el cáncer de colon (Koshida et al., Cancer Sci 98(3):315-320, 2007) y la concentración de olfactomedina-4 circulante es más elevada en la sangre de los pacientes de cáncer colorrectal que en la sangre de personas sanas de control (Yasui et al., Int. J. Cancer 125(10):2383-2392, 2009). Sin embargo, otro estudio ha dado a conocer que una expresión reducida de proteína olfactomedina-4 se asocia a una progresión maligna del carcinoma de colon (Liu et al., Clin. Cancer Res. 14(4):1041-1049, 2008). Por otra parte, ninguno de dichos estudios sugiere una relación entre la sobreexpresión de olfactomedina-4 y la presencia de una mutación de KRAS. Además, ninguno de dichos estudios sugiere una relación entre la sobreexpresión de la olfactomedina-4 y la presencia de una mutación de KRAS en los tumores colorrectales metastásicos. La expresión “tumor colorrectal metastásico” en la presente memoria se refiere a un cáncer colorrectal en estadio III o en estadio IV.

## Sumario de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones 1 a 17.

En un primer aspecto, la presente memoria proporciona un método de diagnóstico de la presencia de una mutación de KRAS en el cáncer colorrectal de un paciente. Según dicho método, los niveles de expresión elevados del gen de OLFM4 y/o de proteína olfactomedina-4 indican la presencia de dicha mutación de KRAS. Preferentemente, el cáncer colorrectal es un tumor colorrectal metastásico.

Por lo tanto, la invención se refiere a un método para determinar la presencia de una mutación de KRAS en un cáncer colorrectal metastásico, en el que dicho método comprende las etapas de:

- (a) determinar el nivel de expresión de OLFM4 a partir de una muestra biológica de un sujeto que sufre de tumor colorrectal metastásico,
- (b) comparar el nivel de expresión obtenido con por lo menos un nivel de expresión de referencia y
- (c) determinar la presencia de una mutación de KRAS en dicho tumor colorrectal metastásico a partir de

dicha comparación.

El término "olfactomedina-4" en la presente memoria se refiere a una proteína N-glucosilada secretada de 510 residuos, en el que dicha proteína comprende un dominio de olfactomedina. Preferentemente dicha proteína es una proteína humana. Todavía más preferentemente, dicha proteína presenta una secuencia de aminoácidos tal como en NP\_006409.3 y el gen OLFM4, que codifica dicha proteína, presenta una secuencia de nucleótidos tal como en NM\_006418.3. El gen OLFM4 se encuentra conservado en el chimpancé, el perro, la vaca, el ratón, la rata, el pollo y el pez cebra; en caso necesario, el experto en la materia podrá identificar fácilmente el gen correspondiente en cualquiera de dichas especies basándose en la homología de las secuencias de dicho gen respecto al gen humano anteriormente indicado.

En el contexto de la presente invención se ha demostrado que la presencia de una mutación de KRAS en un cáncer colorrectal conduce a la sobreexpresión del gen OLFM4 que, a su vez, resulta en la sobreexpresión de la proteína olfactomedina-4. De esta manera, resulta posible determinar los niveles de expresión del gen OLFM4 mediante la medición de la cantidad de transcrito del ácido nucleico de OLFM4 (es decir, basándose en el contenido de ARNm de OLFM4 de la muestra) o de la proteína olfactomedina-4 (es decir, basada en el contenido de proteína olfactomedina-4 de la muestra).

Los tumores colorrectales con mutación de KRAS preferentemente expresan la forma glucosilada de dicha olfactomedina-4. Por lo tanto, el nivel de expresión de OLFM4 también puede determinarse mediante la medición de los niveles de proteína olfactomedina-4 glucosilada, es decir, mediante la medición de la cantidad de forma glucosilada de proteína olfactomedina-4. Ventajosamente, la cantidad de la forma glucosilada se compara con el nivel de forma no glucosilada, con una proporción de forma glucosilada a forma no glucosilada de la proteína olfactomedina-4 superior a 1,4, lo que indica la presencia de mutación de KRAS en el cáncer colorrectal; preferentemente dicha proporción es superior a 1,5; más preferentemente es superior a 1,6; todavía más preferentemente es superior a 1,7. En el presente ejemplo, el método de la invención comprende las etapas adicionales de medir la cantidad de la forma glucosilada de la proteína olfactomedina-4, medir la cantidad de la forma no glucosilada de la proteína olfactomedina-4 y calcular la proporción de forma glucosilada a forma no glucosilada de la proteína olfactomedina-4.

Además, de encontrarse glucosilada, dicha proteína olfactomedina-4 preferentemente se secreta, tal como se pone de manifiesto en la localización preferente en vesículas de secreción de dicha proteína olfactomedina-4 en células tumorales con mutación de KRAS en comparación con células tumorales no mutadas o tejido sano. De esta manera, resulta posible detectar el nivel de expresión de OLFM4 mediante la medición de la cantidad de proteína olfactomedina-4. Lo anterior puede conseguirse mediante la medición directamente de la cantidad de proteína secretada en una muestra biológica que no contiene ninguna célula tumoral o, de una manera indirecta, mediante la cuantificación en las células tumorales de las vesículas de secreción que contienen dicha proteína olfactomedina-4.

En otro aspecto, pueden utilizarse los niveles de OLFM4 para determinar si un paciente responderá o no al tratamiento de quimioterapia. Los presentes inventores han demostrado que la sobreexpresión de OLFM4 confiere resistencia al tratamiento de quimioterapia. Por ejemplo, la sobreexpresión de OLFM4 incrementa la supervivencia de las células de cáncer colorrectal en presencia de agentes genotóxicos, tales como oxaliplatino y sn38 (el metabolito activo de irinotecán). Más específicamente, la presencia de olfactomedina-4 secretada al medio resulta suficiente para estimular la resistencia de las células de cáncer de colon frente a dichos agentes. También debe mencionarse que la eficacia de un agente que se dirige a EGFR para el tratamiento del cáncer colorrectal depende de la ausencia de cualquier mutación de KRAS. En efecto se ha demostrado que los pacientes con KRAS mutado en su cáncer colorrectal no responden al tratamiento con agentes que se dirigen a EGFR u oxaliplatino. De esta manera, los niveles de OLFM4 elevados son indicativos de una respuesta pobre o una ausencia de respuesta al tratamiento con agente quimioterápico.

De esta manera, la invención se refiere a un método para el diagnóstico o el pronóstico in vitro de un fenotipo que responde o que no responde a un agente quimioterápico, que comprende:

- (a) determinar a partir de una muestra biológica de un sujeto que sufre de cáncer colorrectal el nivel de expresión de OLFM4,
- (b) comparar el nivel de expresión obtenido con por lo menos un nivel de expresión de referencia y
- (c) determinar el fenotipo que responde o que no responde al agente quimioterápico a partir de dicha comparación.

El término "quimioterapia" tal como se utiliza en la presente memoria es un tratamiento para el cáncer que utiliza fármacos que detienen el crecimiento de las células de cáncer, mediante la eliminación de las células o deteniendo la división de las células. Dicho fármaco puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña: entre las moléculas pequeñas que pueden utilizarse convenientemente para la invención se incluyen, en particular,

fármacos genotóxicos. Preferentemente, entre los fármacos genotóxicos utilizados para el tratamiento del cáncer colorrectal se incluyen busulfán, bendamustina, carboplatino, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, dacarbazina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, etopósido, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán (y su metabolito activo, sn38), lomustina, mecloretamina, melfalán, mitomicina C, mitoxantrona, oxaliplatino, temozolamida y topotecán. Todavía más preferentemente, los fármacos genotóxicos son oxaliplatino, irinotecán y el metabolito activo del irinotecán llamado sn38. Sin embargo, la invención no debe entenderse como limitada a los fármacos genotóxicos, ya que también pueden utilizarse muchos otros tipos de molécula pequeña en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, también se encuentran comprendidos antimetabolitos tales como 5-FU (y su profármaco capecitabina), tegafur-uracilo (o UFT o UFUR), leucovorina (LV, ácido folínico) o inhibidores del proteasoma, tales como bortezomib.

La quimioterapia también puede llevarse a cabo con fármacos biológicos. En la presente memoria se define fármaco biológico como cualquier tipo de agente biológico que presenta una actividad terapéutica en la terapia del cáncer colorrectal. Dicho agente puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido (por ejemplo oblimersen), aunque preferentemente es una proteína, tal como un receptor de VEGF soluble, por ejemplo aflibercept, o un anticuerpo. En una forma de realización preferida adicional, dicho agente es un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, bevacuzimab, es decir Avastin®).

Otro grupo preferido de fármacos quimioterápicos según la invención corresponde a agentes que se dirigen a EGFR. La expresión "agente que se dirige a EGFR" o "ETA" en la presente memoria se hace referencia a un agente que es capaz de neutralizar los efectos del EGFR, es decir, un inhibidor de EGFR. La expresión "factor de crecimiento epidérmico" o "EGFR" en la presente memoria hace referencia a un receptor de superficie celular para elementos de la familia del factor de crecimiento epidérmico (familia del EGF) de ligandos de proteínas extracelulares. La proteína EGFR indicada en la presente memoria es un polipéptido humano que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en NP\_005219. Ventajosamente dicho agente es capaz de inhibir la señalización posterior del EGFR. De esta manera, dicha clase de agentes se distingue a partir de su diana, no de su naturaleza (es decir, molécula pequeña o bioterapéutico). Dentro de la definición de ETA se encuentran las moléculas pequeñas que se unen e inhiben el EGFR, tales como gefitinib, erlotinib, vandetanib, BIBW 2992, lapatinib o neratinib. Los ETA comprenden además anticuerpos, y en particular los anticuerpos monoclonales se encuentran comprendidos en la invención. En una forma de realización preferida, dicho agente se selecciona de entre el grupo que consiste en panitumumab (Vectibix®), mastuzumab y cetuximab (Erbix®). Más preferentemente dicho agente es cetuximab (Erbix®).

Se proporciona además un método para diseñar el tratamiento con un agente quimioterápico para un sujeto que sufre de un cáncer colorrectal, en el que dicho método comprende:

- (a) determinar a partir de una muestra biológica de un sujeto que sufre de cáncer colorrectal, el nivel de expresión de OLFM4,
- (b) comparar el nivel de expresión obtenido con por lo menos un nivel de expresión de referencia,
- (c) determinar el fenotipo que responde o no responder a un agente quimioterápico a partir de dicha comparación y
- (d) diseñar la dosis del tratamiento con agente quimioterápico según dicho fenotipo identificado que responde o que no responde a un agente quimioterápico.

Para los fines de la presente solicitud se entiende que al determinar en la etapa (a) que el fenotipo no responde, la dosis del tratamiento quimioterápico determinada en la etapa (b) puede ser igual a 0.

Opcionalmente, la dosis de un agente quimioterápico que se ha determinado en la etapa (b) se administra en el sujeto. En el caso de que la dosis sea igual a 0, no se administra ningún tratamiento.

Se proporciona además un método de tratamiento de un sujeto que sufre de un cáncer colorrectal con un agente de quimioterapia, que comprende:

- (a) determinar a partir de una muestra biológica procedente de dicho sujeto que sufre de cáncer colorrectal la presencia de un fenotipo que responde o que no responde a un agente quimioterápico utilizando un método tal como se proporciona en la presente memoria y
- (b) adaptar el tratamiento de agente quimioterápico en función del resultado de la etapa (a).

Dicha adaptación del tratamiento de agente quimioterápico puede consistir en:

- una reducción o supresión de dicho tratamiento de agente quimioterápico en el caso de que el sujeto haya sido diagnosticado como que no responde a un agente quimioterápico o

- la continuación de dicho tratamiento con dicho agente quimioterápico en el caso de que el sujeto haya sido diagnosticado como que responde a un agente quimioterápico.

5 Se proporciona además un nuevo uso de un agente quimioterápico en el tratamiento del cáncer colorrectal, que comprende las etapas de:

10 (a) determinar a partir de una muestra biológica procedente de dicho sujeto que sufre de cáncer colorrectal la presencia de un fenotipo que responde o que no responde a un agente quimioterápico utilizando un método proporcionado en la presente memoria y

(b) determinar la dosis de agente quimioterápico que debe administrarse con respecto al resultado de la etapa (a).

15 Opcionalmente se administra en el sujeto la dosis de agente quimioterápico que se ha determinado en la etapa (b). Tal como se ha indicado anteriormente, en el caso de que la dosis sea igual a 0, no se administra ningún tratamiento.

20 Por lo tanto se proporciona un agente quimioterápico para tratar el cáncer colorrectal, en el que el agente quimioterápico se administra en el sujeto que sufre de cáncer colorrectal que ha sido diagnosticado o pronosticado como que responde utilizando un método según la invención. Más específicamente, se proporciona un agente quimioterápico para tratar el cáncer colorrectal en un sujeto que sufre de un cáncer colorrectal, en el que:

25 (a) el fenotipo que responde o que no responde al agente quimioterápico de dicho sujeto se determina según el método de la invención,

30 (b) la dosis de tratamiento de agente quimioterápico según dicho fenotipo que responde o que no responde al agente quimioterápico identificado y

(c) la dosis del agente quimioterápico que se determina en la etapa (b) se administra en dicho sujeto.

35 Los regímenes quimioterápicos de primera línea utilizados comúnmente para el cáncer colorrectal implican la combinación de 5-fluorouracilo, leucovorina y oxaliplatino (FOLFOX) en infusión con cetuximab o panitumumab o de 5-fluorouracilo, leucovorina e irinotecán (FOLFIRI) en infusión con cetuximab o panitumumab, ambos en tumores de tipo salvaje KRAS.

40 Se proporciona además un método de tratamiento de un sujeto que sufre de cáncer, que comprende las etapas de:

(a) administrar una dosis terapéutica de FOLFOX o FOLFIRI en dicho sujeto que sufre de cáncer colorrectal,

45 (b) determinar a partir de una muestra biológica de dicho sujeto que sufre de cáncer colorrectal la presencia de un fenotipo que responde o que no responde al agente quimioterápico utilizando un método según la invención y

(c) determinar la dosis de agente quimioterápico para la administración con respecto al resultado de la etapa (b).

50 De esta manera, se proporciona además una combinación de agente quimioterápico y FOLFOX o agente quimioterápico y FOLFIRI para el tratamiento del cáncer colorrectal, que comprende las etapas siguientes:

(a) administrar una dosis terapéutica de FOLFOX o FOLFIRI en un sujeto que sufre de cáncer colorrectal,

55 (b) determinar a partir de una muestra biológica de dicho sujeto que sufre de cáncer colorrectal la presencia de un fenotipo que responde o que no responde a un agente quimioterápico utilizando un método según la invención y

60 (c) determinar la dosis de agente quimioterápico que debe administrarse con respecto al resultado de la etapa (b).

Opcionalmente se administra en el sujeto la dosis de agente quimioterápico que se ha determinado en la etapa (c).

65 Tal como se define en la presente memoria, un "fenotipo que responde a un agente quimioterápico" se define como un estado de respuesta de un sujeto a la administración de un agente quimioterápico. Un "estado de

respuesta" se refiere a que dicho sujeto (referido a un sujeto que responde a un agente quimioterápico o a un sujeto que responde o a un sujeto sensible: para el propósito de la presente solicitud estas expresiones son similares) responde al tratamiento, es decir, a que el tratamiento resulta eficaz en dicho sujeto. La definición de respuesta es una reducción del volumen tumoral evaluada mediante, por ejemplo, escaneo de TC o imágenes de resonancia magnética (MRI). De esta manera, estos criterios son bien conocidos por el experto en la materia y no necesitan detallarse en la presente memoria.

En contraste, un "fenotipo que no responde a un agente quimioterápico" se refiere a la ausencia en dicho sujeto (al que se hace referencia en la presente memoria como sujeto que no responde a un agente quimioterápico o sujeto que no responde o sujeto no sensible: estos términos deben interpretarse en el contexto de la presente solicitud como términos con el mismo significado) de un estado de respuesta, referido a que dicho sujeto se mantiene refractario al tratamiento.

En un ejemplo preferido de cualquiera de los métodos in vitro anteriormente descritos de diagnóstico/pronóstico, dicho sujeto es un sujeto que sufre de cáncer colorrectal. Un "sujeto que sufre de cáncer colorrectal" es un sujeto con un cáncer en cualquiera de los estadios de la clasificación utilizada por el experto en la materia. En otras palabras, cualquier sujeto con un cáncer colorrectal de estadio 0, estadio I, estadio IIA, estadio IIB, estadio IIIA, estadio IIIB, estadio IIIC o estadio IV, es un sujeto que sufre de cáncer colorrectal tal como se entiende en la presente memoria. En un aspecto, dicho sujeto no se trata con un agente quimioterápico; en otro aspecto adicional, dicho sujeto se trata con un agente quimioterápico.

Será fácil de concebir que en el caso de que dicho sujeto no se trate con un agente quimioterápico, los métodos de la invención permitirán un pronóstico de la capacidad de respuesta/falta de capacidad de respuesta de dicho sujeto. De esta manera, en la presente forma de realización, el método de la invención permite al experto en la materia pronosticar (es decir, identificar) los sujetos susceptibles de responder al tratamiento con agente quimioterápico. Ello es importante debido a la naturaleza destructiva y potencialmente fatal del cáncer colorrectal y los costes sociales de los tratamientos quimioterápicos ineficaces. Además, debido a que dicha forma de realización de la invención permite identificar los sujetos que no responden antes de iniciar ningún tratamiento, se reducen en gran medida los riesgos de que un sujeto tratado se enfrente a efectos adversos severos.

En el caso de que el sujeto se trate con un agente quimioterápico, los métodos de la invención resultan útiles para diagnosticar si el sujeto responde a dicho agente quimioterápico y si dicho sujeto se beneficiaría de esta manera de una continuación de dicho tratamiento. Además, resultan útiles para diagnosticar sujetos que no están respondiendo al tratamiento, es decir, que son refractarios al agente quimioterápico y, de esta manera, deberían cambiarse rápidamente a otra terapia. Con respecto a la naturaleza potencialmente letal del cáncer colorrectal dicho logro resulta crucial.

Una "muestra biológica" puede ser cualquier muestra que puede extraerse de un sujeto, tal como una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de orina, una muestra de sangre, una muestra de linfa o una muestra de cáncer colorrectal. Dicha muestra debe permitir determinar los niveles de expresión de OLFM4. Entre las muestras biológicas preferentes para la determinación del nivel de expresión de OLFM4 de la proteína olfactomedina-4 secretada se incluyen muestras tales como una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de linfa o una muestra de cáncer colorrectal. Preferentemente, la muestra biológica es una muestra de sangre. En efecto, dicha muestra de sangre puede obtenerse mediante una extracción de sangre completamente inocua del paciente y permite de esta manera un diagnóstico no invasivo de un fenotipo que responde o no responder a un agente quimioterápico. La expresión "muestra biológica" tal como se utiliza en la presente memoria incluye además una muestra de cáncer colorrectal del paciente que debe someterse a ensayo. Dicha muestra de cáncer colorrectal permite al experto en la materia realizar cualquier tipo de medición del nivel de OLFM4 y/o de olfactomedina-4. En algunos casos, los métodos pueden comprender además una etapa preliminar de obtención de una muestra de cáncer de colon del paciente. La expresión "muestra de cáncer colorrectal" se refiere a una muestra de tejido de colon tumoral. Incluso en un paciente de cáncer el tejido del colon todavía comprende tejido sano no tumoral. De esta manera, la "muestra de cáncer colorrectal" debería limitarse a tejido de colon tumoral obtenido del paciente. Dicha "muestra de cáncer colorrectal" puede ser una muestra de biopsia o una muestra obtenida de una resección quirúrgica del colon o una resección quirúrgica de metástasis colorrectal. La expresión "muestra de cáncer colorrectal" tal como se utiliza en la presente memoria comprende tanto tumores primarios colorrectales como tumores metastásicos colorrectales.

La cantidad de transcritos de ácidos nucleicos puede medirse mediante cualquier tecnología conocida por un experto en la materia. En particular, la medición puede llevarse a cabo directamente en una muestra extraída de ARN mensajero (ARNm) o en ADN complementario transcrito inversamente (ADNc) preparado a partir de ARNm extraído, mediante tecnologías bien conocidas de la técnica. A partir de la muestra de ARNm o ADNc puede medirse la cantidad de transcritos de ácidos nucleicos utilizando cualquier tecnología conocida por el experto en la materia, incluyendo micromatrices de ácidos nucleicos, PCR cuantitativa y la hibridación con una sonda marcada.

Por lo tanto, los métodos proporcionados en la presente memoria pueden comprender otra etapa preliminar,

entre la obtención de la muestra del paciente y las etapas a) tal como se ha definido anteriormente, correspondientes a la transformación de la muestra de cáncer colorrectal (y opcionalmente de la muestra de tejido de colon sano) en una muestra de ARNm (o ADNc correspondiente) o en una muestra de proteína, que a continuación se encuentra lista para la utilización para la medición *in vitro* de los niveles de expresión génica en la etapa a). La preparación o extracción de ARNm (así como la transcripción inversa en ADNc) o proteínas a partir de una muestra de tejido es un simple procedimiento rutinario bien conocido por el experto en la materia.

Una vez se encuentra disponible una muestra de ARNm (o ADNc correspondiente) o proteína de cáncer colorrectal lista para utilizar, puede llevarse a cabo la medición de los niveles de expresión del gen OLFM4, dependiendo del tipo de transformación y la muestra lista para utilizar que se encuentra disponible, al nivel de ARNm (es decir, basado en el contenido de ARNm de la muestra) o al nivel de proteína (es decir, basado en el contenido de proteína de la muestra). En algunos aspectos, los niveles de expresión de algunos de los genes pueden medirse al nivel de ARNm, mientras que los niveles de expresión de otros genes se miden al nivel de proteína. En este caso, parte de la muestra de cáncer colorrectal obtenida del paciente ha sido transformada en una muestra de ARNm (o ADNc correspondiente) y otra parte ha sido transformada en una muestra de proteína. En otros aspectos, se miden los niveles de expresión de todos los genes sometidos a ensayo, al nivel de ARNm o al nivel de proteína.

En una forma de realización preferida, el nivel de expresión se determina utilizando PCR cuantitativa. La PCR cuantitativa, o en tiempo real, es una tecnología bien conocida y fácilmente disponible para el experto en la materia y no requiere una descripción precisa.

En un ejemplo particular, que no debe considerarse limitativo del alcance de la invención, la determinación del nivel de expresión utilizando PCR cuantitativa puede llevarse a cabo de la manera siguiente. Brevemente, se llevan a cabo reacciones de PCR en tiempo real utilizando la mezcla maestra de PCR TaqMan Universal (Applied Biosystems). Se añaden 6  $\mu$ l de ADNc a 9  $\mu$ l de mezcla de PCR que contiene 7,5  $\mu$ l de mezcla maestra de PCR TaqMan Universal, 0,75  $\mu$ l de una mezcla 20X de sonda y dímeros y 0,75  $\mu$ l de agua. La reacción consistía en una etapa de inicio de 2 min a 50°C, seguida de 10 min a 95°C y 40 ciclos de amplificación, que incluían 15 s a 95°C y 1 min a 60°C. La reacción y adquisición de datos pueden llevarse a cabo utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems). El número de moléculas de transcrito de molde en una muestra se determina registrando el ciclo de amplificación en la etapa exponencial (umbral de ciclo,  $C_T$ ), momento en el que puede detectarse una señal de fluorescencia superior a la fluorescencia de fondo. De esta manera, el número inicial de moléculas de transcrito de molde es inversamente proporcional a  $C_T$ .

En otro ejemplo particular, se determina el nivel de expresión mediante la utilización de una micromatriz de ácidos nucleicos.

Tal como se define en la presente memoria, una "micromatriz de ácidos nucleicos" consiste en diferentes sondas de ácidos nucleicos que se encuentran unidas a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla microesferizada. Un microchip puede estar constituido de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en el silicio, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas pueden ser ácidos nucleicos, tales como ADNc ("micromatriz de ADNc") u oligonucleótidos ("micromatriz de oligonucleótidos") y los oligonucleótidos pueden presentar una longitud de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 pares de bases o menos.

Alternativamente puede utilizarse cualquier tecnología conocida o futura que permita evaluar los niveles de expresión génica basándose en el contenido de ARNm. Por ejemplo, pueden utilizarse micromatrices de tejidos acopladas a hibridación *in situ* fluorescente. Las micromatrices de tejidos (también conocidas como TMA) consisten en bloques de parafina en los que hasta 1.000 cilindros separados de tejido se agrupan en forma de matriz para permitir el análisis histológico en multiplex. En la técnica de micromatriz de tejidos, se utiliza una aguja hueca para extraer cilindros de tejido de incluso tan solo 0,6 mm de diámetro a partir de regiones de interés en tejidos incluidos en parafina, tales como biopsias clínicas o muestras de tumor. A continuación, dichos cilindros de tejido se insertan en un bloque receptor de parafina en un patrón de matriz espaciado con precisión. Las secciones de este bloque se cortan utilizando un micrótopo, montado sobre un portaobjetos de microscopía y después se analizan mediante cualquier método de análisis histológico estándar. Cada bloque de micromatriz puede cortarse en 100 a 500 secciones que pueden someterse a ensayos independientes. Entre los ensayos utilizados comúnmente en las micromatrices de tejidos se incluyen la inmunohistoquímica y la hibridación *in situ* fluorescente. Para el análisis al nivel de ARNm, la tecnología de micromatrices de tejidos puede acoplarse a la hibridación *in situ* fluorescente.

Al medir los niveles de expresión al nivel de las proteínas, pueden medirse especialmente utilizando anticuerpos específicos, en particular utilizando tecnologías bien conocidas tales como la tinción de membranas celulares utilizando la biotilación u otras técnicas equivalentes seguidas de la inmunoprecipitación con anticuerpos específicos, la transferencia western, ELISA o ELISPOT, las micromatrices de anticuerpos o las micromatrices de tejidos acopladas con inmunohistoquímica. Entre otras técnicas adecuadas se incluyen FRET o BRET, métodos

de microscopía o histoquímica de células individuales utilizando longitudes de onda de excitación individuales o múltiples y la aplicación de cualquiera de los métodos ópticos adaptados, tales como los métodos electroquímicos (técnicas de voltimetría y amperometría), la microscopía de fuerza atómica y los métodos de radiofrecuencia, por ejemplo la espectroscopía de resonancia multipolar, confocal y no confocal, la detección de fluorescencia, luminiscencia, quimioluminiscencia, absorbancia, reflectancia, transmitancia y birrefringencia o índice refractivo (por ejemplo la resonancia de plasmón superficial, la elipsometría, un método de espejo resonante, un método de guías de onda en acoplador por red de difracción o interferometría), ELISA celular, citometría de flujo, radioisótopos, imágenes de resonancia magnética, análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), HPLC-espectroscopía de masas, cromatografía líquida-espectrometría de masas/espectrometría de masas (CL-EM/EM)). La totalidad de dichas técnicas es bien conocida de la técnica y no necesitan detallarse adicionalmente en la presente memoria. Estas diferentes técnicas pueden utilizarse para medir el total de los niveles de olfactomedina-4 aunque también, tal como resultará evidente para el experto en la materia, las diferentes cantidades de las formas glucosiladas y no glucosiladas. Por ejemplo, las formas glucosiladas y no glucosiladas de la proteína olfactomedina-4 pueden evaluarse basándose en su diferente movilidad electroforética respectiva mediante transferencia western con un anticuerpo que reconoce ambas formas. Se muestra un ejemplo de este tipo de ensayo en los ejemplos experimentales. Alternativamente, puede evaluarse mediante ELISA la cantidad total de proteína olfactomedina-4 utilizando un anticuerpo que reconoce ambas formas y la fracción de olfactomedina glucosilada, utilizando un anticuerpo específico para esta forma. Resulta inmediatamente evidente que los niveles de proteína pueden medirse directamente en una muestra de cáncer colorrectal ya que permite al experto en la materia someter a ensayo tanto la forma glucosilada como la forma no glucosilada. Sin embargo, tal como se ha explicado anteriormente en la presente memoria, también resulta evidente que el nivel de proteína olfactomedina-4 secretada puede determinarse alternativamente a partir de una muestra de sangre.

La comparación de los niveles de expresión de los genes medidos en dicha muestra de cáncer colorrectal del paciente se lleva a cabo calculando una proporción de niveles de expresión de nivel de expresión del gen OLFM4 a nivel de expresión de un gen de referencia en dicha muestra de cáncer de colon del paciente y mediante la comparación de la proporción de niveles de expresión obtenida con un valor umbral correspondiente. Dicho gen de referencia es un gen que se expresa en todos los tipos celulares. Más específicamente, el gen de referencia es un gen que se expresa en todas las células que constituyen el colon. En otro aspecto, el nivel de expresión del gen de referencia no resulta afectado por el estado de la célula, es decir, el gen de control se expresa al mismo nivel en una célula sana y en una célula tumoral. En un ejemplo específico, el gen de referencia es un gen de mantenimiento. Un gen de mantenimiento es un gen expresado en todos los tipos celulares, que proporciona una función básica necesaria para el sostenimiento de todos los tipos celulares. Puede encontrarse una lista de los genes de mantenimiento humanos en Eisenberg et al. (Trends in Genetics 19:362-365, 2003). Un gen de mantenimiento preferente es un gen seleccionado de entre el grupo que consiste en B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS.

Tal como se define en la presente memoria, un "valor umbral" pretende referirse a un valor que permite discriminar muestras en las que la proporción de niveles de expresión del gen de interés corresponde a un nivel de expresión de dicho gen de interés en la muestra de cáncer de colon del paciente que es baja o alta. En particular, en el caso de que la proporción de niveles de expresión génica sea inferior o igual al valor umbral, el nivel de expresión de dicho gen en la muestra de cáncer de colon del paciente se considera baja, mientras que en el caso de que la proporción de niveles de expresión génica sea superior al valor umbral, el nivel de expresión de dicho gen en la muestra de cáncer de colon del paciente se considera alta. Para cada gen, y dependiendo del método utilizado para medir el nivel de expresión de los genes, el valor umbral óptimo puede variar. Sin embargo, puede ser fácilmente determinado por el experto en la materia basándose en el análisis de varias muestras de cáncer colorrectal de control en las que el nivel de expresión (bajo o alto) es conocido para dicho gen particular y en la comparación del mismo con la expresión de un gen de control, por ejemplo un gen de mantenimiento.

Se proporciona además una micromatriz dedicada a la implementación de los métodos según la invención, que comprende como máximo 500, preferentemente como máximo 300, como máximo 200, todavía más preferentemente como máximo 150, como máximo 100, todavía más preferentemente como máximo 75, como máximo 50, como máximo 40, como máximo 30, como máximo 20, como máximo 10 sondas diferentes, por lo menos 1 de las cuales se une específicamente al ARNm (o ADNc correspondiente) o proteína de OLFM4.

En un ejemplo particular, dicha micromatriz es una micromatriz de ácidos nucleicos, que comprende como máximo 500, preferentemente como máximo 300, como máximo 200, más preferentemente como máximo 150, como máximo 100, todavía más preferentemente como máximo 75, como máximo 50, como máximo 40, como máximo 30, como máximo 20, como máximo 10 sondas diferentes (excluyendo de esta manera, por ejemplo, las micromatrices pangenómicas), por lo menos 1 de las cuales se hibrida específicamente con el ARNm (o ADNc correspondiente) de OLFM4. Dicha micromatriz puede contener además por lo menos una sonda que se hibrida específicamente con un gen de mantenimiento además de la sonda que se hibrida específicamente con OLFM4. En un ejemplo particular, dicho gen de mantenimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en B2M,

TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. Más preferentemente, el gen de mantenimiento es el gen IPO8 o el gen HMBS. Tal como se define en la presente memoria, una "micromatriz de ácidos nucleicos" consiste en diferentes sondas de ácidos nucleicos que se encuentran unidas a un sustrato, que puede ser un microchip, un portaobjetos de vidrio o una perla de tamaño microesférico. Un microchip puede estar constituido de polímeros, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales a base de sílice, carbono, metales, vidrios inorgánicos o nitrocelulosa. Las sondas pueden ser ácidos nucleicos, tales como ADNc ("micromatriz de ADNc") u oligonucleótidos ("micromatriz de oligonucleótidos", en la que los oligonucleótidos presentan una longitud de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 pares de bases o menos).

Alternativamente, en otro ejemplo, dicha micromatriz puede ser una micromatriz de proteínas. Preferentemente, dicha micromatriz es una micromatriz de anticuerpos, que comprende como máximo 500, preferentemente como máximo 300, como máximo 200, más preferentemente como máximo 150, como máximo 100, todavía más preferentemente como máximo 75, como máximo 50, como máximo 40, como máximo 30, como máximo 20, como máximo 10 anticuerpos diferentes, por lo menos 1 de los cuales se une específicamente a la proteína olfactomedina-4. Dicha micromatriz puede contener además por lo menos un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de mantenimiento, además del anticuerpo que se une específicamente a la proteína olfactomedina-4. En un ejemplo particular, dicha proteína de mantenimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en las proteínas B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. Preferentemente, dicha proteína de mantenimiento es la proteína IPO8 o HMBS.

Alternativamente a la tecnología de micromatrices de ácidos nucleicos o anticuerpos, puede utilizarse la PCR cuantitativa y de esta manera los cebadores de amplificación específicos para los genes que deben someterse a ensayo resultan muy útiles para llevar a cabo los métodos según la invención. Se proporciona además un kit para el diagnóstico de la presencia de una mutación de KRAS en un cáncer colorrectal en un paciente de una muestra de cáncer colorrectal de dicho paciente, que comprende por lo menos un reactivo para la determinación del nivel de expresión de OLFM4. Se proporciona además un kit para el diagnóstico in vitro de un fenotipo que responde o que no responde, que comprende por lo menos un reactivo para la determinación del nivel de expresión de OLFM4. En un ejemplo específico, el kit comprende una micromatriz dedicada tal como se ha indicado anteriormente o cebadores de amplificación específicos para OLFM4. También en dicho kit, en el caso de que comprenda cebadores de amplificación, aunque puede comprender cebadores de amplificación específicos para otros genes, dicho kit preferentemente comprende como máximo 100, como máximo 75, como máximo 50, como máximo 40, como máximo 30, preferentemente como máximo 25, como máximo 20, como máximo 15, más preferentemente como máximo 10, como máximo 8, como máximo 6, todavía más preferentemente como máximo 5, como máximo 4, como máximo 3 o incluso 2 o uno o incluso cero parejas de cebadores de amplificación específicos para otros genes diferentes de OLFM4. Por ejemplo, dicho kit puede comprender por lo menos una pareja de cebadores de amplificación para como mínimo un gen de mantenimiento además de los cebadores para OLFM4. En un ejemplo particular, dicho gen de mantenimiento se selecciona de entre el grupo que consiste en B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IPO8 y HMBS. Preferentemente, dicho gen de mantenimiento es el gen IPO8 o HMBS.

La práctica de la invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales o química de proteínas, virología molecular, microbiología, tecnología de ADN recombinante y farmacología que se encuentran comprendidas en los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican extensamente en la literatura (ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, editores, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1995; Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985, y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press - Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989). A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan el mismo significado entendido comúnmente por el experto en la materia a la que se refiere la presente invención.

Tras describir de manera general la presente invención, se pondrán más claramente de manifiesto las características y ventajas de la invención haciendo referencia a determinados ejemplos específicos y figuras que se proporcionan en la presente memoria únicamente a título ilustrativo y no limitativo, a menos que se indique lo contrario.

#### Leyendas de las figuras

Figura 1: flujo de trabajo de etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).

Figura 2: OLFM4 se sobreexpresa en los tumores KRAS.

Se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de OLFM4 en tejidos de colon. En el tejido de colon normal (A) se observó tinción moderada en las criptas, mientras que el epitelio superficial no se tiñó. En el tejido tumoral KRAS (B) la tinción era muy fuerte, mientras que la tinción en el tejido tumoral WT (C) era menos

intensa.

Figura 3: OLFM4 se encuentra glucosilado en los tumores KRAS.

5 A. Se prepararon extractos totales de tejidos normales y tumorales en tampón X. El análisis de transferencia western frente a OLFM4 se llevó a cabo para detectar OLFM4 nativo y glucosilado en tejidos de control, WT y KRAS. B. Análisis de desglucosilación de OLFM4: las células COS-7 secretaron significativamente OLFM4; la forma secretada en 72 kDa se trató con (+) o (-) PNGasa F. El tamaño de OLFM4 desglucosilado concordaba con la masa molecular del producto calculado del gen OLFM4. El tratamiento de la banda de 72 kDa en tumor  
10 KRAS conducía a la misma banda en 55 kDa. C. Se calculó la proporción entre las bandas de 72 y 55 kDa para los tejidos normales, los tejidos WT y los tejidos tumorales KRAS. La expresión de OLFM4 glucosilado era significativamente superior en el tumor KRAS que en tejidos normales ( $p=0,002$ ) y que en tejidos WT ( $p=0,011$ ).

15 Figura 4: NF- $\kappa$ B2 regula la expresión de OLFM4 tras la inducción de Ras.

A. Se sometieron o no a tratamiento las líneas celulares colorrectales HT29-H-RasV12 con doxiciclina durante el tiempo indicado; se prepararon extractos de células completas y se analizaron utilizando anticuerpos dirigidos contra Ras, NF- $\kappa$ B2, OLFM4 y HSP70. B. Las células se trataron tal como se ha  
20 indicado anteriormente y se evaluaron las expresiones de ARNm de OLFM4 y RPLPO mediante RT-PCR semicuantitativa. C. Representación esquemática de los potenciales sitios de unión de NF- $\kappa$ B del promotor de OLFM4. El marco de lectura del sitio de unión se indica mediante + para 5'-3' y mediante - para 3'-5'. D-E. Se transfectaron líneas celulares colorrectales HCT116 con oligonucleótidos de ARN de interferencia pequeño (ARNip) específico de NF- $\kappa$ B2 o de control tal como se indica. Se procesaron los extractos de ARNm (D) y los  
25 extractos de células completas (E) y se analizó la expresión de OLFM4 48 h después de la transfección con ARNip. F. Se preparó la cromatina soluble a partir de células HCT116 en crecimiento y se inmunoprecipitó con anticuerpos dirigidos contra NF- $\kappa$ B2, Bcl3 y ARN polimerasa II. Se amplificó el ADN utilizando una pareja de cebadores que cubría el sitio de unión proximal de NF- $\kappa$ B del promotor de OLFM4. A continuación, se cuantificaron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) mediante RT-PCR en tiempo real en  
30 comparación con la señal obtenida en una secuencia de control con una IgG de control.

Figura 5: OLFM4 secretado induce resistencia a oxaliplatino y sn38 en células colorrectales.

35 La influencia de OLFM4 tras los tratamientos genotóxicos en células HCT116 inducibles por OLFM4 se evaluó mediante un ensayo clonogénico. Las células se incubaron con 50 ng/ml de doxiciclina y seguidamente, 24 h después, fueron tratadas con oxaliplatino o sn38 a la concentración indicada durante 10 días. Se tiñeron las colonias con cristal violeta y se contaron utilizando el software QuantityOne (Biorad). B. Se añadió OLFM4 sobreexpresado en células COS7 a razón de aproximadamente 3 ng/ml al tratamiento de oxaliplatino y sn38 en las células HCT116 de tipo salvaje durante 10 días. Se tiñeron las colonias y se  
40 contaron tal como anteriormente. Los histogramas mostrados son representativos de tres experimentos individuales.

## Ejemplos experimentales

### 45 Materiales y métodos

#### Línea celular:

50 La línea celular de adenocarcinoma de colon humano HCT116 (American Type Culture Collection, ATCC) se mantuvo en medio RPMI 1640 sin antibióticos (Lonza). Los cultivos se complementaron con suero de feto bovino al 10%. Las líneas celulares se mantuvieron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y se sometieron a ensayo para descartar la contaminación por micoplasmas.

#### Cultivo celular y transfección estable:

55 El plásmido pCMV/OLFM4 (Imágenes) se cotransfectó establemente con pcDNA6/TR utilizando el reactivo LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se seleccionaron las líneas de células HCT116 estables con 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de blasticidina (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Alemania) y 800  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de G418 durante 1 mes y se mantuvieron en medio RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 10%  
60 que contenía 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de blasticidina y 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de G418. Se indujo la expresión de OLFM4 con 50 ng  $\text{ml}^{-1}$  de doxiciclina durante 48 h. Se confirmó la expresión de la proteína OLFM4 en dichas líneas celulares estables mediante transferencia western tal como se ha indicado anteriormente.

#### Ensayo clonogénico de supervivencia celular:

65 Se sembraron células HCT116 estables con OLFM4 a razón de 300 células en placas de cultivo celular de 6

pocillos con medio RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 3% y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. A continuación se indujeron las células con 50 ng ml<sup>-1</sup> de doxiciclina (Sigma) durante 24 h. Después las células se trataron con SN38 y oxaliplatino y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 días, se lavaron dos veces con PBS y se tiñeron con cristal violeta al 0,1%. Se visualizó el número de colonias que excedían 50 células con un dispositivo de imagen Bio-Rad Chemi Doc XRS y se contaron utilizando software de imágenes Quantity One (Bio-Rad). Se determinó la fracción de supervivencia como la proporción entre el número de colonias observadas con doxiciclina y el número de células observado con doxiciclina, ajustado para la eficiencia de la siembra en placa.

#### 10 Microdissección de captura por láser (LCM):

Se cortaron secciones congeladas (12 µm de grosor) de cáncer de colon o mucosa colónica normal en un criostato (Bright Instrument Co. Ltd., St. Margarets Way, Reino Unido). A continuación se tiñeron las secciones con azul de toluidina utilizando un método de tinción rápida. Las secciones teñidas con azul de toluidina también se prepararon para la referencia visual. Las secciones de tejido se introdujeron en el baño de etanol al 70% durante 1 minuto, de etanol al 95% durante 2 minutos, de etanol al 95% durante 2 minutos y finalmente dos veces en un baño de xileno al 100% durante 5 minutos. Se dejó que el xileno se evaporase por completo de las secciones y después se microdisseccionaron utilizando un sistema de microdissección de captura por láser PixCell II (Arcturus Engineering, Mountain View, California, EE.UU.).

El sistema de captura por láser se dotó de software de archivo de imágenes PixCell II (Arcturus Engineering). La configuración del láser era la siguiente: se fijó el diámetro de punto en 7,5 µm, duración del pulso de 70 milisegundos y potencia de 70 mW. Tras la microdissección, se retiró la película plástica que contenía las células microdisseccionadas y todas las películas que contenían material de una única muestra se introdujeron en una extracción de ADN en tubo de microcentrifuga y se añadió solución de lisis de proteínas. Se capturaron aproximadamente 30.000 células a partir de una única sección de tejido o de secciones consecutivas de tejido utilizando hasta 5 "caps" CapSure de LCM (Molecular Devices Corporation), que se transfirieron a un tubo Eppendorf estéril para la extracción de las proteínas (ver a continuación).

#### 30 Análisis de pirosecuenciación:

Se extrajo ADN genómico procedente de tejido congelado con el kit de extracción de ADN PicoPure™ (Arturus Bioscience, Inc., Mountain View, CA, USA) y se llevó a cabo una amplificación de genoma completo del ADN genómico mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores 15-meros aleatorios.

Se obtuvieron productos de PCR biotinilados con una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, hibridación de cebadores a 54°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1 min, seguido de una extensión final durante 5 min a 72°C. Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un ciclador térmico DNAThermal Cycler 480 (Perkin Elmer, Boston, EE.UU.) con 1 unidad de polimerasa Taq (Euroblue Taq-Eurobio, Les Ulis, Francia). Los diferentes juegos de cebadores utilizados para amplificar las secuencias de interés eran: secuencias de cebador de PCR mediante mutación de KRAS para los codones 12-13 (cadena de sentido): 5'-AAC CTT ATG TGT GAC ATG TTC T-3' (SEC ID n° 1), (antisentido): 5'-biotín-TCG TCC ACA AAA TGA TTC TGA-3' (SEC ID n° 2) y cebador de secuenciación de sentido: 5'-CTT GTG GTA GTT GGA GC-3' (SEC ID n° 3) codón 61: secuencia de cebador: (sentido): 5'-TTA TGG CAA ATA CAC AAA GAA AGC-3' (SEC ID n° 4), (antisentido): 5'-biotín-CAG ACT GTG TTT CTC CCT TCT CA-3' (SEC ID n° 5) y cebador de secuenciación de sentido 5'-ATA TTC TCG ACA CAG CAG-3' (SEC ID n° 6). Se diseñaron cebadores de secuenciación diferentes para llevar a cabo el análisis de pirosecuenciación del gen KRAS. A continuación, se realizó una selección según su capacidad de proporcionar Pyrograms™ interpretables. Los productos de ADN consistían en ADN genómico amplificado a partir de sujetos de control.

Las mutaciones en el fragmento del exón 1 del gen KRAS se detectaron mediante secuenciación directa del fragmento de PCR sin necesidad de purificación adicional con el sistema Pyrosequencer PyroMark ID (Biotage AB y Biosystems, Uppsala, Suecia). Para la pirosecuenciación, se preparó ADN de cadena sencilla a partir de 40 µl de producto de PCR biotinilado, utilizando sefarosa recubierta con estreptavidina y se utilizaron 1,5 pmoles de cebador de secuenciación para el análisis. La secuenciación se llevó a cabo con el kit de reactivos de SNP (Biotage) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Extracción y digestión de proteínas:

La extracción de las proteínas se llevó a cabo utilizando el kit Liquid Tissue MS Protein Prep siguiendo el protocolo del fabricante (Expression Pathology Inc., Gaithersburg, MD, EE.UU.). Brevemente, se retiraron las películas de la cara inferior de los "caps" de cada muestra, se transfirieron a tubos de reacción de baja unión y se incubaron con 20 µl de Liquid Tissue extraction y se calentaron a 95°C durante 90 minutos. Tras enfriar durante 2 minutos sobre hielo, se añadieron 5 µl de reactivo de tripsina y se incubaron a 37°C durante una hora bajo agitación vigorosa durante 30 segundos a intervalos de 20 minutos. Las muestras se incubaron adicionalmente durante la noche a 37°C seguido de calentamiento a 95°C durante 5 minutos.

Como preparación para el marcaje las muestras se recolectaron mediante centrifugación a 10.000 g, se secaron por completo utilizando un aparato Speed-Vac y se resuspendieron en 100 µl de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% en acetonitrilo al 5% y se desalaron utilizando una columna de centrifugación PepClean C-18 (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y se secaron para el procesamiento de iTRAQ™.

#### Marcaje de péptidos con reactivos iTRAQ:

Las muestras de péptidos se resuspendieron en 30 µl de tampón de disolución de iTRAQ (Applied Biosystems) y se redujeron con Tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 5 mM a 60°C durante 1 h y los grupos cisteína se bloquearon utilizando una solución de metanotiosulfonato de metilo (MMTS) 10 mM a temperatura ambiente durante 10 min. Cada solución de péptido se marcó a temperatura ambiente durante 2 h con un vial de reactivo iTRAQ (marcadores de masa 114, 115, 116 o 117) reconstituido anteriormente con 70 µl de etanol. Una mezcla que contenía alícuotas pequeñas de cada muestra marcada se analizó mediante EM/EM para determinar la proporción correcta de mezcla para corregir el diferente rendimiento de péptidos de los procedimientos de tejidos líquidos. A continuación, se mezclaron los péptidos marcados en proporción 1:1:1:1. Seguidamente la mezcla de péptidos se secó por completo utilizando un aparato Speed-Vac.

#### Fraccionamiento de péptidos en OFFGEL:

Para la separación de los péptidos a partir del pl, los presentes inventores utilizaron el fraccionador OFFGEL 3100 (Agilent Technologies, Böblingen, Alemania) con una configuración de 24 pocillos. Antes del electroenfoque, las muestras se desalaron con un cartucho Sep-Pak C18 (Waters). En la configuración de 24 pocillos, las muestras de péptidos se diluyeron a un volumen final correspondiente de 3,6 ml utilizando solución para muestras de péptidos OFFGEL. Al inicio, las tiras de gel IPF de 24 cm de longitud (GE Healthcare, München, Alemania) con un intervalo de pH lineal de 3 a 10 se rehidrataron utilizando la solución de rehidratación de tiras con IPG de péptidos siguiendo el protocolo del fabricante, durante 15 min. A continuación, se cargaron 150 µl de muestra en cada pocillo. El electroenfoque de los péptidos se llevó a cabo a 20°C y 50 µA hasta alcanzar el nivel de 50 kWh. Tras el enfoque, se extrajeron 24 fracciones de péptidos y los pocillos se enjuagaron con 200 µl de una solución de agua/metanol/ácido fórmico (49/50/1); tras 15 min, las soluciones de enjuague se agruparon con su fracción de péptidos correspondiente. Se evaporaron todas las fracciones mediante centrifugación bajo vacío y se mantuvieron a -20°C. Inmediatamente antes de la nano-CL, se resuspendieron las fracciones en 20 µl de H<sub>2</sub>O con TFA al 0,1% (v/v).

#### Separación mediante CL capilar:

Las muestras se separaron en un sistema de nano-CL Ultimate 3,000 (Dionex, Sunnyvale, EE.UU.) utilizando una columna C18 (PepMap100, 3 µm, 100 A, 75 µm di x 15 cm, Dionex) a un caudal de 300 nl/min. El tampón A era ACN al 2% en agua con TFA al 0,05% y el tampón B era ACN al 80% en agua con TFA al 0,04%. Los péptidos se desalaron durante 3 min utilizando sólo tampón A en la precolumna, seguido de la separación durante 105 min utilizando el gradiente siguiente: 0% a 20% de B en 10 min, 20% a 45% de B en 85 min y 45% a 100% de B en 10 min. Se registraron los cromatogramas a la longitud de onda de 214 nm. Se recogieron las fracciones de péptido utilizando un colector de microfracciones Probot (Dionex). Los presentes inventores utilizando CHCA (LaserBioLabs, Sophia-Antipolis, Francia) como matriz MALDI. La matriz (concentración: 2 mg/ml en ACN al 70% en agua con TFA al 0,1%) se añadió continuamente al efluente de la columna mediante una micropieza mezcladora en "T" a un caudal de 1,2 µl/min. Tras una tanda de 12 min, se envió una señal de inicio a Probot para iniciar el fraccionamiento. Las fracciones se recogieron durante 10 s y se aplicaron por puntos en una placa para muestras MALDI (1.664 puntos en cada placa, Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### MALDI-EM/EM:

Se llevaron a cabo análisis de EM y de EM/EM de muestras de péptidos aplicados en puntos fuera de línea, utilizando el analizador 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystems). Tras el cribado de todas las posiciones de muestra de CL-MALDI en modo de reflector positivo para EM utilizando 1.500 disparos de láser, se llevó a cabo la fragmentación de precursores seleccionados automáticamente a una energía de colisión de 1 kV utilizando aire como gas de colisión (presión de ~ 2x10<sup>-6</sup> Torr). Se capturaron los espectros de EM entre m/z 800 y 4.000. Para la calibración interna, los presentes inventores utilizaron el ion parental de Glu1-fibrinopéptido a m/z 1.570,677 diluido en la matriz (3 femtomoles por punto). Se seleccionaron hasta 12 de las señales iónicas más intensas por posición de punto con una relación de señal/ruido (S/R) > 12 como precursores para la adquisición de EM/EM. La identificación de péptidos y proteínas se llevó cabo con el software ProteinPilot™ V 3.0 (Applied Biosystems) utilizando el algoritmo Paragon. Se buscó cada espectro de EM/EM de la especie *Homo sapiens* en la base de datos Uniprot/Swissprot.

Las búsquedas se realizaron utilizando la modificación fija de parámetro cisteína marcado con metanotiosulfato de metilo activada. Otros parámetros, tales como la especificidad de corte triptico, la precisión de la masa del ión-precursor y exactitud de la masa del ión-fragmento son funciones integradas en MALDI 4800 del software

ProteinPilot.

Cuantificación de la expresión relativa de proteínas:

5 Los presentes inventores utilizaron un paquete de software adaptado, iQuantitator, para inferir la magnitud del cambio en la expresión de proteínas. El software infiere los cambios dependientes del tratamiento en la expresión utilizando métodos estadísticos bayesianos. Básicamente este enfoque se utilizó para generar medias, medianas e intervalos de confianza al 95% (superior e inferior) para cada cambio dependiente del tratamiento en la expresión de proteínas mediante la utilización de datos a nivel de péptido de cada péptido componente y la integración de los datos de los dos experimentos. Para las proteínas con proporciones de iTRAQ reguladas negativamente en los tejidos se consideró adicionalmente el grado de regulación negativa en el caso de que el valor nulo de 1 fuese mayor que el límite superior del intervalo de confianza. A la inversa, para proteínas con proporciones de iTRAQ reguladas positivamente en los tumores se consideró adicionalmente el grado de regulación positiva en el caso de que el límite inferior del intervalo de confianza presentase un valor mayor que 1. La anchura de estos intervalos de confianza depende de los datos disponibles para una proteína dada. Debido a que se considera el número de péptidos observado y el número de espectros utilizado para cuantificar el cambio de expresión para una proteína dada, resulta posible detectar cambios pequeños aunque significativos en la regulación positiva o negativa en caso de que se encuentren disponibles muchos péptidos.

10

15

20 Se consideraron los datos de un total de 468.599 espectros de dos experimentos de 4 iTRAQ utilizando dicho software adaptado. Del total, se utilizaron 84.628 espectros para identificar 9.286 péptidos (2.971 proteínas únicas). Para cada proteína y cada péptido asociado a una proteína dada, se calculó la media, la mediana y los intervalos de confianza al 95% para cada uno de los efectos de tratamiento a nivel de proteína y a nivel de péptido.

25 Análisis de transferencia western en tejidos normales y CRC:

Se prepararon lisados de células completas a partir de tres tejidos normales, tres tejidos cancerosos con gen KRAS no mutado y tres tejidos cancerosos con gen KRAS mutado. Las muestras de tejido congeladas se homogeneizaron y se lisaron en un tampón que contenía urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS al 4% (p/v) a 4°C durante 1 h utilizando un agitador giratorio. Se llevó a cabo la lisis mediante sonicación sobre hielo (3x pulsos de 5 s) y los lisados se clarificaron mediante centrifugación a 14.000 x g a 4°C durante 15 min. Se determinaron las concentraciones de proteínas utilizando el kit de cuantificación de proteínas FluoroProfile (Sigma-Aldrich Corporation), con BSA como el estándar, y se resolvieron cantidades iguales de proteínas (80 µg/carril) procedentes de los tejidos de muestra en un gel de SDS-poliacrilamida al 10%. A continuación, las proteínas se electrotransferieron a membranas de VDF. Tras el bloqueo con BSA al 3% en TBS (0,1 M, pH=7,4), las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos (dilución 1:200) a 4°C durante la noche. Se utilizó la abundancia proteica de β-tubulina como control para la carga de proteínas y se determinó utilizando el anticuerpo policlonal de conejo anti-β-tubulina: (H-235) (sc-9104, Santa Cruz Biotechnology Inc.). Las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario respectivo, anticuerpo de conejo anti-IgG conjugado con peroxidasa de rábano picante (anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo, 1:5.000, Santa Cruz Biotechnology Inc.) y se diluyeron con albúmina de suero bovino al 1% durante 1 h a temperatura ambiente. Después de cada etapa las membranas se lavaron tres veces con Tween al 0,05%, TBS. La membrana se sondeó con los anticuerpos indicados y se reveló utilizando electroquimioluminiscencia enzimática (ECL).

30

35

40

45

Inmunohistoquímica:

Entre los anticuerpos primarios utilizados para los estudios de validación se incluyen: anticuerpo de conejo anti-olfactomedina-4 (nº de cat. ab78496, Abcam, Cambridge, MA, 1:25), el anticuerpo de conejo anti-β-tubulina (nº de cat., Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, 1:200).

50

Se obtuvo una puntuación cuantitativa mediante la estimación del porcentaje de células teñidas inmunopositivas: 0, 10% de células; 1: 10% a 30% de células; 2: 30% a 50% de células; 3: 50% a 70% de células y 4: >70% de células. En segundo lugar, se puntuó la intensidad de la tinción mediante la evaluación de la intensidad de tinción media de las células positivas y la secreción (0, nula; 1, débil; 2, intermedia y 3, fuerte). Los datos inmunohistoquímicos se sometieron a análisis estadístico tal como se ha indicado anteriormente para los resultados de EM.

55

Experimento de desglucosilación y traducción *in vitro* de OLFM4:

60 El medio de cultivo purificado y el lisado de células COS-7 se pre-desnaturalizaron en tampón de desnaturalización de glucoproteínas a 100°C durante 5 min. A continuación, las proteínas desnaturalizadas se trataron con un cóctel enzimático (Sigma-Aldrich Corporation) a 37°C durante 3 h siguiendo las recomendaciones del fabricante; se separaron en un SDS-PAGE al 6%, seguido de análisis de transferencia western. El constructo pCM-OLFM4 se transcribió y tradujo en presencia.

65

Ensayos de inmunoprecipitación de cromatina:

Las células, cultivadas hasta una confluencia de 60%, se sometieron o no se sometieron a tratamiento tal como se ha indicado y seguidamente se lavaron y se entrecruzaron con formaldehído al 1% a temperatura ambiente durante 8 min esencialmente tal como se ha publicado anteriormente (29, 30). La reacción se detuvo con 10 ml de solución de glicina 125 mM. Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en 500 µl de tampón de lisis (SDS al 1%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8,1, PMSF 1 mM, NaF 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 5 mM, 2 µg/ml de leupeptina, 5 µg/ml de aprotinina y 1 µg/ml de peptatina) y se sonicaron cinco veces durante 20 segundos cada vez. A continuación, se recuperaron los sobrenadantes mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C, se diluyeron una vez en tampón de dilución (Triton X-100 al 1%, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,1) y se sometieron a una ronda de inmunoclarificación durante 2 h a 4°C con 2 µg de ADN de esperma de salmón fragmentado y 20 µl de proteína G-agarosa recubierta con ADN de esperma de salmón (Millipore) (suspensión al 50%). La inmunoprecipitación se llevó a cabo durante la noche con anticuerpos específicos y con IgG de control y después se añadieron adicionalmente 2 µg de ADN de esperma de salmón fragmentado y 20 µl de proteína G-agarosa recubierta con ADN de esperma de salmón (Millipore) (suspensión al 50%) durante 1 h a 4°C. Cabe destacar que las inmunoprecipitaciones se llevaron a cabo en presencia de Igepal CA-630 al 1%. Los inmunoprecipitados se lavaron secuencialmente durante 10 min cada vez en TSE I (SDS al 0,1%, Triton X-100 al 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,1, NaCl 150 mM), TSE II (SDS al 0,1%, Triton X-100 al 1%, EDTA 2 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,1, NaCl 500 mM) y TP3 (LiCl 250 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato al 1%, EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,1). A continuación, las perlas precipitadas se lavaron una vez con tampón TE y se eluyeron una vez con SDS al 1% y NaHCO<sub>3</sub> 100 mM. Se calentaron los eluidos a 65°C durante 6 horas para revertir el entrecruzamiento con formaldehído. Se precipitó el ADN utilizando procedimientos clásicos. Se utilizó la PCR en tiempo real para el análisis de ChIP y la cuantificación. La ChIP se calculó como la unión a la región de interés/IgG de control, dividido por la unión a una región de control negativo/IgG de control. Se utilizaron los cebadores siguientes:

sitio de inicio de transcripción del promotor de OLFM4:

SEC ID nº 7: directo 5'-GCCATGACTCAGATTCCT-3'

SEC ID nº 8: inverso 5'-CAGGGGCTTCTTATAGTG-3'

región de control:

SEC ID nº 9: directo 5'-TGTGCAGGTGGGTGTAGTTG-3'

SEC ID nº 10: inverso 5'-CCAGGCACAAGGCTAAGAGT-3'

Cebadores:

Se aisló ARN total a partir de líneas celulares con reactivo TRizol (Invitrogen) y se midió la expresión mediante análisis de PCR semicuantitativa utilizando las siguientes secuencias:

OLFM4:

SEC ID nº 11: directo 5'-TTCGCCGAGAAATCGTGGCTCT-3'

SEC ID nº 12: inverso 5'-AGCTGAACCACAGACGGTTTGCT-3'

RPLPO:

SEC ID nº 13: directo 5'-AACCCAGCTCTGGAGAACT-3'

SEC ID nº 14: inverso 5'-CCCCTGGAGATTTTAGTGGT-3'

Otros ensayos:

Se llevaron a cabo transfecciones de ADN, inactivación de ARNip, extracción de ARN, transcripción inversa, reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa y cuantitativa, extractos de proteínas y transferencias western tal como se ha descrito anteriormente (29, 31). Todos los experimentos se llevaron a cabo un mínimo de tres veces para calcular las medias y desviaciones estándar mostradas en las figuras.

**Resultados**

65 Análisis genéticos

A partir de un banco de 49 tumores colorrectales primarios no sometidos a tratamiento, los presentes inventores llevaron a cabo la detección de las mutaciones más comunes en los tumores colorrectales: k-ras, pi3k, b-raf y p53. Se llevaron a cabo ensayos genéticos en tejido tumoral microdisecionado. De entre estos tumores, 30 se encontraban mutados en por lo menos un oncogén (66%) y 16 tumores (35,5%) mostraban mutaciones en el oncogén K-ras. De estos 19 tumores, 3 también se encontraban mutados en p53 y PI3K. Estos resultados concuerdan con los ya publicados en la literatura. Los tumores mutados en p53, Raf o PI3 quinasa fueron excluidos del presente estudio a fin de comparar las muestras no mutadas con las mutadas en K-ras.

#### Identificación de las proteínas en tumores colorrectales

Se llevaron a cabo cuatro tandas de iTRAQ (3 iTRAQ 4plex y 1 iTRAQ 8plex) en 15 tumores colorrectales microdisecionados (figura 1). Debido a que los presentes inventores habían encontrado que el enfoque isoelectrico con tiras de gradiente de pH inmovilizadas resultaba útil para la caracterización de proteomas complejos, separaron en solución el conjunto de péptidos de iTRAQ en un aparato OFFGEL de formato de 24 fracciones. Cada fracción peptídica se sometió a CL-EM/EM. Se adquirió un total de 105.247 espectros de EM/EM (con una puntuación MASCOT>95%) en 4 experimentos de iTRAQ. De ellos, 84.628 espectros se asignaron a 9.286 péptidos únicos, que representaban 2.971 proteínas únicas (tasa de descubrimientos falsos o FDR <0,09%, con por lo menos 2 péptidos). Con el fin de determinar el alcance de la cobertura tumoral de los presentes inventores, se determinó la proporción de proteínas reguladoras tales como quinasas y factores de transcripción. Se identificó un total de 124 quinasas. Ello corresponde a 4,1% de las 2.971 proteínas del proteoma del tumor colorrectal de los presentes inventores con anotaciones de GO ("ontología génica"), que es una proporción equivalente a la esperada para el genoma humano (4,1%). Los presentes inventores identificaron 135 factores de transcripción, que correspondían a 4,5% de las proteínas tumorales y que era ligeramente inferior al 5,4% esperado del genoma. A continuación, se llevó a cabo el análisis de los componentes celulares de GO y se identificaron las proteínas en varios compartimientos subcelulares, tales como la mitocondria, el retículo endoplasmático, la parte nuclear, el citosol, el citoesqueleto de actina, las vesículas citoplasmáticas, la región extracelular y la membrana plasmática. Todas las categorías se encontraban sobreexpresadas con respecto al genoma, lo que sugiere que el análisis de los presentes inventores detectaba preferentemente las proteínas abundantes.

De entre dichas 2.971 proteínas identificadas en el presente estudio, los presentes inventores examinaron inicialmente proteínas que se expresaban diferencialmente en grado estadísticamente significativo en el grupo de tejidos normales y en los tumores. Se identificaron 210 proteínas con un intervalo de confianza (IC en %) superior al 95% en 9 tumores. De entre estas proteínas identificadas, 84 se sobreexpresaban y 126 se encontraban infraexpresadas. Algunas de ellas ya han sido publicadas como candidatos a biomarcador en la literatura. Según la anotación de GO, 58 proteínas (28%) se clasificaron como pertenecientes a la parte extracelular de la célula (GO:0005576). Estas proteínas eran las expresadas más diferencialmente en tumores no mutados y mutados, y de ellas, 25 se sobreexpresaban.

#### Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas expresadas diferencialmente en tumores KRAS

A partir de los tumores con mutación de KRAS, los presentes inventores caracterizaron 223 proteínas expresadas diferencialmente en comparación con los tejidos normales. 96 proteínas se encontraban sobreexpresadas y 127 se encontraban infraexpresadas. La primera conclusión es que el número de proteínas expresadas diferencialmente era superior en el caso de los tumores KRAS.

Con el fin de caracterizar las proteínas que se expresaban específicamente en los tumores con mutación K-ras en comparación con sus contrapartidas no mutadas, se llevaron a cabo 3 tandas independientes de iTRAQ comparando 6 tumores no mutados con 6 tumores KRAS. Los resultados de los análisis estadísticos realizados en 27 tumores demostraron que dos proteínas se expresaban diferencialmente bajo las dos condiciones (>50%): HLA-DRA, con una proporción KRAS/WT de iTRAQ de 0,54 y OLFM4, con una proporción KRAS/WT de iTRAQ de 1,93.

#### • HLA-DRA

HLA-DRA (proporción iTRAQ de 0,54) es uno de los parálogos de cadena alfa de HLA de clase II. Desempeña una función crucial en el sistema inmunológico, al presentar antígenos derivados de las proteínas extracelulares. HLA-DRA es un gen inflamatorio que presenta un papel en la carcinogénesis en el colon. Los resultados de los presentes inventores concuerdan con los de un estudio anterior de cuantificación del ARNm de HLA-DRA que mostraba que la expresión de ARNm de HLA-DRA se encontraba significativamente reducida en los tumores colorrectales de varias cohortes. En el caso de los presentes inventores debería indicarse que la expresión de HLD-DRA sólo se encuentra regulada negativamente de manera significativa en tumores con mutación K-ras.

#### • OLFM4

GW112, también conocido como olfactomedina-4 (OLFM4) o G-CSF clon-1 humano (GC-1\_h), se clonó originalmente a partir de células mieloides humanas y codifica una glucoproteína secretada de 510 aminoácidos. GW112 se expresa normalmente en la médula ósea, intestino y próstata y se ha observado una expresión alterada en diversos tumores, entre ellos los cánceres de colon, mama y pulmón. Algunos estudios recientes han propuesto que GW112 participa en la regulación de la apoptosis. Al sobreexpresarse, dicha proteína incrementa la supervivencia de la célula tumoral y favorece el crecimiento tumoral. Además, el gen de OLFM4 se encuentra regulado por el factor de transcripción NF-κB, potenciando la supervivencia de las células de cáncer gástrico. Recientemente se ha demostrado que OLFM4 es un potencial biomarcador del cáncer gástrico, con una sensibilidad de 25% para el estadio I, 63% para el estadio II, 40% para el estadio III y 30% para el estadio IV y una especificidad de 95%.

Bajo las condiciones experimentales de la presente invención se detectó OLFM4 con la máxima confianza estadística y los presentes inventores se concentran en dicha proteína en la parte del estudio proporcionada a continuación.

#### Validación de la sobreexpresión de OLFM4 mediante inmunohistoquímica

Con el fin de confirmar la alteración de la expresión de la olfactomedina-4 en tumores KRAS frente a tumores WT y colon no neoplásico, se llevó a cabo un análisis inmunohistoquímico de tejidos incluidos en parafina: 15 tumores WT y 17 tumores con mutación de KRAS. Tal como se ha informado anteriormente, los experimentos de inmunohistoquímica han demostrado que la olfactomedina-4 se expresa en el epitelio de las criptas basales pero no en la superficie luminal del tejido normal (figura 2A). En los tejidos tumorales se ha detectado olfactomedina-4 únicamente en el citoplasma o en las vesículas de secreción pero nunca en el estroma. Esta observación sugiere que la sobreexpresión de OLFM4 no se debe a la respuesta inflamatoria observada en el estroma circundante. La comparación entre los tejidos WT y KRAS se investigó bajo dos condiciones: inmunotinción de las células tumorales e inmunotinción de las vesículas de secreción. Para la localización citoplasmática de la olfactomedina-4 en las células tumorales, en los especímenes no mutados no se detectó tinción en 27% (4 de 15), se observó una tinción débil en 47% (7 de 15) y se observó una tinción moderada en 27% de los tumores (4 de 15) (figura 2B). En los tumores con mutación de KRAS no se detectó tinción en 5% (1 de 17), se detectó una tinción débil de OLFM4 en 11% (2 de 17), se detectó una tinción moderada en 35% (6 de 17) y se detectó una tinción fuerte en 47% de los tumores (8 de 17) (figura 2C). Tal como se muestra en la figura 2, se observaron diferencias significativas de intensidad de la tinción y células positivas en tejidos WT y tejidos KRAS. Para la localización en las vesículas de secreción, en los tejidos WT no se manifestó tinción en la mayoría de los especímenes de los presentes inventores (67%, 10 de 15), se detectó tinción débil en 20% (3 de 15) y se detectó tinción moderada en 13% de los tumores (2 de 15); en los tejidos con mutación de KRAS no se detectó tinción en 17% (3 de 17), se detectó una tinción débil en 17% (3 de 17), se detectó tinción moderada en 29% (5 de 17) y se detectó una tinción fuerte en 35% de los tumores (6 de 17). Los resultados informados en la figura 2D muestran una diferencia significativa en la clasificación de la tinción entre tejidos WT y tejidos KRAS que indica que la sobreexpresión de olfactomedina-4 glucosilada se correlaciona con mutaciones de KRAS en los tumores de colon.

#### Validación de la sobreexpresión de OLFM4 mediante transferencia western

También se verificó la expresión diferencial de la olfactomedina-4 mediante análisis de transferencia western. El ensayo de transferencia western se llevó a cabo en 22 tumores colorrectales independientes (11 de tipo salvaje y 11 KRAS). Tal como se muestra en la figura 3A, se detectaron dos bandas, una en la masa molecular esperada de 55 kDa y otra banda aproximadamente en 72 kDa, lo que sugiere que dicha proteína resulta modificada mediante glucosilación. Con el fin de verificar esta hipótesis se incubaron muestras de proteínas con enzimas desglucosilantes (PNGasa F). Tras la incubación, se observó un desplazamiento del peso molecular de 72 kDa a 55 kDa, indicando que la proteína resultaba efectivamente modificada mediante N-glucosilación, tal como se ha indicado recientemente para OLFML1, otro elemento de la familia de la olfactomedina.

#### OLFM4 es una proteína secretada altamente glucosilada

Con el fin de determinar si OLFM4 se secreta al medio extracelular, se transfectó transitoriamente en células COS-7 un vector que expresaba el ADNc de OLFM4. El medio de cultivo y los lisados celulares se recolectaron 72 h después de la transfección y se analizaron mediante transferencia western. Los datos resultantes demostraron que OLFM4 se detectaba tanto en el medio de cultivo como en el lisado celular (figura 3B). Este resultado sugiere adicionalmente que OLFM4 es exportado al medio extracelular en forma de proteína secretada. Cabe destacar que sólo se detectó la forma de 72 kDa en el sobrenadante, lo que indica que esta proteína resulta secretada en forma de proteína glucosilada. Con el fin de determinar si la OLFM4 endógeno también podía encontrarse en forma de proteína secretada, se analizó su presencia en los sobrenadantes de dos líneas celulares colorrectales humanas: HCT116 y HT29. La proteína fue detectada efectivamente, secretada en 72 kDa.

La sobreexpresión de la olfactomedina-4 glucosilada se correlaciona con los tumores KRAS

El ensayo de transferencia western (figura 3A) sugiere que la olfactomedina-4 glucosilada expresada en forma de isoforma de 72 kDa era específica de los tumores con mutación K-ras y no se encontraba presente en los tumores no mutados. Con el fin de confirmar esta observación los presentes inventores seleccionaron 43 tumores independientes (26 WT y 17 KRAS) y 6 controles sanos durante un segundo ensayo de transferencia western. Los presentes inventores calcularon para cada tejido la proporción entre las bandas de 72 kDa y 54 kDa, que ilustra la proporción entre la forma secretada y la olfactomedina-4 intracelular. En pacientes sanos, la banda de 72 kDa siempre se encontraba presente, explicando de esta manera la tasa basal de olfactomedina-4 en el suero humano; sin embargo, la proporción 72/55 indicaba una expresión más elevada de olfactomedina-4 intracelular, con un valor de la mediana de 0,72. En tumores WT, la mediana era de 1,27 y no era significativamente más elevada que la observada en el control sano. En contraste, en tumores KRAS, la proporción 72/55 se elevaba a 1,70 y era significativamente más elevada que en el grupo de control ( $p=0,0011$ ) y que en los tumores WT ( $p=0,0112$ ). Concuera con dicho análisis que los resultados de inmunohistoquímica mostrasen una expresión más elevada de OLFM4 en las vesículas de secreción en tejido con mutación de KRAS que en las muestras no mutadas (figura 2D). Esta observación sugiere que la OLFM4 glucosilada probablemente resulta secretada en estos tumores.

La ruta Ras/NF- $\kappa$ B2 fomenta la expresión de OLFM4

Además de la glucosilación de OLFM4 en los tejidos con mutación de KRAS, los presentes inventores observaron mediante inmunohistotinción y transferencia western (figuras 2 y 3) un incremento de la expresión de OLFM4. Como primera etapa para analizar el efecto del oncogén *ras* sobre la expresión de OLFM4, los presentes inventores generaron líneas celulares colorrectales estables que expresaban el oncogén *rasV12* bajo el control de un promotor inducible por doxiciclina. Tras una inducción de 48 h, los resultados demostraron una regulación positiva del nivel de proteína OLFM4 (figura 4A). Además, el análisis de PCR semicuantitativa demostró que la inducción de OLFM4 mediada por Ras se encuentra regulado al nivel de la transcripción (figura 4B). Algunas publicaciones recientes han demostrado que el factor de transcripción NF- $\kappa$ B regula la expresión de OLFM4 en células mieloides y gástricas. Un análisis de los sitios de reconocimiento de factores de transcripción del promotor de OLFM4 demuestra la presencia de diferentes sitios potenciales de unión de NF- $\kappa$ B2 (figura 4C). Con el fin de determinar si NF- $\kappa$ B2 regula la expresión de OLFM4 en tumores con mutación de KRAS, los presentes inventores analizaron su activación tras la inducción de *rasV12* en el modelo colorrectal de la presente invención. Los presentes inventores observaron que la activación de NF- $\kappa$ B2 se correlacionaba con la expresión de OLFM4 mediada por Ras en las líneas celulares colorrectales (figura 4A). Además, mediante la utilización de un ensayo de ARN de interferencia pequeño, los presentes inventores observaron que la regulación negativa de NF- $\kappa$ B2 inhibía la expresión de OLFM4 al nivel de las proteínas y del ARN (figura 4D-E). Con el fin de determinar si NF- $\kappa$ B2 regulaba directamente el promotor de OLFM4, se llevaron a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) en las líneas celulares colorrectales. Estos experimentos demostraron la atracción de NF- $\kappa$ B2 y su cofactor BCL3 al sitio de inicio del gen OLFM4, lo que se correlaciona con la atracción de la ARN polimerasa II. Estos resultados sugieren que Ras induce la expresión de OLFM4 mediante la activación de NF- $\kappa$ B2 en células colorrectales.

El OLFM4 secretado fomenta la resistencia a SN38 y al oxaliplatino

Con el fin de explorar adicionalmente la función de OLFM4 en el tumor colorrectal con mutación de KRAS, los presentes inventores midieron la tasa de supervivencia de las células colorrectales después de tratamientos genotóxicos en presencia o en ausencia de OLFM4. Como primera aproximación, generaron líneas celulares HCT116 estables que contenían un vector inducible que expresaba el ADNc de OLFM4. Los ensayos clonogénicos llevados a cabo con estas células indicaron que OLFM4 incrementaba la supervivencia celular en respuesta al oxaliplatino y a sn38 en comparación con las células HCT116 de tipo salvaje (figuras 5A y C). A pesar de los cambios en la sensibilidad al oxaliplatino y a sn38, la morfología (datos no mostrados) y la tasa de crecimiento de HCT116-OLFM4 y HCT116-WT eran similares. Con el fin de discriminar entre las funciones intracelulares y extracelulares de OLFM4, las células HCT116 fueron tratadas con fármacos quimioterápicos en presencia o en ausencia de OLFM4. Mediante el ensayo clonogénico los presentes inventores demostraron que la presencia de OLFM4 en el medio potenciaba la resistencia a los agentes genotóxicos oxaliplatino y sn38, el metabolito activo del irinotecán (figuras 5B y D). Se demostró mediante análisis estadístico que todas estas diferencias eran significativas. Los presentes resultados sugieren que OLFM4 extracelular induce resistencia a sn38 y a oxaliplatino en las células colorrectales.

**Referencias**

- Boyle et al., in: Management of Colorectal Cancer. London, United Kingdom: Dunitz; 1998, p. 19:-34.  
 Poston et al., J Clin Oncol.;26: 4828-4833, 2008.  
 Bos, Cancer Res. 49, 4682-4689, 1989.  
 Jervoise et al., J Natl Cancer Inst; 90: 675-684, 1998  
 Andreyev et al., Br J Cancer, 85: 692-696, 2001

Etienne-Grimaldi et al., Clin Cancer Res; 14: 4830-4835, 2008  
 Roessler et al., Clin Cancer Res. 11: 6550-6657, 2005  
 Roessler et al., Mol. Cell. Proteomics 5: 2092-2101, 2006  
 Alfonso et al., Proteomics, 5: 2602-2611, 2005  
 5 Madoz-Gúrpide et al., Mol. Cell. Proteomics 6: 2150-2164, 2007  
 Uemura et al., J. Biol. Chem., 283: 26428-26435, 2008  
 Bi et al., Mol. Cell. Proteomics, 5: 1119-1130, 2006  
 Li et al., Mol. Cell. Proteomics, 7: 1810-1823, 2008  
 14 Wang et al., Mol. Cell. Proteomics, 7: 1639-1650  
 10 Kranenburg O. Biochem Biophys Acta,;1756(2): 81-82, 2005.  
 Ernoult et al., Proteome Sci., 136:27, 2008.  
 Zanivan et al., Proteome Res; 7(12): 5314-5326, 2008.  
 Schetter et al., Clin Cancer Res, 15(18): 5878-5887, 2009.  
 Zhang et al., Gene; 283: 83-93, 2002.  
 15 Koshida et al., Cancer Sci; 98: 315-20, 2007.  
 Liu et al., Clin Cancer Res; 14: 1041-1049, 2008  
 Zhang et al., Cancer Res, 64:2474-2481, 2004.  
 Kee et al.. Mol. Carcinogenesis, 49: 259-270, 2010  
 Oue et al., Int J Cancer, 125(10): 2383-2392, 2009.  
 20 Tomarev & Nakaya, Mol Neurobiol, 40: 122-138, 2009.  
 Schwacke et al., BMC Bioinformatics, 10: 342. 2009  
 Grant et al., J Proteome Res, 8(9):4252-4263, 2009.

**Listado de secuencias**

25 <110> CENTRE REGIONAL DE LUTTE CONTRE LE CANCER D'ANGERS  
 <120> UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA OLFACTOMEDINA-4 (OLFM4) EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER  
 COLORRECTAL.  
 30 <130> D28935  
 <160> 14  
 35 <170> PatentIn versión 3.3  
 <210> 1  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 40 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 45 <400> 1  
 aaccttatgt gtagcatggt ct 22  
 <210> 2  
 <211> 21  
 50 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Biotinilación  
 60 <400> 2  
 tcgtccacaa aatgattctg a 21  
 <210> 3  
 65 <211> 17  
 <212> ADN

<213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 5 <400> 3  
 cttgtgtag ttggagc 17  
 <210> 4  
 10 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 15 <223> Cebador  
 <400> 4  
 ttatggcaaa tacacaaaga aagc 24  
 <210> 5  
 20 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> Cebador  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> Biotinilación  
 <400> 5  
 35 cagactgtgt ttcccttc tca 23  
 <210> 6  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 6  
 45 atattctcga cacagcag 18  
 <210> 7  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 50 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 7  
 55 gccatgactc agattcct 18  
 <210> 8  
 <211> 18  
 60 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 65 <400> 8

caggggcttc ttatagtg 18  
 <210> 9  
 <211> 20  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 10 <400> 9  
 tgtgcaggtg ggtgtagtg 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 20 <400> 10  
 ccaggcaciaa ggctaagagt 20  
 25 <210> 11  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 30 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 11  
 35 ttcgccgaga aatcgtggct ct 22  
 <210> 12  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 40 <220>  
 <223> Cebador  
 <400> 12  
 45 agctgaacca cagacggttt gct 23  
 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 50 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 55 <400> 13  
 aaccagctc tggagaaact 20  
 <210> 14  
 <211> 20  
 60 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Cebador  
 65 <400> 14  
 ccctggaga ttttagtgt 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método para determinar la presencia de una mutación de KRAS en un tumor colorrectal metastásico, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (a) determinar a partir de una muestra biológica de un sujeto que padece un tumor colorrectal metastásico el nivel de expresión de OLFM4,
- 10 (b) comparar el nivel de expresión obtenido con por lo menos un nivel de expresión de referencia y
- (c) determinar la presencia de una mutación de KRAS en dicho tumor colorrectal metastásico a partir de dicha comparación.
- 15 2. Método para el diagnóstico o pronóstico *in vitro* de un fenotipo que responde o que no responde a un agente quimioterápico, que comprende:
- (a) determinar a partir de una muestra biológica de un sujeto que padece un cáncer colorrectal el nivel de expresión de OLFM4,
- 20 (b) comparar el nivel de expresión obtenido con por lo menos un nivel de expresión de referencia y
- (c) determinar el fenotipo que responde o que no responde a un agente quimioterápico a partir de dicha comparación.
- 25 3. Método según la reivindicación 2, en el que dicho agente quimioterápico es un fármaco genotóxico o un agente que se dirige a EGFR.
4. Método según la reivindicación 3, en el que dicho fármaco genotóxico es el oxaliplatino o el irinotecán.
- 30 5. Método según la reivindicación 3, en el que dicho agente que se dirige a EGFR es un anticuerpo monoclonal.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo monoclonal se selecciona de entre el grupo que consiste en panitumumab (Vectibix®) y cetuximab (Erbix®).
- 35 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha muestra biológica se selecciona de entre el grupo de una muestra de suero, una muestra de plasma, una muestra de orina, una muestra de sangre, una muestra de linfa y una muestra de cáncer colorrectal.
8. Método según la reivindicación 7, en el que dicha muestra biológica es una muestra de sangre o una muestra de cáncer colorrectal.
- 40 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nivel de expresión de OLFM4 se determina midiendo la cantidad de transcrito de ácidos nucleicos de dicho gen.
- 45 10. Método según la reivindicación 9, en el que el nivel de expresión de OLFM4 se determina utilizando una PCR cuantitativa o una micromatriz de oligonucleótidos.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nivel de expresión de OLFM4 se determina midiendo la cantidad de proteína olfactomedina 4.
- 50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nivel de expresión de OLFM4 se determina midiendo la cantidad de la forma glucosilada de la proteína olfactomedina 4.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicho método comprende las etapas adicionales de medir la cantidad de la forma glucosilada de la proteína olfactomedina 4, medir la cantidad de la forma no glucosilada de la proteína olfactomedina 4 y calcular la proporción de formas glucosilada frente a no glucosilada de la proteína olfactomedina 4.
- 55 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el nivel de expresión de OLFM4 se determina mediante midiendo la cantidad de proteína olfactomedina 4 secretada.
- 60 15. Método según la reivindicación 14, en el que la cantidad de proteína olfactomedina 4 secretada se determina en una muestra biológica que no contiene ninguna célula tumoral.
- 65 16. Método según la reivindicación 14, en el que la cantidad de proteína olfactomedina 4 secretada se determina cuantificando en las células tumorales las vesículas de secreción que contienen dicha proteína olfactomedina 4.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, en el que dicho nivel de expresión se mide utilizando anticuerpos específicos u otras tecnologías de detección de membrana.

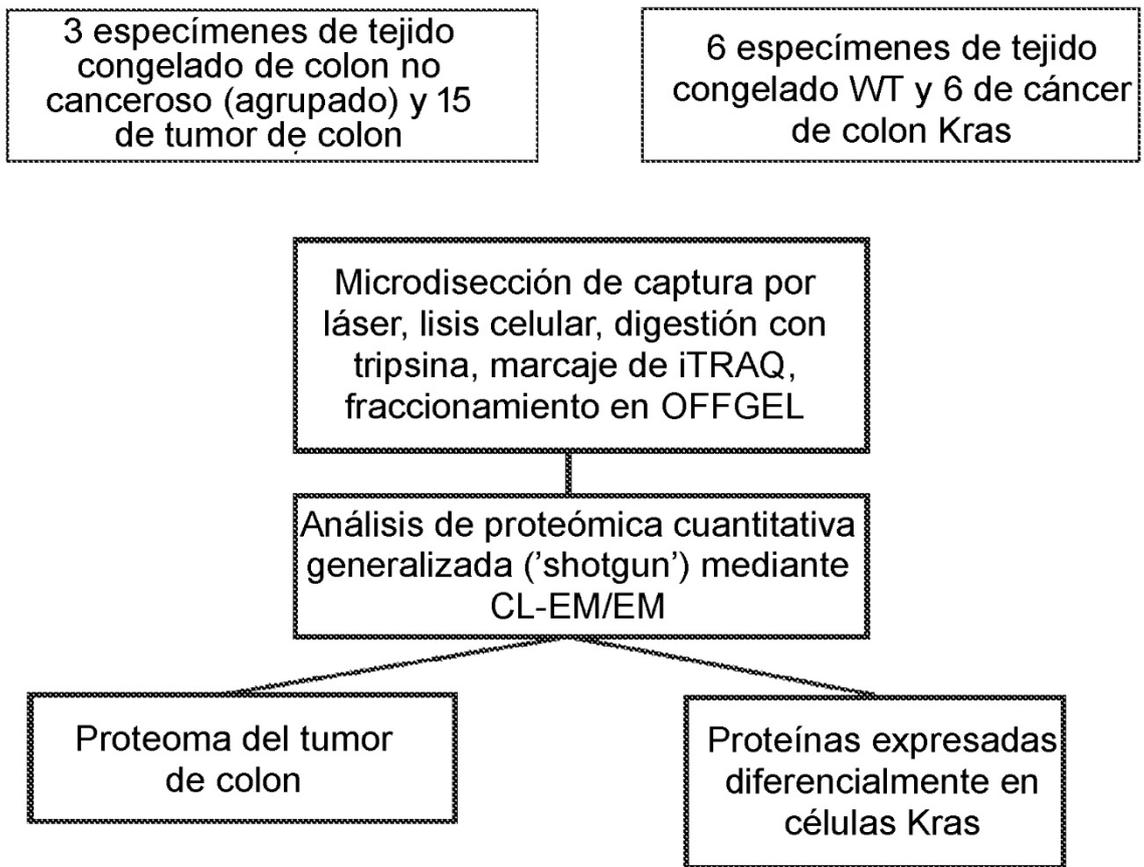


Figura 1

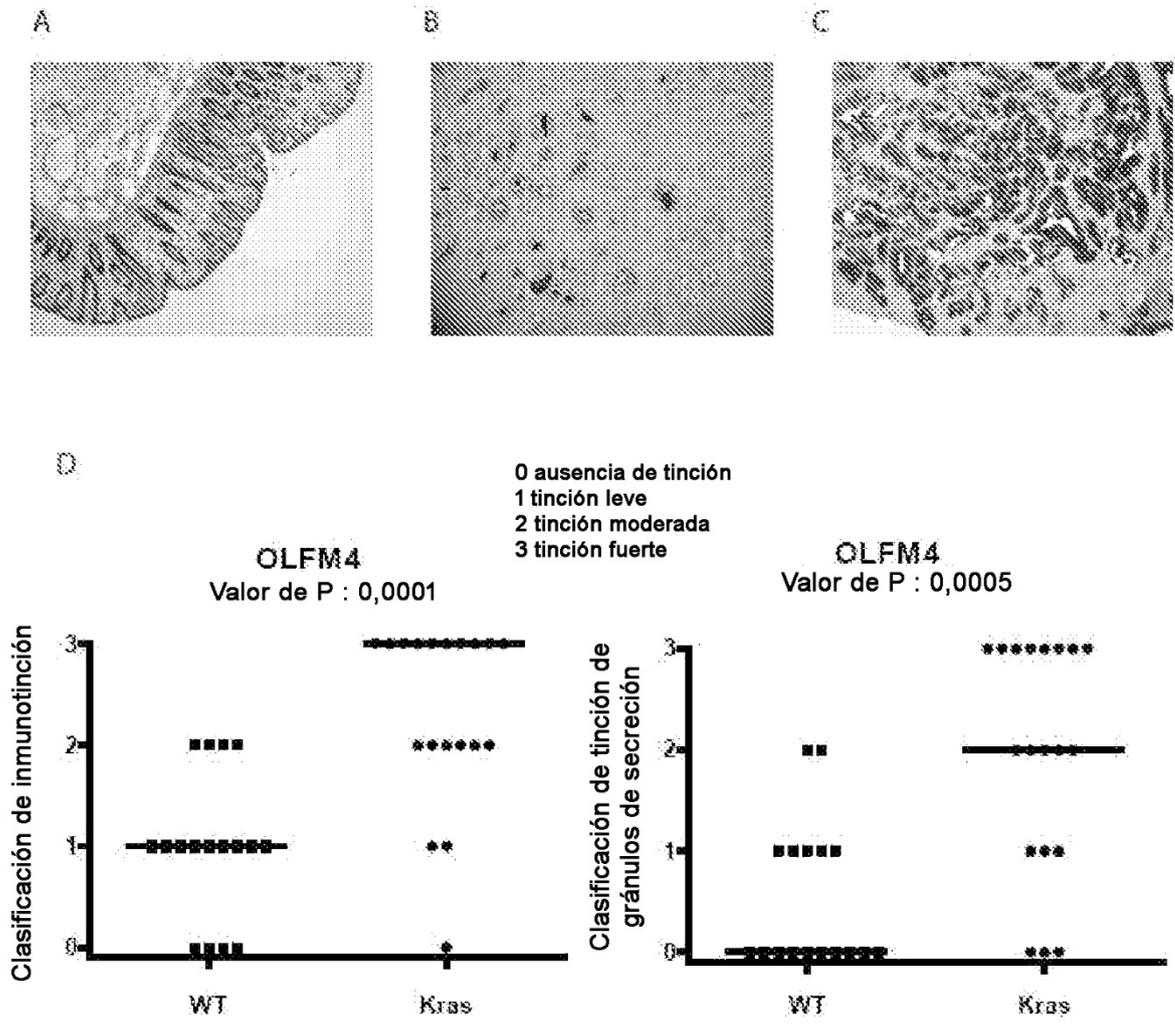


Figura 2

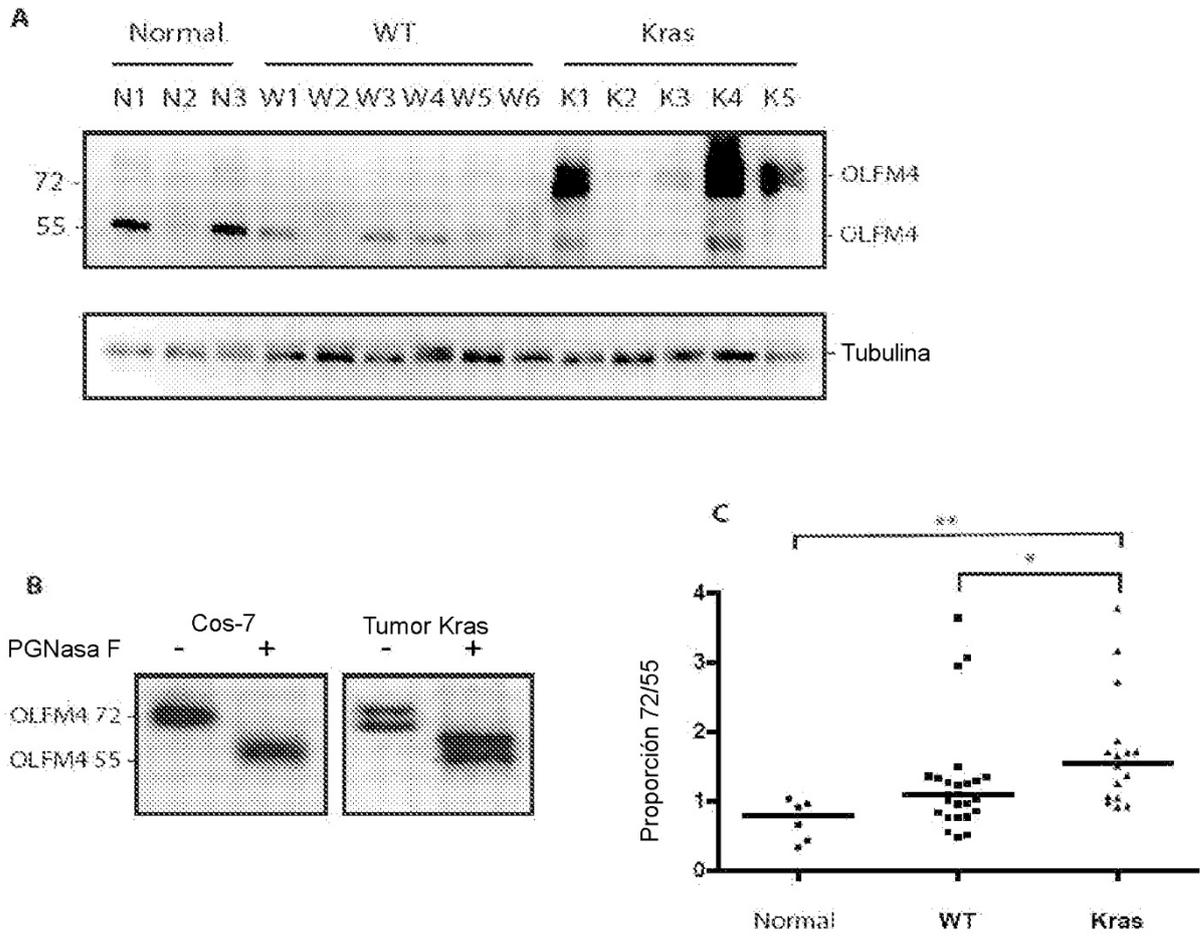


Figura 3

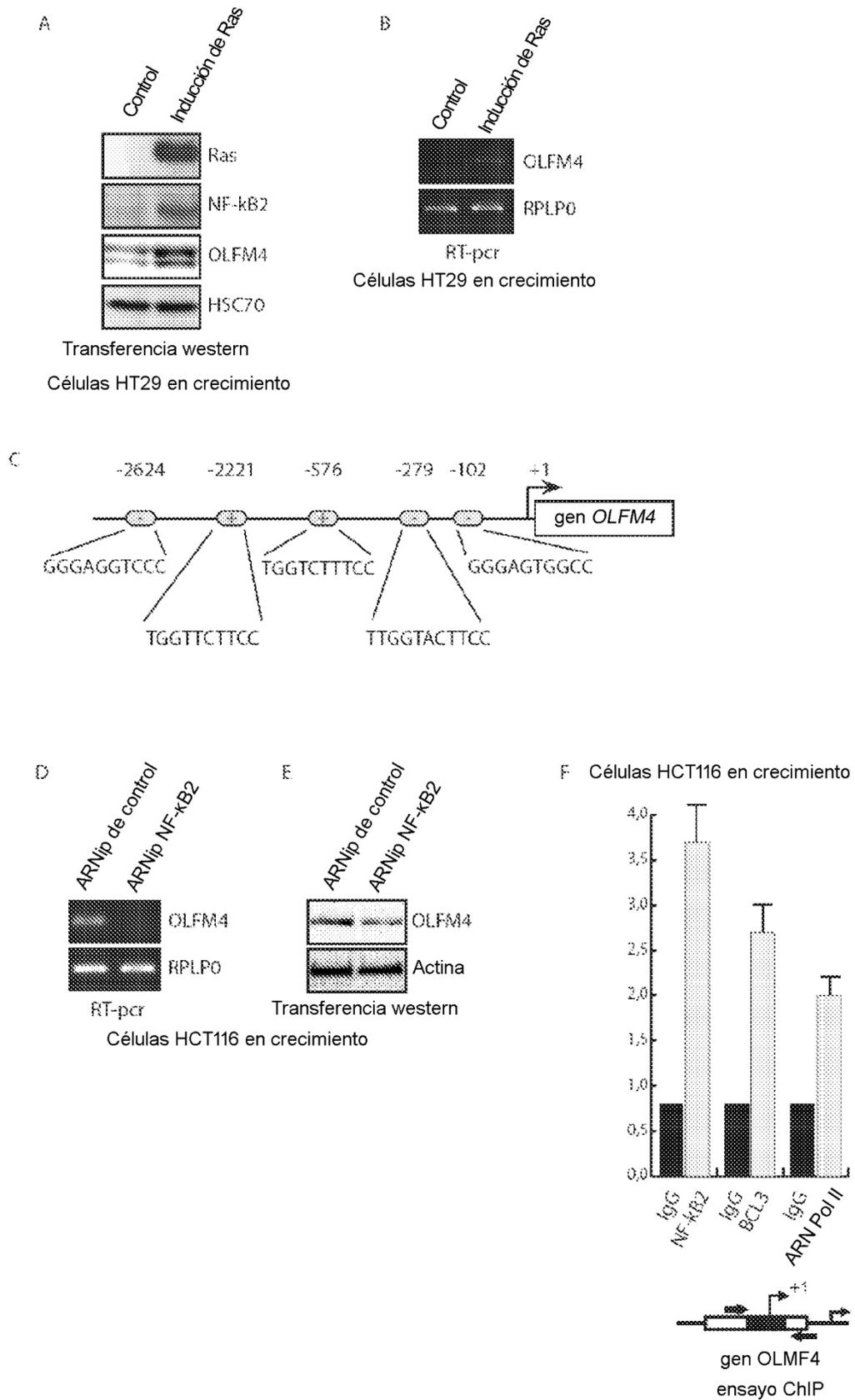


Figura 4

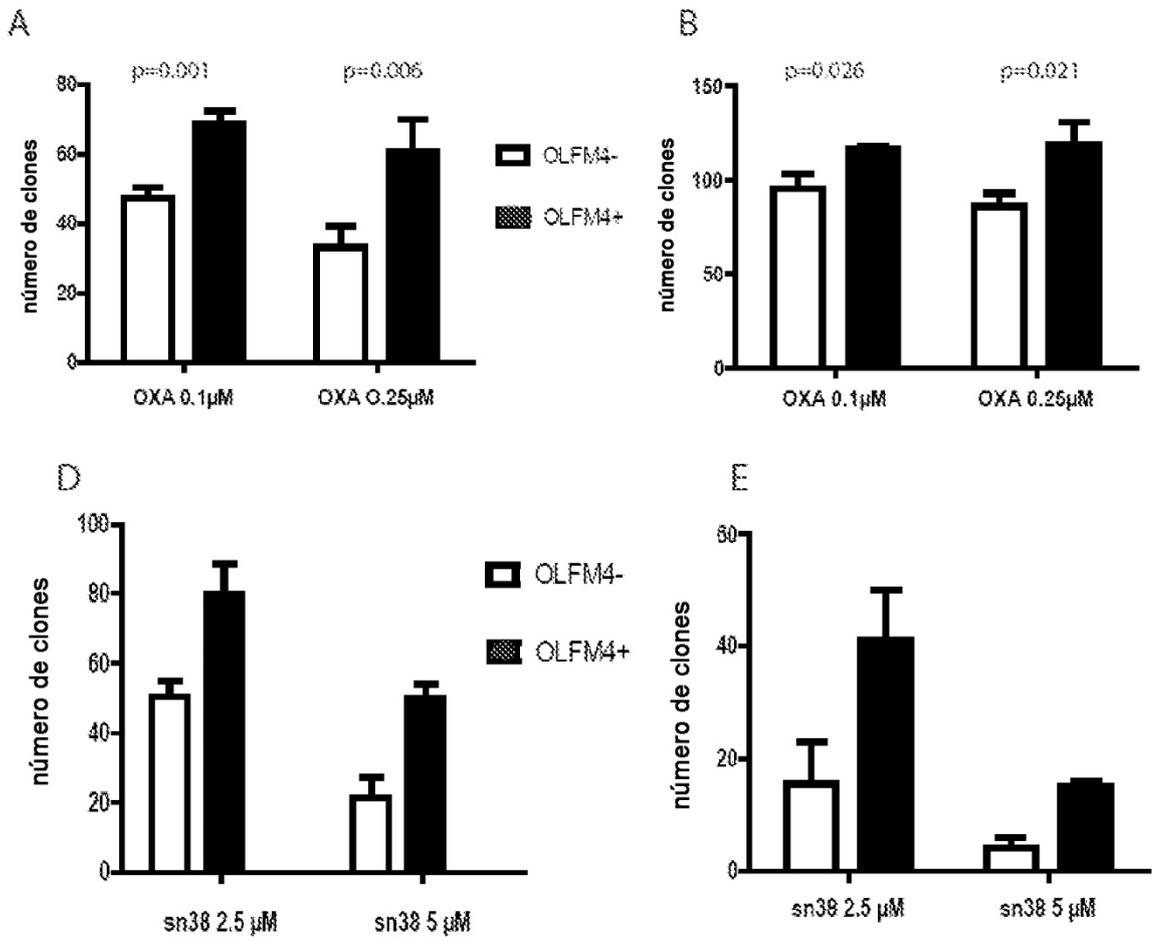


Figura 5